

TESIS DOCTORAL

“Espectro mutacional y caracterización funcional y clínica de nuevas mutaciones genéticas en canalopatías cardíacas”

JUAN JIMÉNEZ JÁIMEZ

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Espectro mutacional y caracterización funcional y
clínica de nuevas mutaciones genéticas en canalopatías
cardíacas**

Juan Jiménez Jáimez

Directores

Prof. Juan Jiménez Alonso

Prof. José Antonio Ramírez Hernández

Departamento de Medicina. Universidad de Granada.



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Juan Jiménez Jáimez
D.L.: GR 1201-2013
ISBN: 978-84-9028-531-2

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Espectro mutacional y caracterización funcional y
clínica de nuevas mutaciones genéticas en canalopatías
cardíacas**

Juan Jiménez Jáimez

Directores

Prof. Juan Jiménez Alonso

Prof. José Antonio Ramírez Hernández

Departamento de Medicina. Universidad de Granada.



Dedicada a Vegui y a Vega

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco en primer lugar a mi mujer, Vegui, su apoyo incondicional, su entrega a favor de mi tiempo y mi lucha diaria por estudiar e investigar. Sin ella no tendría la motivación para seguir adelante y esta Tesis no vería la luz. Gracias por aumentar la fe en mi mismo.

- A mis padres, Juan y Laura, por haberme enseñado todo. Sin vosotros nunca habría sido lo que hoy soy.

- A mis Directores de Tesis, Prof. Jiménez Alonso y Prof. Ramírez Hernández, por creer en mis posibilidades de hacer esta Tesis Doctoral y guiarme a través de ella.

- Al Dr. Luis Tercedor, por su apoyo constante, por ser guía ante las dificultades que estos proyectos generan y porque sin él nada de esto sería posible

- Al Prof. José Antonio Lorente, por su apoyo incondicional a todas mis ideas

- A Enrique, Belén, Laura e Irene

- A los Profs. Eva Delpón, Juan Tamargo y Ricardo Caballero, así como a todo su equipo.

- A la Dra.. Maite Tomé, Dr. Pier Lambiase y Prof. McKenna

- A Carlos (x 3), a Miguel Ángel (x2), a Salva, a Pedro, por compartir el camino conmigo.

- A mis compañeros del Servicio de Cardiología del Hospital Virgen de las Nieves, porque todos ellos han contribuido de una u otra forma a la producción de esta Tesis.

- A todos los pacientes que he atendido durante la realización de esta Tesis Doctoral.

INDICE

Presentación	5
Resumen/Summary	6
I. INTRODUCCIÓN	10
- Muerte súbita cardíaca: concepto y epidemiología	
- Mecanismos y causas de la Muerte Súbita Cardíaca	
- Las canalopatías como causa de muerte súbita	
- Genética cardiovascular	
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	50
III. MATERIAL Y MÉTODOS	57
IV. RESULTADOS	76
- IV.1: Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio.	
- IV.2: Functional Effects of a novel missense mutacion in KCNH2 associated with type 2 Long QT Syndrome	
- IV.3: Diagnosis of Unexplained Cardiac Arrest: preliminary results of the FIVI-GEN study.	
- IV.4: Baja penetrancia en canalopatías cardíacas: utilidad diagnóstica del estudio genético.	
- IV.5: Novel SCN5A mutation associated with Idiopathic Ventricular Fibrillation due to subclinical Brugada Syndrome.	
- IV.6: Functional effects of a novel SCN5A mutation related to Idiopathic Ventricular Fibrillation	
V. DISCUSIÓN	193
VI. CONCLUSIONES GENERALES.	198
VII. REFERENCIAS	201
VIII. ANEXOS	215

Presentación

La Tesis Doctoral que sigue a continuación surgió como consecuencia de un intento por mejorar nuestra asistencia de los pacientes y familiares afectados por la muerte súbita cardíaca. La incidencia de la muerte súbita cardíaca de origen arrítmico no es baja en la población general y deportista, y a menudo se plantean preguntas aún no respondidas que nos animaron a un esfuerzo investigador por nuestra parte.

El sustrato genético de los pacientes afectados por muerte súbita y corazón estructuralmente sano es algo aún no explorado en profundidad en nuestro medio. En el año 2008 comenzamos con nuestra dedicación en la atención especializada de este grupo de pacientes. Hasta la fecha actual hemos agrupado series de enfermos que, si bien no son muy amplias, son relevantes clínicamente dada la escasa prevalencia de estos trastornos en la población general y la infradetección que se hace de ellos. Por ello hemos pasado a formar parte de Registros Nacionales y a coordinar proyectos multicéntricos, hemos publicado artículos de impacto internacional y hemos creado una consulta de atención especializada de referencia.

La satisfacción de poder defender públicamente estos resultados me estimula a seguir desarrollando nuevos proyectos y objetivos, siempre con un mismo fin: aumentar conocimiento para mejorar la atención de nuestros pacientes, a los cuáles me debo y que siempre serán el objetivo último de todos mis esfuerzos.

Summary

Cardiac channelopathies are ion channels disorders in the absence of structural heart disease, and can lead to ventricular arrhythmias and sudden death, usually in young and previously healthy people. Among these disorders we find the Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, Catecholaminergic Polimorphic Ventricular Tachycardia and Idiopathic Ventricular Fibrillation. These diseases are caused by a disfunction of ion channels, mainly potassium, sodium and calcium, that are encoded by the following genes: KCNQ1, KCNH2 and SNC5A for Lond QT Syndrome, SCN5A for Brugada Syndrome and RyR2 for Catecholaminergic Polimorphic Ventricular Tachycardia. Mutations in these genes can produce an abnormal action potential and typical features in surface electrocardiogram, predisposing to polimorphic ventricular arrhythmias and sudden cardiac death.

Numerous mutations in all these genes have been described, and the yield of genetic screening accounts for up to 70 % of long QT Syndrome patients, 30 % in Brugada Syndrome and 70 % in Catecholaminergic Polimorphic Ventricular Tachycardia. In Idiopathic Ventricular Fibrillation genetic testing has not been sufficiently studied yet. In some pathologies such as the Long QT Syndrome, previous studies suggests that depending on the genetic basis (basically the gen affected) response to treatment, arrhythmia triggers and outcome may be different. Most of the mutations found in these patients are “novel”, so there are no data about their clinical impact and functional consequences.

In our population there are no data about the genetic basis of cardiac channelopathies. Moreover, there are very few studies, and most of them are isolated cases, that describe natural history, clinical outcome and electrocardiographic features of patients with cardiac channelopathies. The aim of this Thesis is to analyze the mutation spectrum and clinical profile of series of patients with Long QT Syndrome, Brugada Syndrome and Idiopathic Ventricular Fibrillation. Besides, this

This thesis provides the study of the functional effects of two novel mutations related to Long QT Syndrome and Brugada Syndrome.

In the Long QT Syndrome population the prevalence of genes mutations was 81 %, most of them in *KCNH2*, two of them in *SCN5A* and only one in *KCNQ1*. Three of these mutations had been previously associated to Long QT Syndrome in clinical or functional studies. In the Brugada Syndrome population the mutational prevalence was 30 %, and all the mutations had not been previously described. In the Idiopathic Ventricular Fibrillation population the yield of genetic screening for cardiac channelopathies was 22,2 %.

The clinical study of these populations showed that less than a half of patients fulfilled diagnostic criteria according to current guidelines for diagnosis of cardiac channelopathies. This was more relevant among first degree relatives, who only fulfilled diagnostic criteria in isolated cases.

We describe clinical and functional effects of an heterozygous novel mutation in *SCN5A* affecting exon 28 and consisting of a nucleotidic insertion (D1816fs/g 98747-98748insT) in a Spanish family in which the index case presented as IVF. Previous studies have involved mutations in nearby locations on the protein both in LQTS and also in BS, but there was no evidence of this mutation causing cardiac ion-channel diseases or IVF. Our study demonstrates that this mutation produces a Brugada phenotype in genetic carriers with a very low clinical penetrance, with only two out of eight gene carriers showing the typical electrocardiographic features. This finding was confirmed with a functional study where currents were recorded using the whole-cell patch-clamp in CHO cells transiently transfected with the gene encoding the native (Wild type) or the mutated Nav1.5 together with the ancillary Nav β 1 subunit. p.D1816fs significantly reduced the current density generated at -20 mV (-63.4 ± 20 pA/pF) compared with Wild Type channels (-723 ± 115 pA/pF).

Coexpression of Wild type and mutated channels in a 0.5:0.5 ratio demonstrated that the mutation did not produce a dominant negative effect (-295 ± 87 pA/pF). p.D1816fs shifted ~ 15 mV towards more depolarized potentials the voltage-dependence of both the activation and the inactivation of the channel. Furthermore, recovery from fast inactivation was significantly faster for p.D1816fs than for Wild Type channels.

In another paper we study the electrophysiological consequences of a novel missense mutations in KCNH2 found in a Spanish family with Long QT Syndrome. Wild-type (WT) and p.E637G Kv11.1 channels were transiently transfected in Chinese hamster ovary cells, and currents were recorded using the patch-clamp technique. The p.E637G channels lost inward rectification and K⁺ selectivity, generating small but measurable slowly activating, non inactivating currents. These important alterations were corrected neither by cotransfection with Wild Type channels nor by incubation at low temperatures or with pharmacological chaperones. As a consequence of its effects on channel gating, the mutation significantly reduced the outward repolarizing current during the action potential, resulting in a marked lengthening of the duration of a simulated human ventricular action potential.

In summary, this Doctoral Thesis is the first description in our country of a serie of patients with cardiac channelopathies. Our data suggests that genetic screening had a high sensitivity for the Long QT Syndrome with the most affected gene being different from previously reported. Clinical description showed a low penetrance in all of them with high prevalence of normal electrocardiograms in mutation carriers and functional studies demonstrated a pathogenic effect of two novel mutations not previously reported and related to Long QT Syndrome and Brugada Syndrome.

Abreviaturas

- ECG: Electrocardiograma
- MSC: Muerte Súbita Cardíaca
- FVI: Fibrilación Ventricular Idiomatica
- SB: Síndrome de Brugada
- SQTL: Síndrome de QT largo
- TVCP: Taquicardia Ventricular catecolaminérgica Polimórfica
- WT: Wild type
- DAI: Desfibrilador Automático Implantable

Abbreviations

- BS: Brugada Síndrome
- CVPT: Cathecolaminergic Polimorphic Ventricular Tachycardia
- ECG: electrocardiogram
- IVF: Idiopathic Ventricular Fibrillation
- LQTS: Long QT Syndrome
- SCD: Sudden Cardiac Death
- WT: Wild Type
- ICD: Implantable Cardioverter Defibrillator

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

I INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte Súbita Cardíaca (MSC): concepto y epidemiología.

Se define muerte súbita como toda aquélla producida de forma repentina en un sujeto aparentemente sano, en ausencia de causas externas potencialmente responsables. Una gran proporción es causada por enfermedades cardíacas y característicamente ocurre en la primera hora desde el inicio de los síntomas. Es la denominada Muerte Súbita Cardíaca (MSC). Una definición habitualmente aceptada de MSC es una muerte natural debida a causa cardíaca y caracterizada por una repentina pérdida de conocimiento dentro de la primera hora del inicio de los síntomas agudos. Puede haberse reconocido o no previamente una cardiopatía existente, pero el momento y la forma del fallecimiento son inesperados.¹ El ser *inesperada* es la característica fundamental de la MSC y es aplicable a las diferentes patologías responsables en sus variados grados de estratificación de riesgo.

La causa inminente de la muerte es el cese repentino de la circulación sanguínea que resulta incompatible con el mantenimiento de la vida pasados unos minutos. Esto habitualmente es causado por una arritmia ventricular, y de estas la que más frecuentemente conduce a la muerte es la fibrilación ventricular (FV). La definición de una hora es arbitraria, y está destinada a aumentar la sensibilidad de la misma, ya que en la mayoría de las ocasiones la muerte sucede en los primeros minutos tras el inicio de la arritmia responsable. De hecho, cuando la muerte sucede en los primeros minutos tras el inicio de los síntomas la probabilidad de que se trate de una MSC de origen arrítmico es mayor y es menos frecuente el hallazgo de causas extracardíacas como hemorragia interna, ictus o embolias.² Otras definiciones admiten un margen más amplio de 24 horas desde el inicio de los síntomas, y en general se emplea para “*muertes sin testigo*” en quienes se sabían que estaban vivos dentro de las primeras 24 horas antes de su hallazgo.

La incidencia de la MSC a nivel mundial es difícil de calcular ya que varía significativamente en función de la prevalencia de cardiopatía isquémica en diferentes países^{3,4}. Depende asimismo de otros factores como la edad, el sexo y la herencia, por lo que el análisis de la incidencia debe hacerse por subgrupos. La incidencia general se cifra en 1-2 MSC por cada 1000 habitantes-año, siendo similar en Europa y Estados Unidos.⁴ Estos rangos de valores se basan en parte en la definición empleada de MSC y ésta ha sido variable a lo largo de la Historia, por lo que la incidencia real sólo podría conocerse mediante un estudio prospectivo con diseño longitudinal.

La incidencia de la muerte súbita en relación con la edad sigue una relación lineal (figura 1.1): así, existe un incremento de incidencia entre el nacimiento y los 6 meses de vida (Síndrome de muerte súbita del lactante, SMSL) y posteriormente a medida que avanza la edad aumenta la incidencia, alcanzando un pico entre los 45 y los 75 años de edad donde puede llegar a ser hasta 100 veces superior. Este espectacular incremento de la MSC es paralelo al aumento en la prevalencia de cardiopatía isquémica⁴.

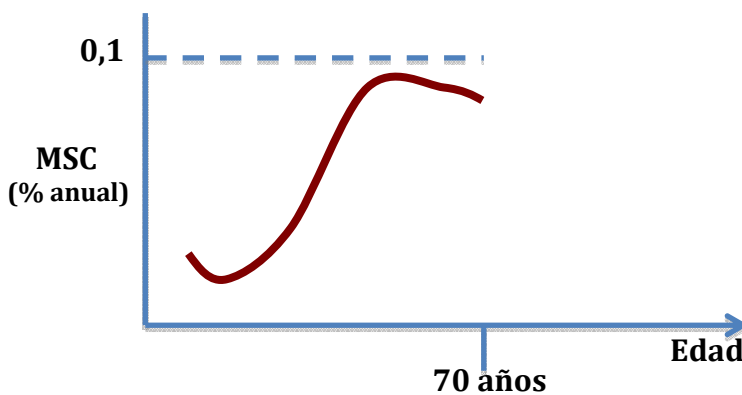


Figura 1.1: Relación lineal de la MSC con la edad. Nótese el primer pico al nacimiento y el exponencial crecimiento a partir de los 40 años de edad, con pico a los 70 años.⁴

Respecto al sexo, el riesgo de MSC es superior en varones, que la padecen hasta 7 veces más frecuentemente que las mujeres.⁵ Esto se debe fundamentalmente a la protección contra la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica que posee el sexo femenino hasta edades posmenopaúsicas.

I.II Mecanismos y causas de la MSC

La enfermedad coronaria es, con diferencia, la causa más frecuente de MSC, llegando a ser responsable de forma global de hasta el 80 % de las MSC. Sin embargo, prácticamente cualquier proceso que afecte al corazón puede dar lugar a una MSC debido a la gran variedad de procesos capaces de producir una arritmia potencialmente letal. Entre estas otras causas encontramos las enfermedades primarias del miocardio como la miocardiopatía dilatada (MCD), la miocardiopatía hipertrófica (MCH), la miocardiopatía restrictiva (MR), valvulopatías, anomalías congénitas de arterias coronarias, miocarditis y trastornos de los canales iónicos cardíacos o canalopatías, entre otras.⁶

Las causas de MSC varían en función de la edad del paciente. En sujetos mayores de 35 años la causa más frecuente de MSC es con diferencia la cardiopatía isquémica. Como muestra la figura 1.2, en segundo lugar en este grupo de edad se encuentran las miocardiopatías y canalopatías. En niños y jóvenes menores de 35 años estas enfermedades del miocardio y de los canales iónicos pasan a ser la primera causa, junto a las alteraciones congénitas de las arterias coronarias. Incluso trabajos recientes han demostrado la implicación de las canalopatías en el denominado Síndrome de Muerte Súbita del Lactante.⁷⁻⁹

En la figura 2 se esquematizan las principales causas de MSC por edad según estudios necrópsicos realizados en varios estudios transversales.^{7,10} En adolescentes y jóvenes menores de 30 años la primera entidad individual causante de MSC fue la

miocardiopatía hipertrófica. Tras esta llama la atención un porcentaje importante de sujetos con autopsia “blanca”, esto es, sin hallazgos patológicos que expliquen la MSC sufrida por el sujeto. En este caso se habla de Síndrome de la Muerte Súbita Arrítmica o SADS (del inglés “Sudden arrhythmic Death Syndrome”).^{11,12} Este último grupo se caracteriza por presentar un origen genético definido, un corazón estructuralmente normal, una predisposición a provocar arritmias ventriculares y muerte súbita y una penetrancia clínica habitualmente incompleta.¹³ Las enfermedades que forman parte del SADS son el Síndrome de QT largo (SQTL), el Síndrome de Brugada (SB), el Síndrome de QT corto (SQTC) y la Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica (TVCP). Todas ellas predisponen al desarrollo de arritmias ventriculares polimórficas y MSC. En el siguiente apartado se exponen detalladamente sus características diferenciales y su patrón de herencia.

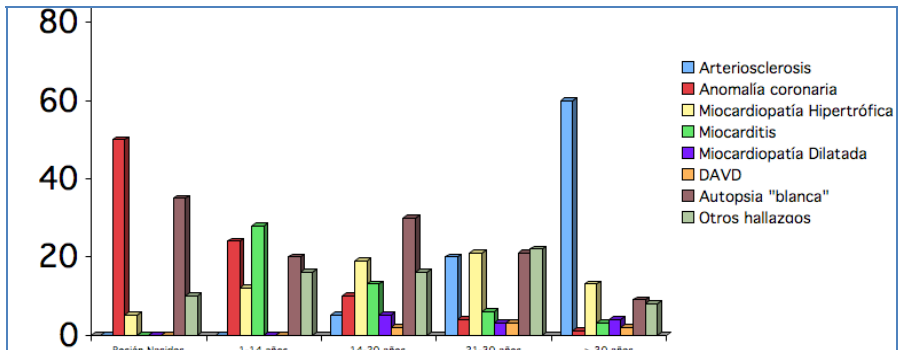


Figura 1.2: Representación esquemática de las causas de MSC más prevalentes según la edad. Nótese la alta prevalencia de la autopsia sin hallazgos patológicos en todos los rangos de edad.

Todas las causas mencionadas anteriormente producen muerte súbita predominantemente mediante una arritmia final letal: la fibrilación ventricular.

Fibrilación Ventricular

La FV es el punto final común a cardiopatías de diversa índole. Consiste en una desestructurada y desorganizada actividad eléctrica y contracción de los miocardiocitos ventriculares que conduce a una drástica reducción del gasto cardíaco produciendo la muerte de la persona en cuestión de minutos si adecuadas maniobras de resucitación cardiopulmonar no son llevadas a cabo con prontitud.

A finales del siglo diecinueve se describieron por primera vez las alteraciones en la propagación del impulso que provocaban FV, sugiriendo que la explicación más razonable eran múltiples reentradas en el miocardio ventricular debido a reexcitaciones continuas de las células inmediatamente tras finalizar su período refractario.¹⁴ Cuando, en los años setenta, se dispuso de mapeo simultáneo desde múltiples zonas del corazón se obtuvieron mapas de activación de la FV en corazones sometidos a isquemia regional, siendo el resultado compatible con la hipótesis de “múltiples ondas pequeñas” o pequeñas reentradas.¹⁵

La taquicardia ventricular que degenera a FV y más tarde a asistolia parece ser la casacada fisiopatológica más común implicada en las arritmias fatales.¹⁶⁻¹⁸ En la figura 1.3 está representada la secuencia de acontecimientos más frecuente que desembocan en la MSC. En pacientes con cardiopatía estructural el suceso inicial suele ser una taquicardia ventricular monomórfica sostenida que degenera en FV, generalmente debida a isquemia micro o macrovascular. En pacientes sin cardiopatía de base la taquicardia ventricular polimórfica, incluyendo la taquicardia helicoidal o “*torsade de pointes*”, son el evento primario que rápidamente conduce a FV en caso de ser de carácter sostenida en el tiempo. Las canalopatías incluidas en este grupo son el SQTl, el SB, la TVCP, el SQTc y la FVI.

El estudio de las propiedades biofísicas y electrofisiológicas del miocardiocito y de la célula específica del sistema de conducción en los pacientes afectados de canalopatías es fundamental para entender los mecanismos de la arritmogénesis ventricular en estos pacientes. La excitabilidad cardíaca normal resulta de un balance

entre corrientes iónicas despolarizadoras y repolarizadoras. Cada corriente iónica se puede diferenciar según su selectividad iónica y su temporalidad, que son propiedades intrínsecas de cada canal. Las mutaciones en genes que codifican estas proteínas y en otras responsables de su regulación pueden potencialmente producir arritmias atañes y se clasifican en función de que haya una anomalía en la formación del potencial de acción o en la propagación de éste.

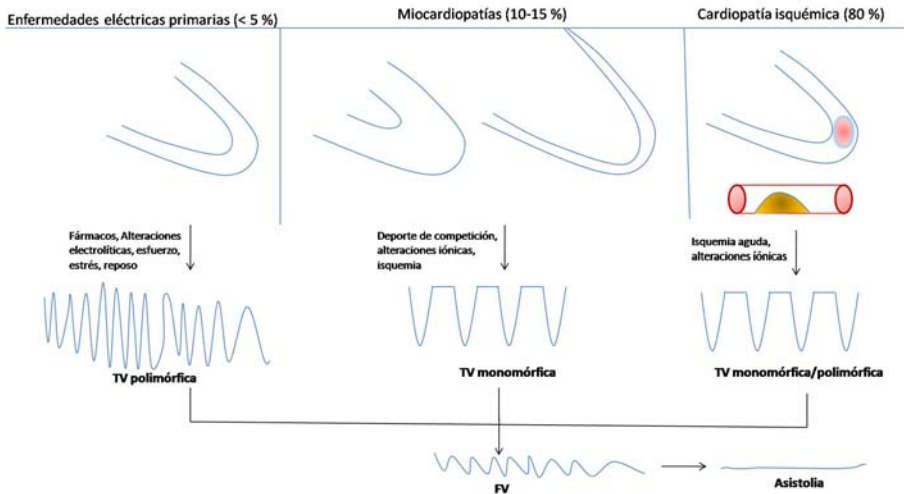


Figura 1.3: Secuencia de acontecimientos productores de MSC en diferentes cardiopatías. En el caso de las canalopatías o enfermedades “puramente eléctricas” es característica la normalidad estructural del corazón y el inicio del evento arrítmico con una taquicardia ventricular polimórfica.

La anomalía en la formación del impulso suele deberse a lo que se conoce como actividad desencadenada, en la cuál se generan potenciales de acción precoces o tardíos tras un potencial de acción normal. Los postpotenciales tardíos se deben en general a una liberación masiva de calcio desde el retículo sarcoplásmico una vez que el potencial de acción precedente está casi en reposo nuevamente, y están implicados en la producción de arritmias ventriculares en la TVCP.¹⁹ Respecto a la propagación del impulso, el miocardio ventricular tiene una secuencia de activación del potencial de acción extremadamente regulada. La propagación anómala del potencial de acción se produce cuando el impulso despolarizador no se extingue

completamente tras una activación normal, pudiendo por lo tanto estimular zonas que ya han recuperado su excitabilidad y ocasionado una reentrada. Para que esto suceda son necesarias tres condiciones:

- Un obstáculo alrededor del cuál el potencial de acción pueda circular.
- Una velocidad de conducción suficientemente lenta tal que cada región tenga tiempo de recuperarse antes de que llegue de nuevo la onda despolarizante
- La existencia de un bloqueo unidireccional de la conducción que prevenga al estímulo de auto-extinguirse.

Este mecanismo de arritmogénesis es ampliamente conocido cuando existe un obstáculo anatómico, siendo el ejemplo más claro la escara ventricular por un infarto de miocardio antiguo. Sin embargo, esto sucede en ciertas canalopatías en ausencia de obstáculo anatómico: la reentrada se establece porque hay diferencias regionales en la excitabilidad de la membrana celular por la existencia de gradientes eléctricos alterados desde epicardio a endocardio causados principalmente por defecto de la corriente repolarizadora de potasio que debe mantener el potencial de reposo. En otras ocasiones, la arritmia se produce como consecuencia de una heterogeneidad de carácter temporal, fenómeno conocido como alternancia: en este caso la duración del potencial de acción es variable latido a latido, causando ciclos corto-largo-corto en función de los canales excitables existentes y predisponiendo a arritmias una vez superado un punto crítico conocido como intervalo diastólico mínimo. Esto explica la predisposición de arritmias ventriculares en otras canalopatías como el SQTL y el SB.^{19,20}

I.III Las canalopatías como causa de muerte súbita

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que permiten el paso de iones dentro y fuera del miocardiocito; este proceso se rige por una sincronización entre la apertura y el cierre de los canales a raíz de un gradiente eléctrico que origina

el potencial de acción cardíaco. Las subunidades de los canales iónicos están formados por proteínas multiméricas codificadas por genes distintos. La subunidad principal se denomina alfa (α) y es la que constituye el poro a través del cuál pasa la corriente iónica. Además existen una serie de subunidades beta (β) reguladoras en número variable según el canal iónico. En el corazón, como en otros tejidos excitables, la generación del potencial de acción depende de la compleja interacción de varias corrientes iónicas dependientes de múltiples canales. Cuando este balance se distorsiona debido a una corriente anómala producida por un canal defectuoso (por una mutación genética) puede haber un riesgo incrementado de inestabilidad eléctrica y arritmias fatales. Las canalopatías se definen, pues, como síndromes hereditarios causados por mutaciones en los genes codificantes de los canales iónicos, sus subunidades o proteínas asociadas implicados en despolarización y repolarización ventricular.²¹⁻²³

El flujo de canales iónicos es esencial para la formación y propagación del potencial de acción cardíaco. El miocardiocito ventricular se despolariza a causa de una masiva y muy rápida entrada de cargas eléctricas positivas, principalmente a través del canal de sodio (Na^+). Esto produce la fase 0 del potencial de acción convirtiendo el potencial de membrana en positivo (+40mV). Inmediatamente después se inicia la repolarización parcial con la corriente I_{to} de potasio (K^+). El objetivo de la repolarización, es eliminar cargas positivas intracelulares para volver al potencial de reposo. La fase 2 o de “*plateau*” es característica de la célula ventricular y se debe a corrientes de calcio liberadas desde el retículo sarcoplásmico al interior de la célula a través del receptor voltaje-dependiente de la ryanodina, y que provocan la contracción sarcomérica y a su vez favorecen la salida de K^+ con las corrientes I_{Ks} e I_{Kr} ya en la fase 3 o de repolarización; en esta fase 3 se recupera el potencial negativo a través de la membrana celular alcanzado la fase 4 del potencial de acción cardíaco (figura 1.4).

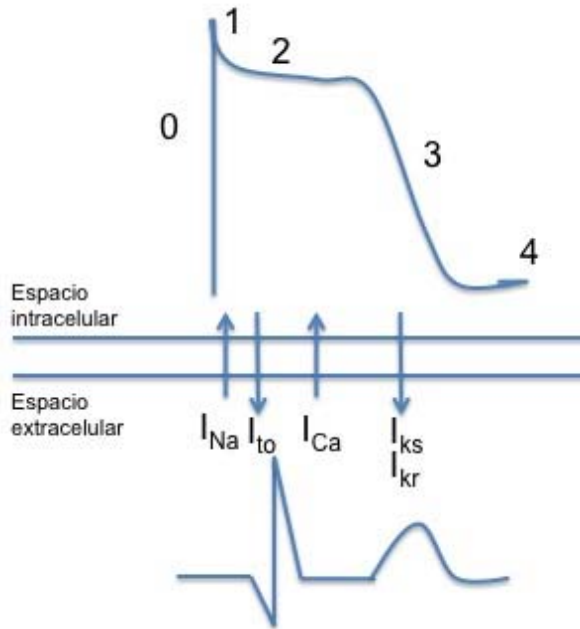


Figura 1.4: fases del potencial de acción: fase 0 = de entrada rápida de la corriente despolarizadora de sodio, fase 1 de repolarización parcial, fase 2 o de "plateau" dependiente del calcio, fase 3 o de repolarización dependiente de K y fase 4 o potencial de reposo. Abajo se muestra su correspondencia con el electrocardiograma de superficie.

Los errores en el balance entre despolarización y repolarización son arritmogénicos, produciéndose por dos mecanismos fundamentalmente explicados en el apartado previo: la actividad desencadenada que provoca despolarizaciones precoces o tardías por disturbios en el calcio intracelular y dispersión temporal y espacial de la refractariedad que genera gradientes eléctricos y múltiples reentradas capaces de degenerar en FV.

Estos errores están causados por mutaciones genéticas de los genes responsables de las proteínas integrantes de los canales iónicos. Se han descrito numerosas mutaciones en múltiples genes afectando al funcionamiento de los canales de sodio, potasio y calcio. Estos defectos genéticos se traducen en canales con aumento o defecto de su función, provocando corrientes anómalas que muestran alteraciones en el ECG de superficie y predisponen a arritmias ventriculares. Las canalopatías

cardíacas se reconocen clínicamente por la presencia de ciertas características en el ECG, si bien es cierto que no todos los pacientes portadores de mutaciones responsables de canalopatías tienen un ECG anormal porque la penetrancia clínica habitualmente es incompleta. Ello aumenta el valor diagnóstico del test genético, que puede ser la clave para alcanzar un diagnóstico en casos dudosos.²⁴⁻²⁶

Canales de sodio

La subunidad α de la isoforma cardíaca del canal de sodio se denomina Nav1.5 y está codificada por el gen SCN5A. Nav1.5 es una proteína que contiene 2015 residuos aminoacídicos y que consta de cuatro dominios, conocidos como DI hasta DIV, un extremo carboxiterminal y otro extremo aminoterminal. Cada dominio contiene seis hélices transmembrana (S1 a S6).²⁷ Un malfuncionamiento de esta subunidad está implicado en algunos de los principales síndromes arrítmicos primarios.²¹ Entre otras, cuatro patologías han sido relacionadas con mutaciones en el gen SCN5A: el SB, el SQTl tipo 3, el Síndrome de Lev-Lenègre (enfermedad hereditaria del sistema de conducción cardíaco) y la fibrilación auricular (FA).

Como se mencionó anteriormente, las subunidades auxiliares juegan un papel fundamental en la regulación del buen funcionamiento del canal. De ellas, la subunidad SCN4B ha sido relacionada con el SQTl tipo 10,²⁸ mientras que la SCN3B y SCN1B se han descrito asociadas a SB y enfermedad del sistema específico de conducción.^{29,30}

Canal de potasio

Los canales de potasio más relevantes en las enfermedades cardíacas son los que generan la corriente repolarizadora rectificadora tardía lenta y rápida (I_{Ks} y I_{Kr}). Las subunidades α de las isoformas cardíacas de estos dos canales de potasio se conocen como KCNQ1 y KCNH2 o hERG, respectivamente.³¹ Ambos genes se encuentran implicados en los subtipos principales de SQTl: el tipo 1 y el tipo 2 respectivamente.

Los canales de potasio cardíacos constan de una subunidad principal α que tiene seis dominios transmembrana (S1-S6): los cuatro primeros son sensores voltaje-dependientes y del S4 a S6 forman el poro. Esta unidad central es regulada por algunas subunidades auxiliar, las más importantes de las cuáles son KCNE1 para el canal KCNQ1 y KCNE2 para el canal KCNH2. Mutaciones en estas subunidades también se han descrito como causantes de SQT (ver tabla). De los canales de potasio cardíacos el más ampliamente estudiado es hERG. El nombre hERG viene dado por “*human ether-a-go-go related gene*” por la descripción en moscas *Drosophila melanogaster* con este gen mutado que presentaban unas sacudidas características.

En general, los canales de potasio cardíacos son voltaje-dependientes y son fundamentales en la fase 3 del potencial de acción ventricular. Mutaciones en estos genes que causen pérdida de su función y reducción de la corriente repolarizadora de potasio prolongan el potencial de acción y el intervalo QT y predisponen a “*torsade de pointes*” y MSC.

Canal de calcio

La subunidad α de los canales de calcio voltaje dependientes se denomina Cav1.2 y está codificada por el gen CACNA1C. Consta de 2221 aminoácidos y la topología es similar a Nav1.5: tiene cuatro dominios y seis hélices transmembrana en cada uno de ellos. Por otra parte, el gen RyR2, que codifica la ryanodina, y el gen CASQ2, que codifica la calsequestrina, se localizan en el retículo sarcoplásmico y están implicados en la liberación de calcio durante la fase 2 del potencial de acción implicada en la contracción sarcomérica. El papel de los canales de calcio en los síndromes arrítmicos primarios ha sido demostrado tan solo recientemente, siendo la principal patología causada la TVCP.³²

I.III.1 SINDROME DE QT LARGO

El SQTl se caracteriza por una excesiva prolongación de la repolarización ventricular y riesgo incrementado de arritmias malignas y MSC en pacientes con un corazón estructuralmente normal.³³ La prevalencia estimada es entre 1:2500 y 1:5000, aunque puede estar infraestimada por la elevada prevalencia de pacientes con intervalo QTc normal y por la no detección de sujetos asintomáticos.^{25, 34,35} La edad media en el debut de los síntomas es de 12 años y la presentación más temprana se asocia a una peor evolución.³⁶

Fue descrito clínica y electrocardiográficamente en 1957 por Anton Jervell y Fred Lange Nielsen en una familia con sordera congénita y alta prevalencia de MS,³⁷ aunque el diagnóstico se realiza de acuerdo con los criterios de Schwartz, publicados en 1985 y modificados en 1993 (tabla 1.1).³⁸

La presentación junto a sordera congénita se denomina Síndrome de Jervell-Lange-Nielsen y se debe a una mutación homocigota; conlleva peor pronóstico que la variante heterocigota, que es la más frecuente y se denomina Síndrome de Romano-Ward. Esta última no asocia sordera neurosensorial. En ambos casos se produce disfunción de los canales iónicos implicados en la despolarización y repolarización ventricular, de sodio y potasio respectivamente, con la consiguiente prolongación de la repolarización y predisposición a arritmias ventriculares, síncope y MSC.

Criterio diagnóstico		Puntos
Hallazgos ECG	QTc calculado mediante la fórmula de Bazett * >480 ms.	3
	460-470 ms.	2
	450 ms (varones)	1
	Torsade de Pointes	2
	Alternancia de la onda T	1
	Onda T bífida en 3 derivaciones	1
	Frecuencia cardíaca basal inferior a 2 centiles de lo correspondiente para la edad	0,5
Historia clínica	Síncope Con estrés	2
	Sin estrés	1
	Sordera congénita	0,5
Historia Familiar *1	Familiares de primer grado con SQTL definitivo por Criterios de Schwartz	1
	Familiares de primer grado con muerte súbita antes de los 30 años	0,5

Tabla 1:1 Criterios diagnósticos del SQTL (< 1, baja probabilidad; 2-3, probabilidad intermedia; > 4, probabilidad alta de SQTL)

*: en ausencia de fármacos o trastornos que puedan prolongar el intervalo QTc

*1: el mismo familiar no puede contabilizarse dos veces

Clínica y genética del SQTL

En 1995 se describieron los genes principalmente implicados en el desarrollo de SQTL.^{39,40} Desde entonces se han descrito más de 500 mutaciones y cientos de polimorfismos en trece genes codificantes de proteínas relacionadas con los canales iónicos. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones en las series amplias publicadas

hasta la fecha se concentran en tres genes: *KCNQ1*, que codifica el canal de potasio y la corriente I_{Ks} , *KCNH2* o *HERG*, que codifica un canal de potasio y su corriente rápida I_{Kr} , y *SCN5A* que codifica un canal de sodio. Estos genes explican el 90 % de los casos con genotipo positivo, siendo el más frecuente *KCNQ1* (tabla 1.2). Las mutaciones que afectan I_{Kr} y I_{Ks} producen un descenso en la corriente de potasio mientras que las mutaciones en *SCN5A* que causan SQT1 tipo 3 aumentan la función del canal y prolongan el potencial de acción al aumentar la corriente despolarizadora de sodio. Estas primeras tres variantes fueron llamadas SQT1, SQT2 y SQT3. Posteriormente se han descrito diez genes más que explican una proporción muy baja de casos, incluso en algunos casos limitados a casos aislados.

La prevalencia de mutaciones genéticas en pacientes con SQT oscila entre el 60 y el 70 %. Dado que la gran mayoría se localizan en los tres primeros, un abordaje que incluya todos los genes descritos no es eficiente. El análisis de de los hallazgos electrocardiográficos junto a la clínica e historia familiar puede ayudar en la orientación del test genético. De hecho la probabilidad de obtener un resultado positivo es mayor cuanto más claro es el fenotipo de los pacientes, reforzando la idea de guiar el estudio genético de acuerdo a los hallazgos fenotípicos.

Subtipo	Gen	Proteína	Efecto funcional	Prevalencia (%)
SQTL1	KCNQ1	Subunidad α de canal de Kv7.1	↓	30-35
SQTL2	KCNH2	Subunidad α de canal de Kv11.1	↓	25-30
SQTL3	SCN5A	Subunidad α de canal de Na1.5v	↑	5-10
SQTL4	ANK2	Ankirina B	↓	<1
SQTL5	KCNE1	Subunidad beta del canal de K7v.1	↓	<1
SQTL6	KCNE2	Subunidad beta del canal de Kv11.1	↓	<1
SQTL7	KCNJ2	Kir2.1	↓	<1
(Andersen-Tail yndrome)				
SQTL8	CACNA1	Cav1.2 (canal de calcio)	↑	<1
(Timothy Syndrome)	c			
SQTL9	CAV3	Caveolina	↑	<1
SQTL10	SCN4B	Subunidad beta 4 de canal de Na	↑	<1
SQTL11	AKAP9	Proteína a-kinasa	↓	<1
SQTL12	SNTA1	Syntrofina	↑	<1
SQTL13	KCNJ5	Kir3.4	↓	<1

Tabla 1.2: Subtipos de SQTL en función del gen mutado.

La definición del subtipo genético tiene gran importancia en el SQTL por varios motivos. Todos ellos tienen como característica común la prolongación del intervalo QT y la predisposición a MS por arritmias ventriculares. Sin embargo, es la canalopatía donde mejor se ha demostrado una buena correlación fenotipo-genotipo, con una expresión electrocardiográfica típica de cada uno de los subtipos, una diferencia en el riesgo de eventos arrítmicos en función del sustrato genético, así como unos desencadenantes característicos de arritmias y una diferente respuesta al tratamiento médico con betabloqueantes.

- Síndrome de QT largo tipo 1: Los pacientes con SQTL1 presentan episodios de síncope y MSC al realizar ejercicio o bajo situaciones de estimulación adrenérgica;⁴¹ la natación se ha descrito como un desencadenante típico de arritmias en el SQTL.⁴² El fenotipo electrocardiográfico descrito como más típico es una base muy ancha de la onda T con una duración muy prolongada.^{43,44} (figura 1.5). Es el subtipo más frecuente y explica 30-35% de los casos. Son los casos que mejor responden al tratamiento con betabloqueantes hasta el punto de reducir prácticamente a 0 la incidencia de nuevos eventos.

- Síndrome de QT largo tipo 2: Es el segundo en frecuencia en las series publicadas hasta la fecha con una prevalencia en torno al 20-25 % de los casos con genotipo positivo. Los desencadenantes típicos de arritmias ventriculares y MSC son los estímulos auditivos y el estrés emocional.^{41,45} El ECG suele mostrar una onda T bifida, de baja amplitud y con muescas (figura 1.5).

- Síndrome de QT largo tipo 3: es el tercero en prevalencia mutacional. Los eventos arrítmicos son menos frecuentes que en los dos previos, pero característicamente son más letales.³⁶ El desencadenante más habitual de arritmias es el reposo, sueño o situaciones vagales, y el ECG suele mostrar un intervalo ST largo plano con onda T final picuda de baja amplitud (figura 1.5).

- Síndromes de QT largo 4 a 13: los genes responsables de su etiología codifican en general proteínas auxiliares de los canales de potasio, sodio e incluso calcio. Algunos de ellos, como el SQT18 o Síndrome de Timothy,⁴⁶ se asocian a graves malformaciones cardíacas, autismo y sindactilia. Interesantemente, la mayoría (más del 90 %) de los pacientes con Síndrome de Timothy presentan la misma mutación (G406R). El SQT17 o Síndrome de Andersen también asocia fenotipo extracardiaco con parálisis periódica y dismorfias. Los SQT1 tipos 5 y 6 se originan por mutaciones en genes que codifican subunidades auxiliares del canal de K, y están localizados en el cromosoma 21.

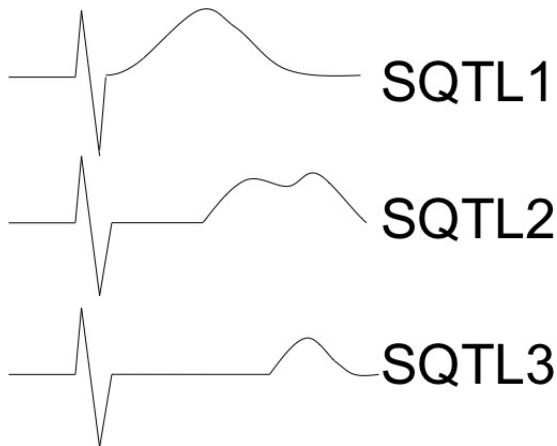


Figura 1.5: Fenotipo electrocardiográfico característico de los tres subtipos de SQT1 más prevalentes.

Como se ha mencionado anteriormente, el diagnóstico de SQT1 se basa en los criterios diagnósticos recogidos en la tabla 1.1. Dichos criterios tienen en cuenta datos electrocardiográficos, datos clínicos y datos de la historia familiar. El ECG es fundamental en su diagnóstico y no sólo se limita a la longitud del intervalo QTc. Obviamente existe una relación lineal entre el intervalo QTc y la probabilidad de

padecer SQTl, pero existen otros datos que orientan al diagnóstico de SQTl y deben ser tenidos en cuenta

- la detección en algún registro de taquicardia ventricular “*torsade de pointes*” es muy característico de SQTl congénito o adquirido

- la alternancia de la onda T se define como la variación latido a latido de la amplitud, la morfología y la polaridad de la onda T en ritmo sinusal. Es un indicador de inestabilidad eléctrica, refleja dispersión regional en la repolarización ventricular y en ocasiones precede a la fibrilación ventricular⁴⁷

- la bradicardia es un dato indirecto, así como el bloqueo aurículo-ventricular 2:1, sobre todo en caso de SQTl tipo 3.

Sin embargo, desde hace años se viene documentando la penetrancia incompleta en el ECG no solo del SQTl, sino de todas las canalopatías. Esto significa que existen portadores de mutaciones causantes de SQTl que muestran un ECG de superficie normal.²⁵

El hecho de tener un ECG normal no los exime de padecer arritmias ventriculares o MSC.⁴⁸⁻⁵⁰. Por ello en ocasiones es necesario recurrir al desenmascaramiento del Síndrome con test de provocación farmacológico con epinefrina, apoyado en los casos dudosos en el test genético ya comentado. El test de epinefrina ha sido validado en numerosos estudios, si bien, a diferencia del Síndrome de Brugada, no está contemplado en los criterios diagnósticos actuales (tabla 1.1).³⁸ En el apartado “Fibrilación Ventricular Idiopática” se expone ampliamente la hipótesis fisiopatológica de la normalidad electrocardiográfica en portadores de mutación causante de canalopatías y la posible utilidad del abordaje combinado con test farmacológicos y genético en sujetos con canalopatías y baja penetrancia clínica.

Estratificación de riesgo y manejo clínico en el SQTl: papel de la genética

El manejo de los pacientes incluye evitación de fármacos que prolonguen en intervalo QT (www.qtdrugs.org) y el deporte de competición. La terapia médica es la

primera línea de tratamiento profiláctico. Los pacientes con paro cardíaco recuperado y aquéllos con síncope y/o “*torsade de pointes*” a pesar de tratamiento con betabloqueantes deben recibir un desfibrilador automático implantable.³⁶ Los sujetos con síncope que no estuviesen recibiendo tratamiento son candidatos a tratamiento con betabloqueantes ya que han demostrado reducir la incidencia de eventos arrítmicos de manera significativa, especialmente en los subtipos 1 y 2, que son los más prevalentes.^{51,52}

La estratificación del riesgo está basada predominantemente en datos del Registro Internacional del SQTl. Los mejores predictores de eventos son el sexo femenino en edad adulta, que también ha demostrado peor respuesta a betabloqueantes;⁵¹ el intervalo QTc por frecuencia cardíaca > 500 milisegundos y el haber padecido síncope o paro cardíaco previo. Un solo episodio de síncope se ha asociado con un riesgo seis veces mayor de MSC.⁵³ El riesgo debe ser evaluado de forma continua y considerar las diferencias en sexo y género, teniendo en cuenta que los varones en la adolescencia y las mujeres en edad adulta tienen una mayor incidencia de eventos. Así, en el trabajo de Priori y colaboradores proponen una pirámide de riesgo arrítmico en la que los sujetos de mayor riesgo son aquellos con paro cardíaco previo y síncope o “*torsade de pointes*” a pesar de tratamiento con betabloqueantes, seguido de sujetos con intervalo QTc > 500 milisegundos, e inicialmente se propuso el genotipo SQTl1 o SQTl2, así como varones con SQTl3.³⁶

Por lo tanto, el papel del genotipo en la predicción del riesgo arrítmico está ganando importancia. Un estudio reciente de portadores de mutaciones con intervalo QTc normal mostró un riesgo 10 veces mayor que en sujetos no portadores.⁴⁹ Estudios posteriores al de Priori mostraron que, tras ajustar por factores clínicos, no había diferencias significativas en cuanto al riesgo según el genotipo subyacente, con la excepción de varones adolescentes con SQTl1 y mujeres adultas con SQTl2.⁵³

Asimismo, el estudio genético ha demostrado poder predecir el curso clínico en función de las características de la mutación hallada y su repercusión en la proteína y

las propiedades electrofisiológicas del canal.⁵⁴ En un futuro es esperable una mayor capacidad del estudio genético para predecir los eventos arrítmicos a medida que la información disponible y nuevos estudios de correlación genotipo-fenotipo estén disponibles.

I.III.2 SINDROME DE BRUGADA

El SB es una canalopatía que muestra un patrón característico en el ECG, con elevación del segmento ST en precordiales derechas con o sin bloqueo de rama derecha asociado, en ausencia de cardiopatía estructural, y que predispone a arritmias ventriculares y MS. Fue descrito en 1992 y desde entonces son numerosos los trabajos destinados a la búsqueda del sustrato genético y sobre todo a la estratificación del riesgo arrítmico.^{55,56}

El ECG es la técnica diagnóstica fundamental para realizar el diagnóstico. En este sentido, en los criterios diagnósticos actuales se exige la presencia del patrón tipo 1 con la típica morfología en aleta de tiburón, en al menos dos derivaciones desde V1 a V3 y de al menos 2 mm de magnitud (figura 1.6).

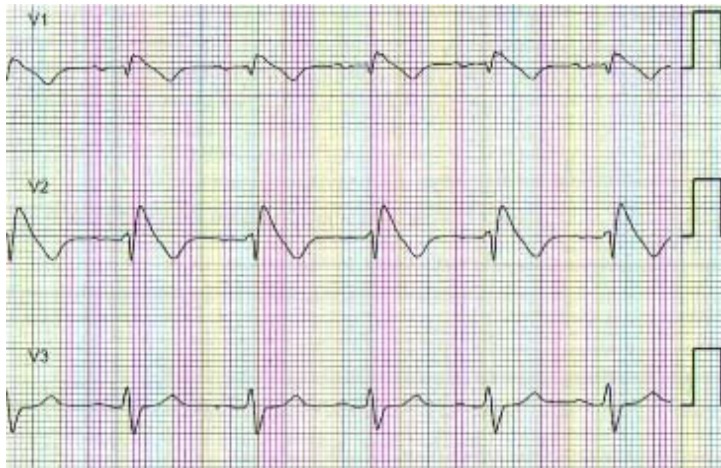


Figura 1.6: Patrón tipo de Brugada: obsérvese la morfología típica en al menos dos derivaciones (en este caso V1 y V2) y de más de dos mm.

Este patrón tipo 1 puede ser intermitente, o alternarse con la aparición de patrón tipo 2 o tipo 3 que no se consideran diagnósticos actualmente. En casos de alta sospecha por la presencia de patrón tipo 2 o 3 o por la historia personal o familiar se

puede desenmascarar el patrón tipo 1 mediante el bloqueo de los canales de sodio con la administración intravenosa de ajmalina, flecainida o procainamida.^{57,58}

La prevalencia estimada es del 0,10 %, siendo mayor en áreas del Sudeste Asiático, donde es endémico.⁵⁹ La mayoría de los pacientes son varones.⁵⁶ Aunque la edad media de presentación de eventos es de 40 años, el SB puede afectar a cualquier edad, teniendo hasta un 20-50 % de los afectados historia familiar de MSC. La enfermedad exhibe un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia variable.

La manifestación clínica más común del SB es el síncope y la MSC por arritmias ventriculares, en general desencadenadas por el sueño, el reposo o situaciones vagales. Otros desencadenantes típicos son la fiebre y comidas copiosas. Aparte de la típica manifestación del patrón electrocardiográfico característico, la prolongación del intervalo PR y cierto grado de retraso de la conducción intraventricular pueden observarse en el SB.⁶⁰

El diagnóstico se realiza según los criterios publicados en 2005 y que se muestran en la tabla 1.3.⁵⁶ Éstos exigen la presencia del patrón de Brugada tipo 1 (figura 1.6) espontáneo o en respuesta a la infusión intravenosa de un bloqueante de los canales de sodio intravenoso. Se exige su presencia en al menos dos derivaciones precordiales derechas, si bien estudios posteriores ponen de manifiesto la alta proporción de pacientes con SB y elevación de ST en tan sólo una derivación.⁶¹ Además es conocida su penetrancia variable, lo que significa que es frecuente padecer la enfermedad y no mostrar alteraciones en el ECG.

Criterio ECG	Uno de los siguientes debe estar presente
Patrón de Brugada tipo 1 en 2 o más derivaciones (V1 a V3), 2 o más mm* *: en presencia o ausencia de un bloqueante de canales de Na	FV documentada TV polimórfica documentada Historia familiar de muerte súbita en < 40 años Patrón ECG tipo 1 en familiares directos TV inducible en EEF Síncope Respiración agónica nocturna

Tabla 1.3: Criterios diagnósticos del SB (FV: Fibrilación Ventricular; TV: Taquicardia Ventricular; EEF: estudio electrofisiológico).

Patofisiología y genética del SB

Se han demostrado 7 genes implicados en el SB, si bien el que se asocia como más fuerza hasta la fecha es SCN5A. La mutaciones en SCN5A, que codifica la subunidad α del canal de sodio (Nav1.5) se identifican en alrededor del 20-25 % de los pacientes.⁶² Otros genes que se han relacionado con el SB, con mucha menor frecuencia, son el CACNA1c, CACNB2 y CACNA2D1, reguladores de canales de calcio.⁶³ Otros genes codificantes de proteínas auxiliares como el GPD1L, el SCN1B y el SCN3B se han identificado en escasos pacientes.

Estudios in vitro han demostrado una pérdida de función del canal debido a escasez de expresión (tráfico) de los canales a la membrana celular o cambios en las propiedades funcionales (apertura y cierre), resultados en una reducción de la corriente despolarizadora de sodio (I_{Na}).

La mayoría de los SB permanecen genéticamente no identificados, e incluso parece haber un solapamiento con otros canalopatías como el SQTC y la

repolarización precoz. Incluso hay evidencia de ciertos cambios estructurales en el tracto de salida del ventrículo derecho que pueden dar lugar a mostrar el fenotipo Brugada en el ECG. Por ello se ha sugerido que el SB pudiera ser un marcador de ciertas cardiopatías del ventrículo derecho, siendo la más frecuentemente asociada la displasia arritmogénica del ventrículo derecho.⁶⁴

Estratificación del riesgo y manejo clínico del SB

El manejo clínico de SB incluye evitar fármacos que bloqueen canales de sodio y que pueden exacerbar la condición (www.brugadadrugs.org) , así como el uso de antiarrítmicos de forma precoz para evitar los picos febriles. Hasta la fecha, el único tratamiento eficaz para reducir la MSC es el implante de un DAI. La quinidina, un antiarrítmico de clase I que bloquea la corriente I_{to} de la fase 1 del potencial de acción parece suprimir las arritmias ventriculares en pacientes de alto riesgo.⁶⁵ Actualmente se puede utilizar como terapia añadida al DAI en sujetos de alto riesgo con descargas frecuentes apropiadas.

La estratificación del riesgo es todavía motivo de debate. Hay acuerdo general en que los pacientes con síncope o paro cardíaco previo deben recibir un DAI.⁵⁶ Sin embargo, la mayoría de pacientes que sufre un paro cardíaco estaban previamente asintomáticos, y en sujetos asintomáticos la tasa de eventos es muy baja, hechos que parecen contradictorios.⁶⁶⁻⁶⁹ Los pacientes varones y aquéllos con patrón de Brugada tipo 1 espontáneo parecen estar expuestos a un riesgo arrítmico mayor.⁵⁶ Aunque la inducibilidad de arritmias ventriculares mediante el estudio electrofisiológico se ha propuesto y empleado durante muchos años para estratificar el riesgo un meta-análisis no consiguió demostrar su utilidad.⁷⁰ En otros estudios se ha sugerido que la presencia de mutaciones en SCN5A pudiera ser un marcador de riesgo respecto a los pacientes con genotipo negativo, si bien esto se ha descartado en los grandes estudios prospectivos con seguimiento a largo plazo, como son los FINGER y PRELUDE.^{66,71} Parece ser que el presentar mutaciones en SCN5A acorta el tiempo hasta presentar una recurrencia arrítmica respecto a aquellos que no tienen mutación

identificada⁷² y que las mutaciones que truncan la proteína alargan más el QRS y el intervalo PR que aquéllas que cambian un aminoácido por otro (*missense*).⁷³

Desafortunadamente, muchos de los pacientes caen en una situación de riesgo intermedio, en la que están asintomáticos y son varones con patrón de Brugada tipo 1 espontáneo. Para esta situación no hay tratamiento médico ni está indicada actualmente la terapia con el DAI. Por ello es esencial la búsqueda de nuevos marcadores y un mejor conocimiento de la enfermedad para una mejor estratificación del riesgo.

A diferencia de lo que ocurre en otras canalopatías como el SQT_L, la prevalencia mutacional es tan baja y la información genética es de tan escasa ayuda para estratificar el riesgo que un estudio genético rutinario de los genes implicados no se aconseja en todos los pacientes. Como consecuencia de ello, actualmente el gran beneficio del estudio genético es detectar portadores silentes.

I.III.3 TAQUICARDIA VENTRICULAR CATECOLAMINÉRGICA POLIMÓRFICA

La TVCP es una canalopatía que se caracteriza por producir síncope, arritmias ventriculares (taquicardia ventricular bidireccional y FV) y MSC usualmente secundarias a un estímulo adrenérgico intenso como el estrés físico o emocional.¹⁹ La taquicardia ventricular es bidireccional, lo que significa que existe una rotación de 180 ° del eje del QRS de latido a latido, a diferencia de la “*torsade de pointes*” en que la rotación era durante la secuencia de la taquicardia alrededor de un eje imaginario.

La prevalencia estimada es de 1:7000 a 1:10.000. Es una de las más letales canalopatías con una historia natural de MSC en hasta el 30 % de antes de la edad de 40 años en ausencia de medicación antiadrenérgica. El ECG es poco expresivo, lo que significa que el diagnóstico debe sospecharse ante síncope tras esfuerzo físico o situaciones de estrés y confirmarse con la detección de arritmias ventriculares típicas durante una prueba de esfuerzo, test de epinefrina o registro Holter. La prueba de

esfuerzo típica de estos pacientes muestra progresiva extrasistolia politópica cada vez de mayor densidad hasta que se instaura la taquicardia ventricular.⁷⁴

El patrón de herencia puede ser autosómico dominante o recesivo. Aproximadamente el 60 % de los probandos es portador de una mutación en el gen de la ryanodina (RyR2) que se transmite de forma autosómica dominante. El genotipado de la ryanodina es complejo pues es uno de los genes más largos de todo el genoma humano. Las mutaciones en el gen de la calsequestrina (CASQ2) son la causa de la enfermedad en un número reducido de casos y se transmite de forma autosómica recesiva. Ambos, la ryanodina y la calsequestrina, están implicados en la homeostasis intracelular del calcio y en el acoplamiento excitación-contracción. La liberación de calcio del retículo sarcoplásmico se exagera durante el estímulo adrenérgico, causando excesos de calcio y despolarizaciones tardías. Al parecer el mecanismo que explica la taquicardia ventricular bidireccional es actividad desencadenada desde el sistema de Purkinje.^{75,76}

Cuando el diagnóstico de TVCP se ha realizado el primer paso es evitar deporte de alta competición, evitar el uso de fármacos estimulantes adrenérgicos y empezar tratamiento con betabloqueantes a dosis óptima para controlar las arritmias durante el ejercicio. Aunque la protección que confieren los betabloqueantes es muy alta, algunos datos sugieren que la evolución puede ser fatal a pesar de la terapia médica.^{74,77} El DAI está reservado a pacientes con paro cardíaco previo y síncope y/o arritmias ventriculares a pesar de tratamiento betabloqueante. Otras posibles opciones terapéuticas incluyen la simpatectomía, verapamil o flecainida.

Una aproximación diagnóstico-terapéutica inicial debe incluir dos consideraciones importantes: el hecho de que el 20 % de los casos no presentan fenotipo característico y que la MSC puede ser la presentación inicial en el 60 % de los casos.⁷⁴ Por ello hay que considerar la TVCP como una potencial causa de FVI y el estudio genético está justificado para ella en casos de FVI.^{26,78}

I.III.4 SÍNDROME DE QT CORTO

Esta canalopatía es la de más reciente descubrimiento. En el año 2000, Gussak y colaboradores identificaron esta nueva entidad arritmogénica caracterizada por un intervalo QT más corto de lo habitual (< 360 milisegundos), predisposición a arritmias ventriculares y MSC. A pesar de ser de reciente descripción y la escasez de series amplias publicadas se reconoce que esta patología tiene una letalidad alta ya que suele manifestarse como MSC como primer síntoma.

Los genes implicados en su génesis son eminentemente los mismos que para el SQT. Recientemente se ha publicado el trabajo más amplio hasta la fecha en el que se verifica el mal pronóstico de la enfermedad, especialmente en pacientes sintomáticos, y se postula el posible beneficio de la hidroquinidina como prevención de arritmias ventriculares.⁷⁹ Por su escasa prevalencia, el SQT no forma parte de los objetivos de esta tesis doctoral.

I.III.5 FIBRILACIÓN VENTRICULAR IDIOPÁTICA

La FVI en ausencia de cardiopatía estructural demostrable es una entidad infrecuente dado que los estudios complementarios cada vez más amplios permiten llegar al diagnóstico final en más casos.²⁶ Entre estos diagnósticos se encuentran miocardiopatías con baja expresividad clínica y canalopatías subclínicas con poca expresión fenotípica en electrocardiograma de superficie debido a baja penetrancia genética.⁸⁰ Estas últimas pueden ser difíciles de diagnosticar en caso de no mostrar los típicos hallazgos electrocardiográficos o ser poco aparentes. Además, debido a que los hallazgos electrocardiográficos son con frecuencia de aparición intermitente⁸¹ es necesario recurrir a tests farmacológicos y otras maniobras para desenmascarar la enfermedad subyacente.

El diagnóstico de FVI se realiza por exclusión, una vez completadas una serie de pruebas diagnósticas sin hallazgo patológico que explique la situación de parada cardíaca sufrida por el paciente. Estas pruebas incluyen:

- Un electrocardiograma basal en ritmo sinusal y sin alteraciones de la conducción, isquemia, intervalo QTc (fórmula de Bazet) mayor de 360 ms y < 440 milisegundos en varones y < 460 milisegundos en mujeres y ausencia del patrón del Síndrome de Brugada (SB) tipo 1 en derivaciones precordiales derechas.
- Un ecocardiograma transtorácico que muestra normalidad en diámetros, grosor de paredes y fracción de eyección de ambos ventrículos, sin alteraciones anatómicas ni funcionales en válvulas
- Una angiografía coronaria o prueba de imagen alternativa que no muestre anomalías coronarias ni lesiones coronarias ateroscleróticas
- Ausencia de causas reversibles para la FVI como trastornos iónicos, trauma o intoxicación por fármacos.

La realización de los test farmacológicos con epinefrina o flecainida y la prueba de esfuerzo convencional están cobrando importancia recientemente para la detección de canalopatías subclínicas como el SQTl, SB y la TVCP respectivamente.⁷⁸

A pesar de todas estas incorporaciones diagnósticas no son infrecuentes los casos de fibrilación ventricular en los que no se llega a saber la etiología de la misma. Así, en los estudios de Kranh et al ^{26,78} el porcentaje de pacientes con FVI tras un exhaustivo protocolo diagnóstico seguía siendo del 33 y 44 % respectivamente. Recientemente se ha postulado por el grupo de Haissaguerre y colaboradores otra posible etiología de la FVI: el Síndrome de repolarización precoz⁸², consistente en una morfología característica del segmento ST con onda J prominente y elevación cóncava de ST en derivaciones inferolaterales.

La figura 1.7 resume el proceso diagnóstico empleado en dichos estudios y aconsejado por las Guías de Práctica Clínica ante un caso de Fibrilación Ventricular de etiología incierta. Como se puede apreciar, los protocolos actuales aconsejan un examen inicial con pruebas como el ecocardiograma y la angiografía coronaria para descartar las causas más frecuentes de arritmias ventriculares, que son la cardiopatía

isquémica y las miocardiopatías. Una vez descartadas ambas es cuando nos enfrentamos a la “Muerte Súbita en el Corazón Estructuralmente Normal”, que en el caso de paciente correctamente reanimado se denomina FVI.⁸³ Como se ha comentado anteriormente, las canalopatías de origen genético como el SQTL, SB y TVCP juegan un papel fundamental en el origen de muchos de estos casos de FVI.

Dado que se trata de trastornos con base genética con penetrancia incompleta, es posible que la expresión fenotípica este ausente en ECG e incluso tras test farmacológicos, lo que explica que se puede padecer cualquiera de estas tres enfermedades e incluso sufrir arritmias ventriculares que causen un paro cardíaco, y a pesar de ello no se alcance el diagnóstico con los tests convencionales. Es por ello, que el estudio genético se postula como una prueba clave en el abordaje de estos pacientes, si bien hasta la fecha los trabajos publicados al respecto son pocos y con escaso tamaño muestral.²⁶

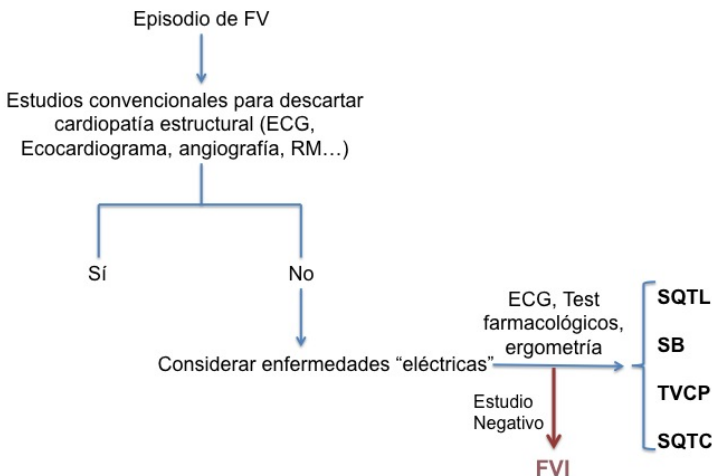


Figura 1.7: Esquema propuesto para el diagnóstico de la FV, llegándose a FVI una vez excluidas todas las causas conocidas de parada cardíaca

El registro CASPER²⁶, publicado por Khran y colaboradores en 2009 en *Circulation*, es la serie más extensa de FVI y demostró que empleando el protocolo indicado en la figura 1.7 asociado a secuenciación genética de los genes KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2 y RyR2, se alcanzaba el diagnóstico final en un 56 % de los casos (n=63). De ellos, tan sólo se realizó test genético en 19 pacientes, ya que en la metodología de este estudio la secuenciación genética sólo se realizaba de forma dirigida en función de los hallazgos fenotípicos. En 9 de estos 19 pacientes el test genético fue determinante para la consecución del diagnóstico, encontrando 7 nuevas mutaciones *missense* con alta probabilidad patogénica para canalopatías (2 en KCNH2, 3 en SCN5A y 2 en RyR2). El resultado es que nada menos que el 44 % de pacientes permanecieron sin diagnóstico final. Es posible que una proporción de estos pudiera estar en relación con canalopatías subclínicas posiblemente detectables si la evaluación genética hubiese sido sistemática y no guiada por el fenotipo. Otra limitación del estudio es que no realizaron una evaluación sistemática de familiares como parte del protocolo diagnóstico. Tan solo se estudiaron a los familiares directos una vez alcanzado un diagnóstico en el caso índice. Estudios recientes han demostrado que el diagnóstico final se podría alcanzar con la evaluación sistemática de familiares de primer grado mediante test convencionales básicos y ampliada con estudios más amplios de forma dirigida en función de los hallazgos fenotípicos.⁸⁴

Patofisiología de las canalopatías subclínicas

Durante muchos años se consideró que todo paciente que sufría un SQTl o un SB debía presentar inequívocamente alteraciones electrocardiográficas propias (intervalo QTc prolongado en el SQTl y elevación de ST y punto J en V1-V3 en el SB). Ello equivalía a una penetrancia genética de casi el 100%, es decir, no se contemplaba la posibilidad de padecer la enfermedad si el ECG de superficie era normal^{85,86}. La penetrancia genética representa la probabilidad de que una persona con genotipo afectado por una mutación causal muestre alteraciones fenotípicas identificables. A raíz de varios trabajos, esta penetrancia casi cercana al 100 % que

implicaba una altísima sensibilidad del ECG de superficie, pasó a ser inferior al 90 % en la mayoría de familias, quedando demostrado por el hecho de que el 6 % de los miembros de una familia con SQTl portadores de mutación genética tenían un intervalo QTc normal y posteriormente desarrollaron síncope o parada cardíaca⁸⁷. Asimismo, en el trabajo de Priori y colaboradores analizaron a 9 familias con genotipo positivo en el caso índice pero sin más casos detectados en familiares.¹³ Detectaron que el intervalo QTc en familiares portadores de la misma mutación era significativamente inferior respecto a los casos índice, indicando así una gran variabilidad fenotípica en cuanto al valor del intervalo QTc.

La conclusión de este y otros trabajos posteriores es que existe una proporción de portadores genéticos que están asintomáticos, con ECG normal, pero en riesgo de sufrir arritmias ventriculares. En la figura 1.8 se aprecia el amplio margen del intervalo QTc en casos con genotipo positivo y el sustancial solapamiento con el valor en sujetos sanos.³³

La razón fisiológica por la cuál ocurre la encontramos en el concepto de “reserva de reopolarización”, término acuñado por Roden DM⁸⁸. Según este concepto, la repolarización miocárdica se lleva a cabo gracias a la intervención de múltiples tipos de canales cardíacos, principalmente de potasio, aportando un amplio margen de protección en caso de malfunción de alguno de ellos. Por lo tanto, en una situación ordinaria de correcto funcionamiento de todos estos canales la administración de un fármaco bloqueador de los canales de potasio o un hipopotasemia transitoria no daría lugar a prolongación del intervalo QTc ni a ningún problema arrítmico. En caso de mal función de algún subtipo de canal, el resto ejercerían un papel protector y la repolarización se llevaría a cabo sin mostrar alteración alguna en el ECG de superficie, si bien en situaciones de bloqueo de los canales de potasio se podría producir alargamiento del intervalo QTc y “*torsade de pointes*”.⁵⁰

Respecto al SB la explicación parece similar. Es conocido que el patrón de Brugada espontáneo o inducido por flecainida o ajmalina no posee una alta sensibilidad y es además variable en el tiempo. Es decir, es posible padecer la enfermedad y no mostrar hallazgo alguno en el ECG. La probabilidad de mostrar el patrón de Brugada tipo 1 en el ECG en pacientes genéticamente diagnosticados de SB oscila entre el 63 y el 85 % en los diferentes estudios (flecainida, ajmalina o procainamida)^{57,78}

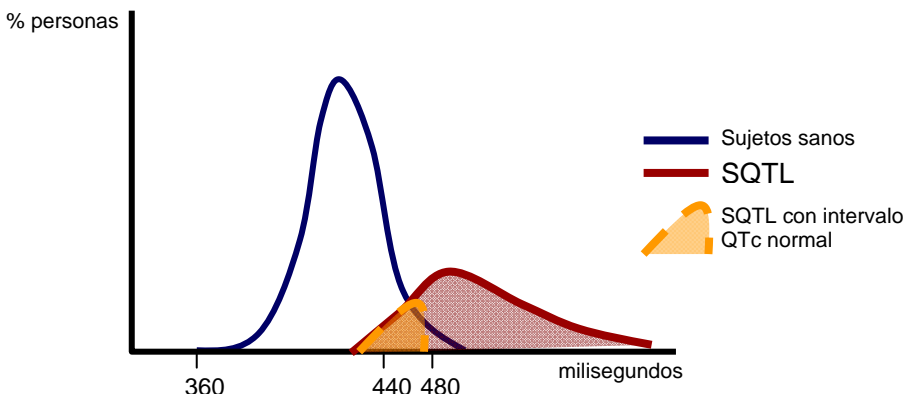


Figura 1.8: Esquema propuesto para la distribución del intervalo QTc en población con SQTL (área bajo la curva roja) y sujetos sanos (área bajo la curva azul). Nótese que existe una proporción relevante de pacientes con SQTL que presentan un intervalo QTc < 460-480 msec. (área bajo la curva amarilla)

Existen estudios que analizan la rentabilidad diagnóstica de un examen sistemático a estos pacientes con test farmacológicos, pero con bajo tamaño muestral. En el estudio publicado en 2005 por Khran y colaboradores⁵⁷, analizaron a 18 sujetos con FVI y demostraron la utilidad para desenmascarar 2 SB y 10 TVCP, pero ningún SQTL. En ningún de los casos con estudio negativo analizaron a los familiares directos como una posible herramienta diagnóstica, al igual que ocurrió en

el estudio de este mismo grupo publicado en 2009 (Registro CASPER)²⁶, como ya comentamos anteriormente.

I.IV: Bases generales de Genética cardiovascular

Todo organismo vivo tiene su propia información genética contenida en la molécula de Ácido desoxirribonucleico (ADN). En ella se encuentran las unidades de herencia, los genes. Los humanos tenemos 70.000 genes distribuidos en 23 pares de cromosomas localizados en el núcleo de las células (22 autosómicos y 1 par sexual) y un único cromosoma mitocondrial. Cada par de cromosomas (homólogo) tiene los mismos genes, de los que tenemos dos copias, denominadas alelos.⁸⁹ Cada gen contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína, la unidad funcional del organismo, ya que el buen funcionamiento de éste está basado en la síntesis perfecta de todas las proteínas necesarias.⁹⁰

La molécula de ADN está formada por cuatro tipos distintos de nucleótidos, repetidos millones de veces. Cada grupo de tres nucleótidos codifica un determinado aminoácido. Éste es un proceso en cadena; los primeros tres nucleótidos codifican el primer aminoácido y los tres siguientes el segundo, y así consecutivamente. Esta síntesis está determinada por el orden que sigue la secuencia de nucleótidos en el ADN. La acumulación progresiva de todos los aminoácidos del gen da lugar a la creación de la proteína. En el genoma humano se ha descrito que menos del 1,5% de éste contiene secuencias que codifican para proteínas.⁹¹ El resto es material que puede ayudar al correcto funcionamiento, pero su función no está claramente establecida aún.

En ocasiones se puede producir la inserción, delección o el cambio en el orden de los nucleótidos. Son defectos genéticos denominados mutaciones (figura 1.9); éstos pueden producir la síntesis de una proteína diferente o defectuosa y ocasionar una enfermedad. Que el individuo desarrolle o no una enfermedad a causa de la mutación depende de la importancia de la proteína en la función general del cuerpo humano. Si

la mutación afecta al ADN de una célula germinal o reproductiva, se transmitirá a las siguientes generaciones y causará una enfermedad hereditaria.

Mutación y polimorfismo

El ADN genómico nuclear es una entidad extremadamente variable, tanto entre individuos diferentes de la misma especie como de diferente especie. La diversidad o variabilidad genética se debe a variaciones en la secuencia del genoma; En general, todos los seres humanos presentan pequeñas variaciones en un lugar determinado del ADN, denominadas polimorfismos. Por tanto, en un sentido amplio, el concepto de diversidad se hace sinónimo de *polimorfismo* (en sentido literal, *muchas formas*). El polimorfismo afecta tanto a regiones codificantes del genoma (polimorfismo génico) como no codificantes (polimorfismo genético en general). En ambos casos puede consistir la variación desde un par de bases a millones de pares de bases. A diferencia de las mutaciones, los polimorfismos carecen de magnitud para producir enfermedades, pero pueden alterar la respuesta del individuo a ellas y producir variaciones en la predisposición, la evolución y la respuesta al tratamiento (figura 1.9).⁹² En general se puede resumir que el polimorfismo es una variación nucleotídica que no genera un cambio aminoacídico tal que ocasione un cambio en la funcionalidad proteica (figura 1.9). Sin embargo tienen relevancia ya que hay multitud de polimorfismos genéticos que condicionan un aumento en la probabilidad de padecer la enfermedad en una población concreta.

Una mutación se define como una alteración en la secuencia del ADN de una persona que se transmite por herencia a sus descendientes. La forma inalterada del ADN, llamada *salvaje* (*Wild Type*), se convierte así en otra forma llamada *mutante*. Las mutaciones tienen lugar en todo el genoma, incluyendo las secuencias codificantes o no, del genoma nuclear o mitocondrial, y tanto en las células germinales (heredable) como somáticas (no heredable).

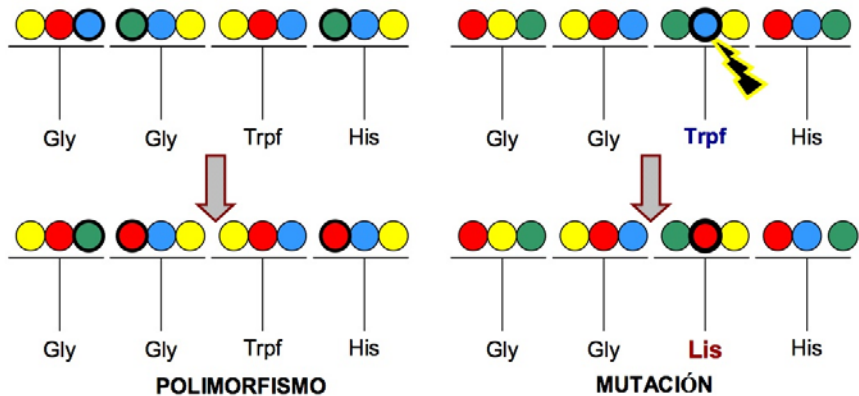


Figura 1.9: Esquema representativo del concepto de polimorfismo y mutación: la mutación condiciona un cambio aminoacídico y el polimorfismo no. (Cada círculo representa un nucleótido: adenosina, timina, guanina y citosina).

Aunque muchas mutaciones se generan al azar y existe la misma susceptibilidad de mutación en todas las regiones del genoma, las que ocurren sobre el ADN codificante (3 % del total) tienen peores consecuencias. Dentro de esta “mutación génica” se debe distinguir entre la de la región del gen directamente responsable de la información (región estructural) y la que ocurre en regiones no codificantes que influyen en la expresión (región reguladora). La importancia de las mutaciones génicas (en regiones codificantes del ADN) viene dada por la repercusión en la proteína sintetizada al producir un cambio de aminoácido en una posición concreta. El código genético establece qué aminoácido corresponde a cada triplete de nucleótidos.⁹³ Un cambio (mutación) en uno o varios nucleótidos generará un cambio de aminoácido que, en caso de afectar a la fisiología de la proteína sintetizada y alterar su funcionamiento, es susceptible de provocar la enfermedad en cuestión.

El estudio de las mutaciones en función de su magnitud, longitud o grado de lesión permite clasificarlas en pequeña, mediana y gran escala. Las anomalías a gran escala ocurren por duplicaciones, pérdidas o reagrupamientos que alteran una región

de millones de pares de bases y se reflejan en la estructura del cromosoma. Se llaman también mutaciones voluminosas o cromosómicas. Las mutaciones a pequeña escala, sencillas, puntuales, mínimas o micromodificaciones, implican normalmente a un solo nucleótido. Sin embargo, también se incluyen aquí aquellas otras lesiones a pequeña o mediana escala que implican a varios pares de bases.

Las mutaciones puntuales son las más frecuentes, tanto que a veces se asumen como el único tipo de mutación existente. La sustitución de un nucleótido por otro, que es el tipo de mutación más prevalente en las enfermedades hereditarias, pueden ser silenciosas o no silenciosas. Las mutaciones silenciosas (sinónimas o neutras) son muy numerosas y se caracterizan por no alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína sintetizada. Esto es posible debido a la degeneración del código genético, en el que varios tripletes codifican un mismo aminoácido. Obviamente las mutaciones silenciosas pasan inadvertidas pues no generan un cambio fenotípico. Sin embargo, pueden generar una gran diversidad genética en una población al actuar como polimorfismo genético.

En el caso de las mutaciones silenciosas se produce un cambio fenotípico debido a la repercusión del cambio nucleotídico en el producto proteico. Este efecto puede ser beneficioso o perjudicial. El efecto beneficioso es infrecuente, por lo que nos vamos a centrar en las que conllevan efecto perjudicial en la proteína, que son las más frecuentes y las responsables de la mayor parte de las enfermedades hereditarias.

El hecho de presentar una mutación que implique un cambio en la secuencia aminoacídica no conlleva necesariamente que la mutación sea causal, es decir, que altere las propiedades electrofisiológicas del canal iónico y provoque la canalopatía. En el ámbito de la cardiogenética hay que tener en cuenta que la mayoría de las mutaciones halladas no están previamente descritas, lo que se denomina “*mutaciones privadas*”. Cuando nos enfrentamos a una mutación nueva es esencial realizar una correcta interpretación de su significado y posibles consecuencias fisiopatológicas.

Recientes artículos aportan claves para catalogar una mutación como patógena o no patógena, tales como la zona del canal afecto, el cambio aminoacídico resultante, la ausencia de esta proteína en los controles sanos y la cosegregación familiar, es decir, su presencia en familiares afectados y su ausencia en familiares sanos.

Sería muy interesante poder realizar el estudio de las propiedades biofísicas de los canales iónicos en un modelo “in vitro” que simule el canal iónico cardíaco, para analizar las corrientes iónicas, ver su repercusión en el potencial de acción cardíaco y hacer correlación de dichos hallazgos con el fenotipo observado. Esto es poco factible en la práctica clínica diaria pues requiere un abordaje multidisciplinar y un empleo de recursos que no es posible debido al alto número de nuevas mutaciones encontradas y la escasez de equipos de investigación dedicados a esta materia. Por lo tanto lo esencial continúan siendo los hallazgos clínicos y familiares, así como la información disponible de la mutación que un equipo de genetistas y cardiólogos expertos pueden aportar al respecto apoyándose en la información publicada previamente sobre efectos clínicos en mutaciones cercanas, zona del canal afecto, etc.

Enfermedades hereditarias

Todas las mutaciones y polimorfismos antes descritos pueden dar lugar a enfermedades hereditarias. En ocasiones una única mutación en un solo gen es capaz de generar una enfermedad, si bien esto no es así. En múltiples enfermedades se han descrito alteraciones en diferentes genes, dependiendo el desarrollo de la enfermedad de la interacción entre esas alteraciones genéticas.

Por todo ello, y en función de que la alteración afecte a todo un cromosoma o a parte de éste (gen), así como a la presencia de uno o varios de estos genes afectados, las enfermedades hereditarias se clasifican en:

1. Alteraciones cromosómicas, con la delección o adición de una parte o un cromosoma entero.
2. Enfermedades poligénicas (las más frecuentes), que se deben a la interacción de diferentes genes.
3. Enfermedades monogénicas. Sólo un gen causa la enfermedad, y su patrón de herencia sigue las leyes de Mendel.

Este último grupo es el más interesante desde el punto de vista de la estratificación de riesgo de MSC y el estudio de probandos y familiares con una utilidad práctica. Ello es debido a la mayor relación causa-efecto y mayor factibilidad para el análisis al tratarse de un único gen responsable; se pueden dividir en:

a) *Enfermedades autosómicas dominantes*. Uno de los alelos heredados es defectuoso y el otro es normal. El carácter dominante de la enfermedad significa que con un solo alelo afectado por una mutación ya se puede originar la enfermedad (heterocigosis). La descendencia tiene un 50% de posibilidades de ser portadores de esta enfermedad si uno de los padres está afecto. Cada generación tiene afectados y tanto los varones como las mujeres pueden heredar y transmitir la enfermedad.

b) *Enfermedad autosómica recesiva*. Requiere que los dos alelos sean defectuosos para que se produzca la enfermedad (homocigosis). Por lo tanto, es una forma menos común que la autosómica dominante. Si ambos padres son portadores, la descendencia tiene un 25% de posibilidades de padecer la enfermedad, y un 50% de posibilidades de ser portadores.

c) *Enfermedades ligadas al sexo*. Las mujeres son las portadoras en uno de los cromosomas X. Los varones, al poseer un solo cromosoma X, padecen la enfermedad si heredan el cromosoma mutado.

d) *Enfermedades mitocondriales*. Siempre son transmitidas por la mujer porque el cromosoma mitocondrial proviene de la madre. Por lo tanto, no se produce transmisión de varón a varón.

Las enfermedades objeto de esta tesis son las descritas en el apartado previo (I.III): son enfermedades monogénicas que producen arritmias ventriculares con corazón estructuralmente normal, tienen carácter familiar y un origen genético definido que hace que su estudio pueda ser factible.

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La MSC por cardiopatías hereditarias, como se ha comentado en la introducción, afecta predominantemente a jóvenes menores de 40 años y atletas profesionales. En muchas ocasiones, además, es la primera manifestación de la enfermedad. Por ello conllevan gran impacto en el ámbito familiar, social y económico de una sociedad. Por cada episodio de muerte súbita en una persona joven se pierden gran cantidad de años potenciales de vida. Cada año fallecen en España unas 40.000 personas de MSC de las que una proporción significativa es población joven, siendo unos 20 deportistas de élite, y cuya causa en ocasiones podría haberse evitado en caso de haberse detectado de forma precoz la cardiopatía subyacente. Una proporción significativa de casos está causada por canalopatías cardíacas como se comentó en la introducción, un conjunto de enfermedades de base genética muy desconocido para el médico generalista e incluso en ocasiones para el propio cardiólogo.^{2,7} Por ello es fundamental la creación de Unidades destinadas al diagnóstico y tratamiento de estos síndromes arrítmicos hereditarios que realicen investigación para mejorar nuestro conocimiento de estas enfermedades, sus causas y mecanismos y su tratamiento.

Como ya se ha comentado, el estudio genético, apoyado en un exhaustivo estudio clínico y familiar se está convirtiendo en una herramienta de gran utilidad en el manejo de las cardiopatías hereditarias arritmogénicas. Su principal utilidad se resume en el esquema de la figura 2.1.

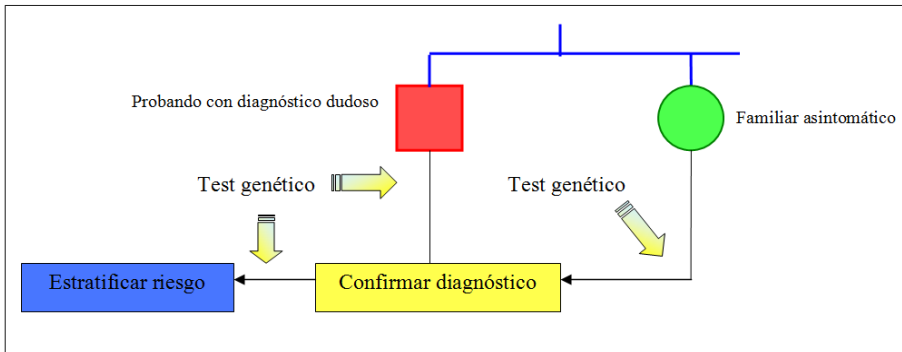


Figura 2.1: Las principales utilidades del diagnóstico genético en el momento actual se basan en confirmar el diagnóstico en casos dudosos desde el punto de vista clínico, detectar la enfermedad en familiares asintomáticos de probandos con genotipo positivo y estratificar el riesgo de muerte súbita cardíaca en función de la mutación afecta. Esto último hasta la fecha sólo ha sido posible en el SQTL.

Confirmación de diagnóstico

En nuestra práctica clínica diaria existen a menudo casos de pacientes que nos crean duda sobre el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Poniendo como ejemplo en SQTL, en ocasiones nos formulamos la siguiente pregunta: este paciente asintomático tiene un intervalo QT corregido de 470 milisegundos (normal < 440 milisegundos), tiene un antecedente familiar de muerte súbita de un tío de dudoso origen cardíaco; ¿debo diagnosticarlo de SQTL familiar y tratarlo como tal? ¿Debo implantarle un DAI? Aunque existen unos criterios diagnósticos de Schwartz³⁷ para el SQTL y otros para el SB⁵⁶ su sensibilidad en casos limítrofes es limitada y no siempre nos ayudan a estratificar el riesgo de muerte súbita. De hecho para el SQTL no contempla la información obtenida del test farmacológico con epinefrina ni la información genética. Los criterios diagnósticos del SB no tienen incorporada la información genética. Además, existe una gran variabilidad geográfica respecto a las mutaciones causales, es decir, las mutaciones y polimorfismos más prevalentes en una determinada área pueden ser muy infrecuentes en otra, y viceversa. Por lo tanto es necesario revisar los criterios

diagnósticos de las canalopatías en base a lo observado en nuestros pacientes, así como aportar datos en nuestro medio del sustrato genético de estas patologías para poder realizar una confirmación diagnóstica.

Detección en familiares

Dado que la penetrancia es variable en diferentes individuos, e incluso en la misma familia, no es posible descartar definitivamente la enfermedad en un sujeto fenotípicamente negativo que tenga un familiar directo afecto por alguna de estas patologías. El estudio genético está llamado a solucionar en parte este problema. Esto tan sólo es posible cuando se encuentra alguna mutación en el probando enfermo. El beneficio más importante en los familiares asintomáticos es la posibilidad de descartar la enfermedad, ya que el test genético tiene alto valor predictivo negativo cuando el probando presenta una mutación concreta y altamente probable de ser patógena. Este hecho es muy importante pues se trata de personas jóvenes, muchas veces deportistas y con responsabilidades laborales, familiares y sociales en los que la duda sobre si se padece o no la enfermedad conlleva graves consecuencias en todos estos ámbitos.

En nuestro medio carecemos de datos concretos sobre el patrón de heredabilidad de las canalopatías, su penetrancia en las familias afectadas y el comportamiento en diferentes familiares de primer grado afectados por la misma mutación.

Estratificación del riesgo

Este punto sigue siendo el que más debate crea. El hecho de conocer el espectro mutacional de una población es importante, pero lo es aún más el conocer si una determinada mutación se asocia con mejor o peor pronóstico y las implicaciones terapéuticas que ello conlleva. La posibilidad de emplear el estudio genético para predecir la probabilidad de padecer arritmias ventriculares potencialmente letales se ha establecido hasta la fecha en el SQTL. Para el SB ni

para la TVCP aún no se ha conseguido establecer una predicción del riesgo en función de la genética subyacente. El conocimiento de la evolución e historia natural de la enfermedad en nuestros pacientes aporta datos concretos sobre el riesgo arrítmico, si bien es cierto que son necesarias muestras de pacientes amplias para poder optar a el ambicioso objetivo de establecer predictores de riesgo de MSC.

En nuestro país son todavía pocos los grupos de investigación que estudian las características genéticas de las cardiopatías hereditarias arritmogénicas y escasa la información que tenemos sobre el sustrato genético de estos pacientes. Hasta la fecha no disponíamos de ningún estudio que analizase las características básicas del genotipo en los pacientes con SQTL y FVI en nuestro país. Recientemente se ha publicado el primer trabajo que estudia la prevalencia mutacional en el SB con la descripción de 4 nuevas mutaciones;⁹⁴ en este trabajo, los autores, encontraron una prevalencia de mutaciones del 16 %, es decir, ligeramente inferior a la publicada previamente. Respecto al resto de patologías implicadas en la MSC no existe apenas información publicada sobre nuestra población. Así en el SQTL únicamente hemos encontrado artículos sobre casos aislados.⁹⁵ Por ello existe la necesidad de ampliar la información sobre el sustrato genético de nuestros pacientes.

Respecto a las FVI hay muy pocos estudios a nivel mundial que estudien de forma sistemática la rentabilidad diagnóstica de estudios farmacológicos, genéticos y familiares en la FVI. El registro CASPER comentado en la Introducción²⁶ es el trabajo más amplio realizado hasta la fecha y utilizó un protocolo diagnóstico consistente en test farmacológico y genético dirigido por fenotipo, sin incluir la evaluación de familiares directos como prueba diagnóstica. El porcentaje de diagnósticos positivos obtenidos fue de 56 %, quedando casi la mitad de los sujetos afectados por FVI sin diagnóstico final. Nuestro trabajo sugiere una ampliación del

protocolo empleado en este trabajo con la secuencia de tests diagnósticos descrita en el apartado material y métodos y que se resume en la secuencia: 1 test farmacológicos, 2 estudio familiar y 3 test genético no dirigido por fenotipo.

OBJETIVO PRINCIPAL DE LA TESIS

Estudiar el sustrato genético de nuestra población con canalopatías cardíacas. En nuestra serie de pacientes con SQTL y SB estudiamos la prevalencia mutacional secuenciando los genes descritos para cada una de las patologías. Este trabajo está publicado en *Revista Española de Cardiología* 2011.⁹⁶

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterización clínica y familiar de nuestra serie de pacientes con SQTL, SB y FVI. Estudiamos la forma de presentación más frecuente, historia natural, asociación familiar, penetrancia clínica y precisión diagnóstica de los criterios diagnósticos en SQTL y SB. Este trabajo está enviado para publicación en *Revista Española de Cardiología*.

- Estudio de la rentabilidad diagnóstica de un protocolo combinado mediante test farmacológico, estudio familiar y genético de la FVI (estudio FIVI-GEN). En una serie multicéntrica desde donde coordinamos a más de quince hospitales españoles y estudiamos de forma secuencial a los probandos con FVI mediante test farmacológicos, estudio familiar y genético. Este trabajo está financiado por la Sociedad Española de Cardiología y los resultados preliminares están publicados en *International Academy of Cardiology; Proceedings of the 15TH World Congress on Heart Disease* 2010.⁹⁷

- Estudio de los efectos funcionales “in vitro” de mutaciones encontradas en familias con SQTL y SB. En colaboración con el Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid describimos los efectos funcionales “in vitro” de dos mutaciones, una en KCNH2 encontrada en una familia española con SQTL y otra en SCN5A responsable de SB pero manifestada

fenotípicamente como FVI en otra familia. El primer trabajo está publicado en *Heart Rythm* 2011, ⁹⁸ y el segundo está publicado en su parte clínica en *Cardiogenetics* 2012, ⁹⁹ estando pendiente de envío el estudio funcional a UNA Revista Internancional de alto factor de impacto.

El resumen de los objetivos e interrelación de los mismos se muestra en la figura 2.2.

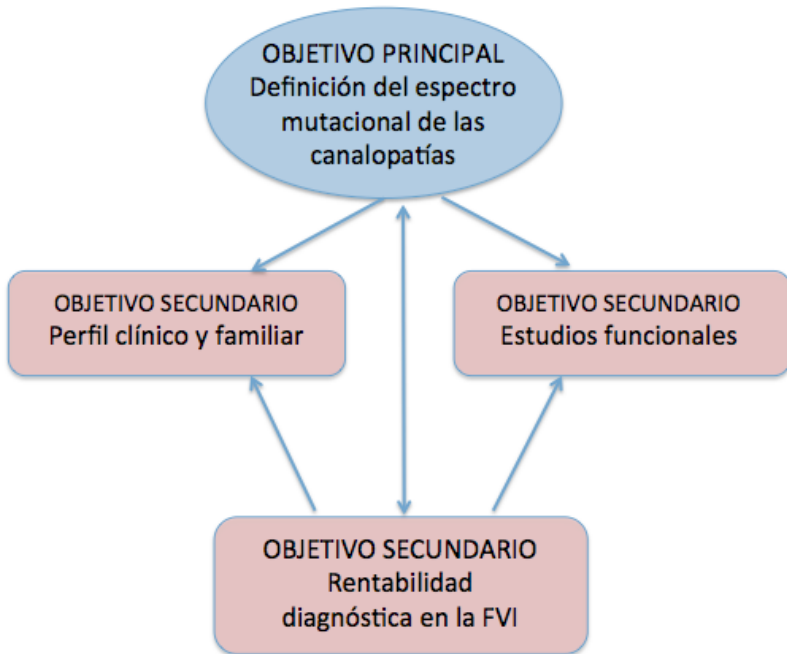


Figura 2.2: El objetivo principal da lugar a los específicos. Como objetivos derivados del estudio mutacional de las series de SB, SQTl y FVI está el estudio clínico y funcional de las mutaciones halladas. Un objetivo relacionado de forma bidireccional con el objetivo principal es el estudio de los sujetos con FVI, ya que los pacientes que forman parte del grupo FVI una vez diagnosticado de laguna canalopatía son tenidos en cuenta en el grupo principal de canalopatías, por lo que ambos grupos se complementan el uno al otro.

Capítulo 3

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.I Población de estudio

Se incluyeron todos aquellos sujetos diagnosticados de una canalopatía primaria o con alta sospecha de padecer la misma, atendidos en la Unidad de Arritmias del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada entre los años 2007 y 2012. Las canalopatías incluidas fueron el SQTL y el SB. Además de los pacientes atendidos por primera vez durante ese período de tiempo se revisaron nuestras cohortes históricas previas para incluir los pacientes diagnosticados de canalopatía en los años previos.

Los criterios para estudiar al sujeto e incluirlo en caso de sospecha de canalopatía fueron la derivación a nuestra Unidad por una o más de las siguientes situaciones clínicas:

- Síncopes de repetición de origen no filiado
- ECG patológico sugerente de canalopatía: prolongación del intervalo QTc mayor a 460 ms en varones y mayor a 480 ms en mujeres, o presencia de alteración del segmento ST en precordiales derechas sugerente de SB
- Episodio de Fibrilación Ventricular recuperada
- Familiares directos de casos afectados por MSC y autopsia sin hallazgos patológicos
- Taquicardia Ventricular Polimórfica sin causa aparente

Los criterios de exclusión fueron la presencia de factores secundarios capaces de prolongar el intervalo QT como alteraciones electrolíticas o fármacos con potencial para prolongar en intervalo QT. En el caso de SB no se incluyeron sujetos con ECG

dudoso asintomáticos o con patrón de Brugada en presencia de infarto agudo de miocardio o cualquier otro evento clínico mayor como lesiones intracraneales. Otro criterio de exclusión fue la negativa del paciente a participar en el estudio, someterse a las pruebas o firmar el consentimiento informado para la realización del estudio genético.

Respecto al subestudio realizado en pacientes con FVI los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

- Supervivientes a una parada cardíaca por fibrilación ventricular en ausencia de cardiopatía estructural, causa transitoria determinante o criterios diagnósticos de canalopatía.
- ECG basal con intervalo QT normal (intervalo QTc < 440 ms en varones y < 460 ms en mujeres), en ausencia de patrón de Brugada en precordiales derechas y en ausencia de ondas Q patológicas.
- Firma del consentimiento informado y aceptar participar en el estudio.

Criterios de exclusión:

- Taquicardia ventricular monomórfica documentada.
- Presencia de cardiopatía estructural o canalopatía en el probando o familiares de primer grado.
- Evidencia de consumo de drogas, alteraciones electrolíticas, isquemia o bradicardia extrema como causa de la FV
- Vasoespasmó demostrado.

III.II Diseño y tiempo del estudio

El estudio corresponde a un diseño observacional y descriptivo, con un seguimiento a largo plazo de forma prospectiva y retrospectiva para la evaluación de eventos clínicos.

Para la evaluación de la prevalencia mutacional en cada una de las series de pacientes se utilizaron medidas de tendencia central como la media y la mediana, así como de proporción como el porcentaje. Para la comparación estadística entre grupos de pacientes portadores de mutaciones en uno u otro gen se emplearon test estadísticos no paramétricos como la U de Mann-Whitney y el test exacto de Fisher. Para el estudio de la sensibilidad de los criterios diagnósticos de las canalopatías se emplearon medidas de porcentaje.

El cronograma seguido para realizar este trabajo de esta tesis doctoral se expone en la figura 3.1. El inicio del reclutamiento de pacientes comenzó en Abril de 2010, siendo el último sujeto analizado incluido en Diciembre de 2011.

Fases del estudio	Trimestre/año								
	1/2010	3/2010	4/2010	1/2011	2/2011	3/2011	4/2011	1/2012	2/2012
Búsqueda bibliográfica	■								
Recogida de datos	■	■	■	■	■	■	■		
Análisis estadístico							■		
Redacción tesis doctoral							■	■	■
Defensa pública y publicación de los resultados									■

Figura 3.1: Cronograma seguido para la elaboración de esta tesis doctoral. El tiempo total de realización ha sido de 3 años

III.III: Variables

En todo participante del estudio se recogieron datos demográficos consistentes en edad, sexo, lugar de residencia, edad al debut de la enfermedad, antecedentes personales de otras enfermedades o toma de fármacos, lugar de residencia y motivo por el que se estudia.

Posteriormente se documentó en hoja de recogida de datos (figuras 3.2A y 3.2B) una serie de datos clínicos que se describen a continuación, haciendo especial hincapié en el antecedente personal de síncope, el motivo por el que se sospecha la canalopatía, la edad al debut de la enfermedad, arritmias ventriculares sostenidas o no, desencadenantes más frecuentes de síncope y antecedente familiar de muerte súbita. La historia familiar fue muy detallada con especial énfasis en antecedente familiar de muerte súbita a edad precoz y síncope en familiares de primer grado.

Los datos del ECG se analizaron de forma rigurosa por cardiólogos expertos en Electrofisiología. Para la medición del intervalo QT corregida por frecuencia cardíaca se empleó la fórmula de Bazzet.¹⁰⁰ El resto de parámetros estudiados en cada una de las canalopatías se expone en las hojas de recogidas de datos.

Hoja de recogida de datos QT largo/Brugada

1 Datos personales

NHC

Apellidos: _____ Nombre _____

Edad _____ Sexo _____ Fecha de nacimiento _____

Dirección Postal _____
Ciudad _____

Teléfono fijo _____ Teléfono móvil _____

Probando Familiar

2 Datos clínicos

Síntoma de presentación: Asintomático Síncope PCR Sordera congénita: Sí No

Historia de síncope: Sí No Edad al primer síncope: _____

Puntuación de Schwartz: Desconocido Factor desencadenante:

Tratamiento: Ninguno Descanso
(actual) B-Bloqueantes Ejercicio
 Mexiletina Emociones
 DAI Ruido
 Marcapasos Otros

Episodios

Nº	Evento	Fecha	Tto. en la fecha	Desencadenante

Figura 3.2A: hoja 1 de recogida de datos

3 Datos electrocardiográficos:			
- QT absoluto	- FC	- QT corregido	- Dispersión QT
- Morfología onda T: <input type="checkbox"/> QT1	<input type="checkbox"/> QT2	<input type="checkbox"/> QT3	Alternancia onda T: <input type="checkbox"/>
Sí <input type="checkbox"/> No			
- Extrasístoles ventriculares: <input type="checkbox"/> < 10 monorf. <input type="checkbox"/> < 10, polimorf. <input type="checkbox"/> > 10 monorf. <input type="checkbox"/> > 10 polimorf.			
- Disfunción sinusal: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		Bloqueo a-v: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	Torsade de Pointes: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
- Otros:			
4 Otras pruebas:			
<u>Pr. Esfuerzo</u>			
- QT absoluto	- FC	- QT corregido	- Dispersión QT
<u>Test provocación epinefrina</u>			
- QT absoluto	- FC	- QT corregido	- Dispersión QT
Ecocardiografía <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal			
5 Historia familiar			
- AF de muerte súbita: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No		- AF de síncope <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	
<div style="border: 1px solid black; height: 150px; width: 100%;"></div>			
6 Estudio genético			

Figura 3.2B: hoja 2 de recogida de datos

Los datos electrocardiográficos incluyeron frecuencia cardíaca, longitud de intervalo QT absoluto y corregida por frecuencia, dispersión del intervalo QT, presencia de bloqueo aurículo ventricular, pausas sinusales, morfología complejo QRS, morfología onda T y alternancia de la misma, extrasístoles ventriculares y presencia de taquicardia torsade de pointes. Los datos de QT absoluto y corregido, frecuencia cardíaca máxima y dispersión del QT se recogieron también en los sujetos en que se realizó test de epinefrina y de esfuerzo.

Para el SB se utilizó un formato muy similar para la recogida de datos clínicos y electrocardiográficos haciendo especial énfasis en el subtipo de SB (tipo 1, 2 ó 3) y el resultado del test de flecainida/procainamida realizado para desenmascarar la enfermedad.

III.IV: Protocolo FIVI-Gen

En el subestudio denominado FIVI-Gen se hizo una inclusión de pacientes multicéntrica que cumplía los requisitos expuestos previamente. A todos ellos se les aplicó un protocolo diagnóstico expuesto en la figura 3.3. En el paso diagnóstico 12 se realizaron test farmacológicos con epinefrina y flecainida de acuerdo a los protocolos descritos en el apartado siguiente. En caso de negatividad en este paso se estudiaron familiares de primer y segundo grado a los que se realizó un estudio básico inicial con ECG y ecocardiograma. En caso de obtener algún indicio de sospecha de la canalopatía subyacente se podrían hacer más estudios a estos familiares. En el caso de que no hubiese ninguna sospecha diagnóstica tras las realización de los primeros dos pasos diagnósticos se realizó estudio genético

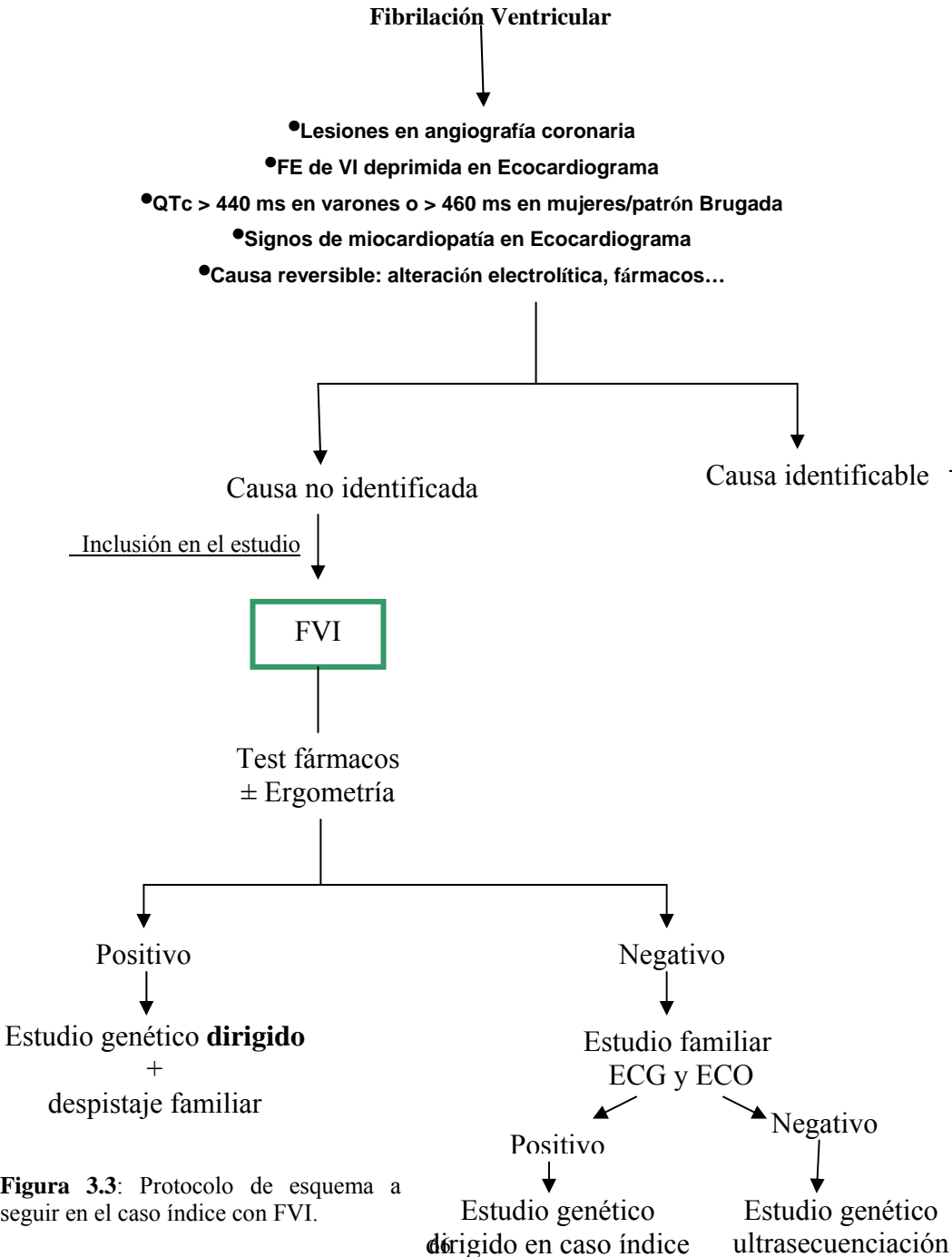


Figura 3.3: Protocolo de esquema a seguir en el caso índice con FVI.

En cualquier fase del protocolo que el diagnóstico sugiriese alguna canalopatía concreta se realizó estudio genético dirigido mediante la técnica convencional de Sanger para estudiar los genes responsables de la canalopatía sospechada. El tiempo de realización de este estudio es de dos años y en esta Tesis Doctoral se incluirán únicamente datos preliminares.

III.V: Test farmacológicos

Los test farmacológicos con adrenalina o flecainida se llevaron a cabo a través de una vía intravenosa periférica con monitorización continua electrocardiográfica.

La adrenalina se infundió a razón de 0,05 µg/Kg/min. durante diez minutos en perfusión continua o bien un bolo inicial de 0,10 µg/Kg seguido de infusión continua a 0,10 µg/Kg/min 10 minutos. Se realizó ECG de 12 derivaciones basal cada 2 minutos. Se terminaba la infusión en caso de tensión arterial sistólica < 80 mm Hg o > 200 mm Hg, en caso de detectar TV no sostenida o TV polimórfica o alternancia de la onda T. El intervalo QT absoluto se midió al final de cada intervalo de 5 minutos. La prolongación del intervalo QT > 30 ms se consideró anormal y consistente con SQTL¹⁰¹. La aparición de extrasistolia ventricular pleomórfica o taquicardia ventricular bidireccional se consideró diagnóstica de taquicardia ventricular polimórfica de esfuerzo.

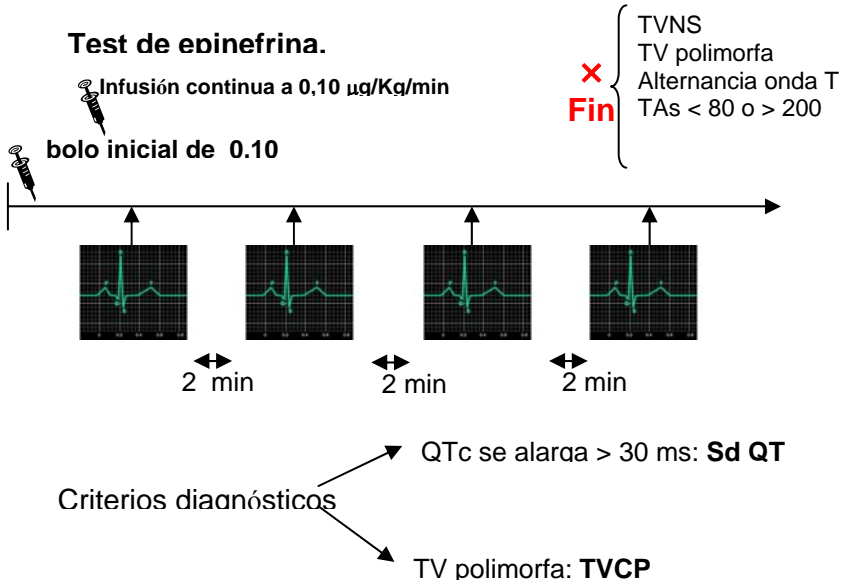


Figura 3.4: Test de epinefrina

La flecaínida a razón de $2 \text{ mg}/\text{Kg}$ se infundió en perfusión continua durante 10 minutos, realizando ECG basal y cada 2 minutos. En este caso se determinó el comportamiento del segmento ST en precordiales derechas, en busca de posibles signos de Síndrome de Brugada. El test se catalogaba como positivo, negativo o indeterminado según los estándares previamente publicados: se considera positivo en caso de hallar elevación de ST > 1 mm en dos derivaciones precordiales derechas con morfología típica del patrón de Brugada⁸¹.

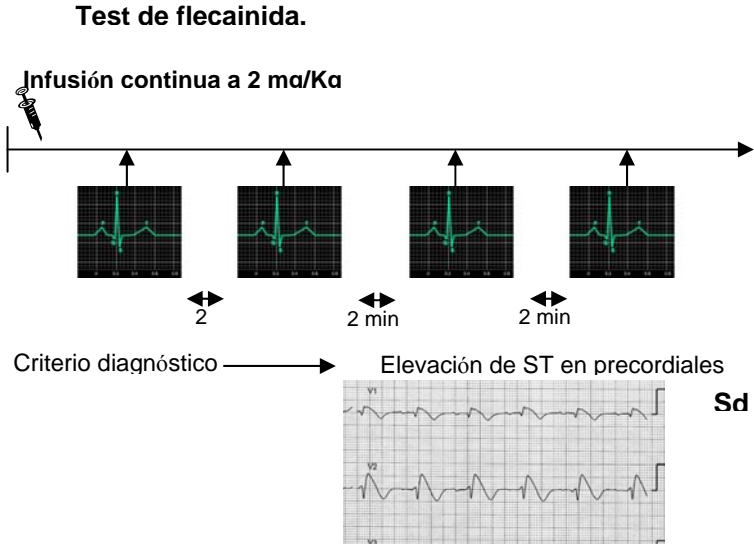


Figura 3.5: Test de flecainida

III.VI: Test genético

Completada la recogida de datos se procedió a la extracción de la muestra. Ésta consiste en 5 ml de sangre total en tubo de ensayo con anticoagulante EDTA, adecuadamente transportada al laboratorio de análisis genético para su examen. Los laboratorios de análisis genético participantes son dos: la empresa LORGEN S.L y la empresa “*Health in Code*”. Con ambos se estableció un convenio de colaboración con la previa aprobación por parte de la subdirección Económica y la Gerencia del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Para llevar a cabo este estudio, nos hemos documentado, en primer lugar sobre la secuencia completa de estos genes, tanto la parte intrónica como los exones por lo que están compuestos. Una vez obtenida dicha secuencia, se han obtenido, también de la bibliografía publicada, los primers para poder secuenciar cada uno de los

exones y zonas adyacentes, donde aparecen las mutaciones causantes del síndrome, así como, los diferentes transcritos de cada uno de los genes, en el caso de que los haya. Se procedió a la secuenciación completa de los exones de cada uno de los genes.

Procedimiento resumido de la Técnica Sanger

1.- Extracción orgánica del ADN mediante fenol-cloroformo a partir de sangre total.

2.- Proceso de cuantificación del ADN extraído en geles de agarosa al 0.8%

El proceso de cuantificación consiste en determinar cuál es la cantidad de ADN que hemos logrado obtener tras la extracción del ADN. Es muy importante tener una estimación de la cantidad de ADN para poder llevar a cabo satisfactoriamente el siguiente paso, que es la amplificación por PCR. Esta estimación nos permitió ajustar el volumen de extracto de ADN que debemos añadir a la PCR para que ésta se desarrolle con éxito.

3.- Amplificación mediante reacción de PCR del fragmento de interés

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) permite amplificar más de un millón de veces el ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos.

4.- Secuenciación del Producto Amplificado

Para realizar la secuenciación el método empleado es el método que emplea los dideoxinucleótidos como terminadores mediante el uso de la secuenciación cíclica (Método de Sanger), concretamente empleamos el kit ABI PRISM BigDye v3.1. (De Applied Biosystems®).

Estos métodos de secuenciación se fundamentan en una reacción de elongación mediada por una ADN polimerasa (AmpliTaq DNA Polymerase, FS), en presencia de dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) marcados con

fluorocromos de diferente color. Los primers utilizados para la secuenciación son los mismos que los utilizados para la amplificación, salvo que la concentración de trabajo de los mismos es de 1 μM (en lugar de 10 μM).

5.- Una vez finalizado el proceso de secuenciación en el termociclador, el siguiente paso es la purificación del producto de secuenciación cuyo objeto es eliminar el exceso de primers y terminadores que no han sido incorporados y que podrían afectar el proceso de electroforesis. El protocolo utilizado por nosotros es la purificación mediante columnas DTR (Performa DTR Gel Filtration Cartridges, Edge Biosystems

6.- Analisis de los Resultados Mediante Electroforesis Capilar En Abi Prism 310

Todas las muestras amplificadas (incluidas los controles positivos y negativos) fueron sometidas a un proceso de electroforesis capilar en el que los diferentes fragmentos eran separados en función de su tamaño por efecto del proceso de electroforesis. Los datos generados (raw data) fueron analizados en el ordenador y un software informático fue el encargado de asignar los nucleótidos correspondientes en cada posición.

7.- Frecuencia de controles

En la etapa de extracción de ADN se analizó junto a las muestras un control negativo o blanco de extracción cada vez que se realice dicho proceso. En la etapa de amplificación, tanto el control positivo como el negativo de amplificación se utilizaron cada vez que se realizó una amplificación. En la etapa de secuenciación se empleó el control positivo suministrado por el kit empleado.

8.- Valores de referencia, esperados y de alarma

Los valores esperados en este tipo de análisis corresponden a las variantes alélicas que existen en la población en función del nucleótido encontrado en la posición de interés.

Así en individuos normales homocigotos se espera encontrar en los 2 alelos el nucleótido referenciado como normal en una posición determinada.

SQTL	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2
SB	SCN5A
FVI	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, RYR2

Tabla 3.1: Genes incluidos en cada una de las canalopatías sospechadas.

III.VII Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 17.0. Para realizar comparaciones de las distintas variables, fundamentalmente fenotípicas, en base a el hallazgo del genotipo subyacente, se emplearon test no paramétricos y tablas de contingencia aplicables a un diseño transversal como el nuestro. Dado que se trata de un estudio de prevalencia, para el cálculo de frecuencias y medidas de tendencia central se emplearon los datos ordinarios: media, mediana y moda, percentiles 25, 50, 75 y desviación estándar, proporción en tanto por cien y tanto por uno. Para la realización de comperaciones estadísticas se utilizó el test de la U de Mann-Whitney y el test exacto de Fischer o Chi-cuadrado (χ^2).

El tamaño muestral estimado vino determinado por los casos prospectivos que fueron surgiendo en la Unidad de Arritmias, así como referidos desde otros Cetros. En el caso de proyecto FIVI-Gen se estima en 60 casos de FVI, siendo esto objetivo secundario de esta Tesis Doctoral y no incluido todo el estudio en ella.

III.VIII Caracterización funcional de nuevas mutaciones en canalopatías

Para llevar a cabo esta parte del proyecto contamos con la colaboración del Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid. Debido a la fisiopatología de las canalopatías en las que se produce una alteración de la corriente iónica a través de una estructura proteica, contamos en la actualidad con medios en Laboratorios especializados para analizar dichas corrientes a través de la técnica denominada “patch-clamp”.

En la actualidad, tal y como se comentó en la introducción, hay más de 500 mutaciones en múltiples genes descritos para el SQTl y SB. Cada nueva mutación con su correspondiente estudio funcional y descripción de características fenotípicas asociadas aporta una valiosa información sobre los mecanismos de producción de estas patologías y la posible correlación de hallazgos genéticos y fenotípicos.

Nuestro objetivo es caracterizar las propiedades electrofisiológicas de los canales iónicos afectados por las mutaciones presentes en nuestra serie de pacientes con objeto de describir su comportamiento y estudiar sus implicaciones en la canalopatía estudiada. Para ello seleccionamos las mutaciones encontradas en SQTl y SB con alta probabilidad de generar una alteración de la corriente iónica. Éstas fueron las que cumplan una serie de requisitos expuestos a continuación:

- la mutación no debía estar previamente estudiada ni descrita como causante de SQTl o SB
- debía existir cosegregación familiar que sugiera transmisión familiar y, por tanto, mayor probabilidad de implicación en la fisiopatología de la enfermedad
- debía estar localizada en una zona de la proteína y generar un cambio aminoacídico tal que las posibilidades de alterar la funcionalidad del mismo fuesen altas.

Se incluyeron dos mutaciones no previamente descritas y encontradas en dos familias incluídas en nuestro trabajo. Una de ellas se detectó en una familia con

SQTL y otra en una familia afectada por FVI. Ambas cumplían los requisitos previamente expuestos.

Los genes que codifican la expresión de canal Nav1.5 WT (SCN5A) y del canal de K (Kv11.1) subclonados en el vector pCGI fueron proporcionados por la Dra. C. Bezzina, de la Universidad de Amsterdam (Amsterdam, Holanda). Las mutaciones p.E637G de KCNH2 y p.D1816fs en SCN5A se introdujeron mediante el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) y fueron confirmadas mediante la secuenciación completa y en ambas direcciones de la región codificante de las dos cadenas de ADN.

Para el estudio electrofisiológico, las células de ovario de hamster chino (CHO) se transfectaron de forma transitoria con los vectores de expresión de los canales Nav1.5 WT y/o mutantes (p.D1816fs) en el caso de la mutación hallada en la paciente con FVI. En el caso de la paciente con SQTL familiar se transfectaron con el vector portador de la mutación p.E637G en hERG. Ambas se cultivaron en las soluciones adecuadas las corrientes generadas por los canales Nav1.5 WT y mutados, así como por pE637G y mutados, fueron registradas utilizando la técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (*patch-clamp*) en su configuración de célula entera (*whole-cell*). En la figura 3.6 se muestra un esquema resumen de la técnica seguida para el estudio de las corrientes iónicas. En el apartado “Resultados, Memoria de Trabajos” se expone de forma más detallada el proceso seguido para ambas mutaciones estudiadas.

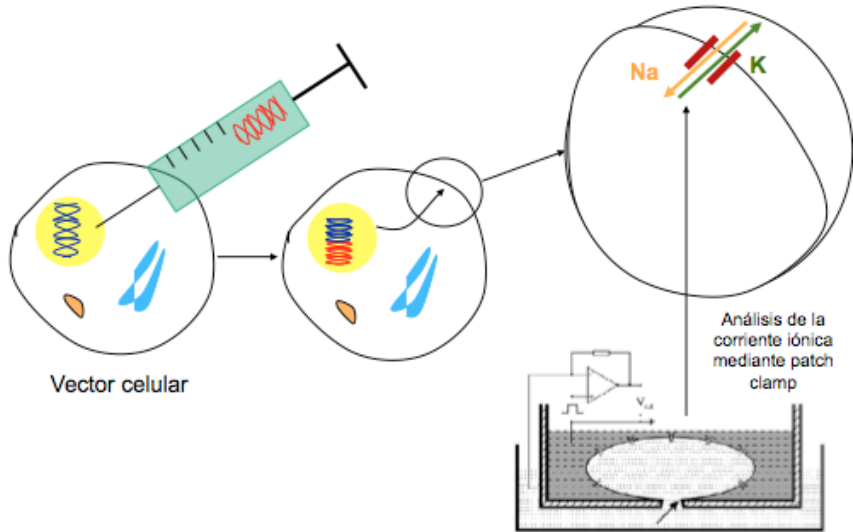


Figura 3.6: Esquema representativo del procedimiento seguido para el estudio de las corrientes iónicas en modelos mutados. Tras la inserción del ADN mutado en el vector y posteriormente en las células de ovario de hámster chino, este se introduce en soluciones que posibilita el estudio de la corriente iónica a través de los canales no mutados (Wild Type) y mutados.

Capítulo 4
RESULTADOS.
MEMORIA DE TRABAJOS

IV. RESULTADOS. MEMORIA DE TRABAJOS

ÍNDICE DE TRABAJOS REALIZADOS

IV.1: Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio.⁹⁶

IV.2: Functional Effects of a novel missense mutacion in KCNH2 associated with type 2 Long QT Syndrome⁹⁸

IV.3: Diagnosis of Unexplained Cardiac Arrest: preliminary results of the FIVI-GEN study.⁹⁷

IV.4: Baja penetrancia en canalopatías cardíacas: utilidad diagnóstica del estudio genético.

IV.5: Novel SCN5A mutation associated with Idiopathic Ventricular Fibrillation due to subclinical Brugada Syndrome.⁹⁹

IV.6: Functional effects of a novel SCN5A mutation related to Idiopathic Ventricular Fibrillation

IV.1: Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio.⁹⁶

Jiménez-Jáimez J, Tercedor-Sánchez L, Alvarez-López M, Martínez-Espín E, Sebastián Galdeano R, Almansa-Valencia I, Lorente Acosta JA, Melgares Moreno R. Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:71-4.

Ver ANEXO I

Resumen

El síndrome de QT largo congénito tiene su causa principal en mutaciones de los genes KCNQ1, KCNH2 y SCN5A. Nos proponemos analizar la prevalencia de mutaciones en estos genes en nuestra serie de pacientes con síndrome de QT largo y fibrilación ventricular idiopática. Se incluyó a 9 pacientes con síndrome de QT largo y 4 con fibrilación ventricular idiopática. Se estudió a los familiares de primer grado de los probandos con genotipo positivo. Encontramos mutaciones missense en 7 pacientes con síndrome de QT largo y en 2 con fibrilación ventricular idiopática. El 71,4% de las mutaciones fueron en KCNH2 y el 28,6% en SCN5A. No se halló ninguna mutación en KCNQ1. Sólo dos mutaciones estaban previamente descritas. En 6 familiares de los 19 estudiados se encontró una mutación. En conclusión, en nuestra experiencia inicial el estudio genético tuvo una alta sensibilidad para el diagnóstico de síndrome de QT largo. El gen más frecuentemente mutado fue KCNH2.

Abstract

Introduction and objectives. Congenital Long QT Syndrome is caused in 70-80 % of cases by mutations in KCNQ1, KCNH2 and SCN5A. The objective is to describe these three genes in our Long QT Syndrome population and its usefulness in the diagnosis and prognosis of this disease.

Methods. We have included eleven patients with Long QT Syndrome (77,7 % women, median age 22,6 years) and four with idiopathic ventricular fibrillation (50 % women, median age 26 years). We used sequencing to analyze the coding region of these three genes and compared clinical and electrocardiographical features in each genetic group.

Results. Nine patients of Long QT Syndrome had a mutation in at least one of the genes (81,8%); 50 % of patients with idiopathic ventricular fibrillation presented *missense* mutations. Most of these mutations were in KCNH2 (77,7 %) and SCN5A (22,2%). We found no mutations in KCNQ1. Only two mutations had been previously described as a cause for the Long QT Syndrome. All patients presented genetic polymorphisms. There were no statistical differences in clinical and electrocardiographical features between the genetic groups.

Conclusions. KCNH2 was the most frequently mutated gene in our Long QT Syndrome population. The majority of mutations had not been previously described, thus we cannot associate them directly to the disease. No phenotypic differences were observed between carriers of the various mutations, so we cannot use this information as a risk predictor.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de QT largo (SQTL) es una canalopatía cardíaca que afecta a 1 de cada 3000 individuos y se caracteriza por alteración de la repolarización ventricular, prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma (ECG) y susceptibilidad aumentada para muerte súbita cardíaca por arritmias ventriculares. Puede ser de causa congénita o adquirida por fármacos, trastornos iónicos, etc. Desde el descubrimiento en 1995 de la implicación de los canales iónicos y sus genes en la patogenia del origen congénito de esta enfermedad, se han descrito cientos de mutaciones en doce genes de canales de potasio, de sodio y en proteínas auxiliares de estos canales¹⁻³.

Aproximadamente el 75 % de las mutaciones descritas en el SQTL se encuentran en tres genes: KCNQ1, que codifica un canal de potasio; KCNH2 o HERG, que también codifica un canal de potasio y SCN5A, un canal de sodio. Las mutaciones en los dos primeros producen pérdida de función del canal y en el tercero aumento de su función⁴⁻⁶, lo que se traduce en ambos casos en prolongación de la repolarización ventricular y mayor susceptibilidad a arritmias potencialmente letales. El resto de genes descritos suponen menos de un 5 % de los casos de SQTL con genotipo positivo. El 25-30 % de los enfermos con SQTL permanece sin identificar desde el punto de vista genético a pesar de la secuenciación completa de todos los genes descritos⁷⁻⁹.

El SQTL presenta una penetrancia del 25-90 %, por lo que existe la posibilidad de padecer la enfermedad con un ECG normal¹⁰. Muchos de estos pacientes con ECG normal se catalogan como Fibrilación Ventricular Idopática (FVI) tras sufrir un episodio de muerte súbita cardíaca recuperada. Hay datos previos que relacionan la FVI con el Síndrome de QT corto¹¹, pero recientemente se ha sugerido la posible utilidad del estudio genético del SQTL en estos pacientes¹².

El estudio genético en el SQTL estaba restringido a propósitos de investigación hasta hace pocos años; el incremento en su disponibilidad hace que pueda convertirse en prueba de utilidad, si bien su aplicación en la práctica diaria debe ser

más ampliamente evaluada¹³. La principal utilidad del estudio genético es el consejo genético, aunque también puede tener implicaciones en el tratamiento y en el pronóstico según el canal afectado¹⁴.

No existe ningún estudio que haya analizado los genes responsables del SQTl en nuestro medio. El objetivo de este trabajo es describir las características básicas del genotipo de los pacientes con SQTl analizando los tres genes principales responsables. Objetivos secundarios son evaluar el valor pronóstico de los hallazgos genéticos, el estudio de familiares asintomáticos, la utilidad diagnóstica del test genético en la fibrilación ventricular idiopática (FVI), la relación de estos hallazgos con otras pruebas diagnósticas y establecer una correlación entre fenotipo electrocardiográfico y genotipo subyacente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron once pacientes con SQTl y cuatro con FVI diagnosticados, tratados y en seguimiento por la Unidad de Arritmias del Hospital Virgen de las Nieves de Granada entre el año 2000 y 2008 *inclusive*. El diagnóstico clínico se llevó a cabo mediante electrocardiograma de superficie asociado o no a test farmacológico (epinefrina)¹⁵⁻¹⁷. Se calculó la puntuación de Schwartz¹⁸ en todos los probandos considerándose como diagnóstico probable de SQTl una puntuación mayor o igual a 4 puntos. Se realizó un registro de los eventos sufridos por el paciente catalogándolo como: historia de síncope, desencadenantes más frecuentes de síncope, parada cardíaca por fibrilación ventricular, taquicardia ventricular tipo torsade de pointes y descarga apropiada o inapropiada de desfibrilador automático implantable (DAI).

Los electrocardiogramas fueron analizados por tres cardiólogos expertos en electrofisiología que desconocían el resultado del análisis genético. Los catalogaron como SQTl tipo 1, 2 ó 3, describiendo en todos ellos el intervalo QT corregido por

frecuencia cardíaca, morfología del segmento ST (tipo 1, 2 o 3) ¹⁹, datos de disfunción sinusal o aurículo ventricular y alternancia de la onda T.

Se incluyeron en el estudio los familiares directos de los casos índice con estudio genético positivo, independientemente de la presencia o no de síntomas y analizando el intervalo QTc del ECG.

Todos los pacientes o tutores de los mismos firmaron un consentimiento informado previamente evaluado y aprobado por el Comité Ético de nuestro Hospital.

Análisis genético

Hemos obtenido de la literatura la secuencia completa de los genes KCNQ1 (17 exones), KCNH2 (21 exones) y SCN5A (28 exones), así como los primers necesarios para su secuenciación. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se procedió a la secuenciación de los genes (exones e intrones). Cada fragmento de la reacción en cadena de la polimerasa se secuenció mediante el Método de Sanger (kit ABI PRISM BigDye v3.1. de Applied Biosystems).

Se consideró patológico el análisis de acuerdo con la base de datos Cardiogenomics, clasificándolos como polimorfismos o mutaciones en función del tipo de alteración. Para considerar un hallazgo como patológico se exigió un cambio aminoacídico en la proteína resultante y que dicha alteración no estuviese presente en controles de la población no enferma.

Análisis estadístico

Hemos empleado el programa estadístico SPSS versión 17.0 utilizando pruebas no paramétricas tanto para variables cuantitativas continuas como discretas. Utilizando como variable independiente el genotipo del enfermo se consideraron cuatro grupos: enfermos con mutación en KCNQ1, KCNH2, SCN5A y genotipo negativo. En todos ellos se analizaron como variables dependientes la edad del

primer síncope, la presencia de parada cardiorrespiratoria y la longitud del intervalo QTc. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Pacientes

Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla IV.1.1. Once enfermos con SQTl se diagnosticaron con ECG y en un caso fue necesario test farmacológico con epinefrina. Los cuatro pacientes (casos 4, 5, 7 y 14) con FVI presentaban intervalo QT corregido dentro de la normalidad y dos de ellos test farmacológico no patológico. La edad media de los pacientes con SQTl fue de 22,6 años con un 77,7 % de mujeres; la edad media del grupo con FVI fue de 26 años, con un 50 % de mujeres.

La edad media a la que se presentó el primer síntoma fue de 18 años, siendo el síncope el síntoma más frecuente de presentación (60 %). El 20 % se presentó como parada cardiorrespiratoria y el otro 20 % permanece asintomático y se diagnosticó de SQTl por el ECG de superficie.

En los nueve pacientes que se presentaron como síncope el tiempo medio hasta que el enfermo fue remitido a la Unidad de Arritmias para estudio fue de 7 años y el motivo fundamental fue haber sufrido una parada cardíaca por fibrilación ventricular (cinco casos).

	Edad	Sexo	Edad de presentación	Historia de síncope	Motivo de consulta	PCR	Desencadenantes de síncope
Caso 1	49	M	11	Sí	Síncope	Sí	Ruidos
Caso 2	67	M	60	No	PCR	Sí	Emociones
Caso 3	23	M	14	Sí	Síncope	Sí	Emociones
Caso 4	24	V	17	No	PCR	Sí	Natación
Caso 5	11	M	10	Sí	PCR	Sí	Despertar
Caso 6	11	V	9	Sí	Síncope	No	Emociones
Caso 7	58	M	53	Sí	Síncope	Sí	Desconocido
Caso 8	1	M	0	No	PCR	Sí	Descanso
Caso 9	20	M	19	Sí	Síncope	No	Descanso
Caso 10	10	V	2	Sí	Síncope	No	Desconocido
Caso 11	22	M	No	No	Asintomático	No	No
Caso 12	23	M	No	No	Asintomático	No	No
Caso 13	18	M	12	Sí	Síncope	Sí	Emociones
Caso 14	11	V	10	Sí	Síncope	Sí	Desconocido
Caso 15	5	V	No	No	Asintomático	No	No

Tabla IV.1.1: Historia natural de la enfermedad en los quince casos: La edad de presentación hace referencia al momento del primer síntoma, sea síncope o parada cardiorrespiratoria. La columna motivo de consulta indica la causa por la que se deriva para estudio a nuestra Unidad de Arritmias. (PCR: AP de parada cardiorrespiratoria; V: varón; M: mujer)

Estudio genético

Los resultados del estudio clínico y genético se muestran en la tabla IV.1.2. De los once enfermos diagnosticados de SQTL con la puntuación de Schwartz, 9 (81,8 %) presentaban mutaciones genéticas *missense* que podrían ser causa directa de SQTL; el 77,7 % de éstas en KCNH2 y el 22,2% en SCN5A. No encontramos ninguna mutación en KCNQ1. Únicamente dos mutaciones estaban ya descritas como causa directa de SQTL^{20,21}. Dos enfermos con FVI presentaron mutaciones *missense*, uno en KCNH2 y otro en SCN5A (50 %). Dichas mutaciones no están previamente descritas en la literatura.

	QTc	Test Farmacológico	Diagnóstico fenotípico	Tratamiento	Estudio genético
Caso 1	555	No	SQTL	DAI	KCNH2 + (1910 A>R Glu>Gly)
Caso 2	478	No	SQTL	DAI	SCN5A + (3985 G>R Gly>Ser)
Caso 3	442	+	SQTL	DAI	SCN5A + (1673 A>R His>Arg)
Caso 4	367	-	FVI	DAI	Negativo
Caso 5	405	-	FVI	DAI	KCNH2 + (541 C>Y Arg>Tpf) (577 G>R Al>Thr) (62 G>R Gly>Asp)
Caso 6	631	No	SQTL	DAI	KCNH2 + (1714 G>R Gly> Ser)

Caso 7	413	-	FVI	DAI	SCN5A + (1673 A>R His>Arg)
Caso 8	720	No	SQTL	DAI	Negativo
Caso 9	577	No	SQTL	BB	Negativo
Caso 10	---	No	SQTL	DAI	KCNH2 + (343G>R Val>Met)
Caso 11	510	No	SQTL	BB	KCNH2 + (1910 A>R Glu>Gly)
Caso 12	470	No	SQTL	No	KCNH2 + (1910 A>R Glu>Gly)
Caso 13	488	+	SQTL	DAI	KCNH2 + (1882 G>S Gly>Ser)
Caso 14	400	No	FVI	DAI	Negativo
Caso 15	476	No	SQTL	No	KCNH2 + (del 3079- 3125)

Tabla IV.1.2: Estudio diagnóstico fenotípico y genotípico: en el 66 % de los enfermos se halló una o más mutaciones *missense*. De los once enfermos diagnosticados de STQL (bien con ECG bien con test farmacológico) ocho presentaron mutaciones *missense* y de éstas, dos estaban previamente descritas como responsables de SQTL. (casos 6 y 13)

Gen KCNQ1

Hemos encontrado diferentes polimorfismos ya descritos en este gen, si bien en ningún caso se trata de mutaciones *missense* a diferencia de estudios previamente publicados en los que las alteraciones de este gen eran las más frecuentes¹⁹. Cabe destacar una delección de 5 nucleótidos en el intrón 12, posición 1394 a 1399, en una

recién nacida con SQTl congénito de presentación muy grave y con fenotipo sugerente de SQTl tipo 3²²; se descartó como causante de la enfermedad al no generar un cambio de aminoácido en la proteína sintetizada por estar localizado en un intrón.

Gen KCNH2

Éste ha sido el gen que con más frecuencia ha presentado mutaciones del tipo *missense* en nuestra población, constituyendo un 77,77 % de los casos positivos. La edad media de este grupo fue de 19 años y el intervalo QTc medio de 513 milisegundos. Un total de 8 mutaciones mostradas en la tabla 2 estaban presentes en nuestra población, y sólo 2 de ellas (25 %) estaban descritas previamente como causa de Síndrome de QT largo^{20,21} (G1882S y G1714R). Ambas mutaciones están localizadas entre la región P (poro) y el dominio transmembrana 5 (S5), una región fundamental como filtro de selectividad de potasio^{23,24}.

El caso 5, diagnosticado de FVI con intervalo QT corregido normal, presentó tres mutaciones *missense* para este gen, todas ellas en la región N-terminal pero ninguna había sido previamente descrita como causa de SQTl.

El caso 10, que se manifestó a los dos años de edad con bloqueo aurículo-ventricular y precisó implantación de marcapasos, presentó también una mutación en la región N-terminal no previamente descrita.

Tres de estos enfermos estaban emparentados (casos 1, 11 y 12) presentando una mutación *missense* no previamente descrita en el nucleótido en posición 1910. Los tres casos mostraron intervalo QT prolongado en el ECG con morfología SQTl tipo 2²⁴ (figura IV.1.1).

Un niño de cinco años asintomático (caso 15), cuya madre presentó una muerte súbita a los 35 años, presentaba en el ECG un intervalo QTc de 476 milisegundos y era portador de una delección de 45 pares de bases en este gen.

Cinco pacientes (63 %) habían presentado parada cardíaca recuperada y se trataron con DAI. De los tres enfermos asintomáticos, pero con expresión

electrocardiográfica, uno se trataba con betabloqueantes y dos no recibían tratamiento previo a la realización del estudio genético.

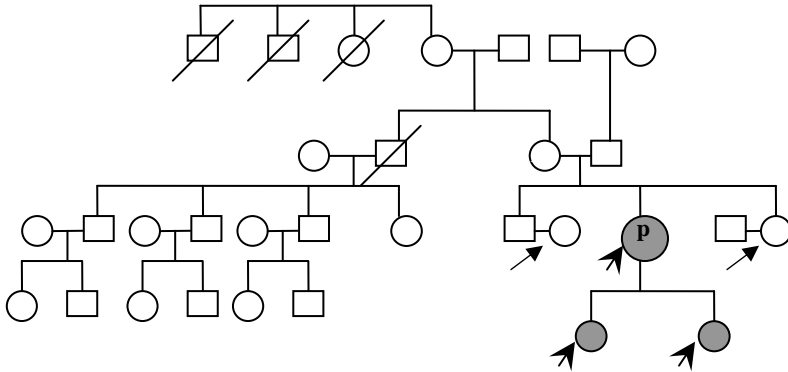


Figura IV.1.1: Pedigrí de probando con mutación missense en *KCNH2* A1910R. Los familiares directos con SQTl fenotípico en electrocardiograma presentaron la misma mutación (puntas de flecha). Los familiares sin alteración en el electrocardiograma no presentaron la mutación (flechas). Esto confiere a la mutación una alta penetrancia.

Gen *SCN5A*

Un 22,2 % de los casos genéticamente positivos presentó mutaciones del tipo *missense* en este gen, previamente descritos como asociados al Síndrome de QT largo, pero sin evidencia de tipo causal directa. Otros polimorfismos sin cambio de aminoácido se exponen en la tabla IV.1.2. El polimorfismo 87 A>G, previamente descrito como candidato para establecer estudios de predicción del SQTl pero sin implicación directa²⁵, estuvo presente en el 100 % de nuestra población de SQTl y FVI. Un resultado negativo para este gen en una recién nacida con fenotipo SQTl tipo 3 ha motivado la búsqueda de otros genes candidatos recientemente descritos;

éstos codifican proteínas auxiliares del canal de sodio y provocan ganancia de su función^{26,27}

Polimorfismos

Se han detectado numerosos polimorfismos genéticos que no son causa directa de la enfermedad pero cuya presencia se asocia con un aumento de la prevalencia de SQTL. La tabla IV.1.3 recoge los polimorfismos más frecuentes en cada gen para nuestra población de SQTL y FVI.

Características <i>Gen</i>	Variaciones en la secuencia de nucleótidos	Cambio aminoacídico	Tipo de mutación	Efecto	Frecuencia (%)
<i>KCNQ1</i>	477 + 80 del GG	No	Delección	Polimorfismo	40
	1590 + 14 T>Y	No	Intronic variant	Polimorfismo	33,33
	1685 + 36 A>G	No	Intronic variant	Polimorfismo	33,33
	1684 + 36 A>G	No	Intronic variant	Polimorfismo	19
<i>KCNH2</i>	1956 T>Y	No	Synonymous	Polimorfismo	46,6
	1692 A>R	No	Synonymous	Polimorfismo	40
	1956 T>C	No	Synonymous	Polimorfismo	13,3
	1896 T>Y	No	Synonymous	Polimorfismo	13,3
	1467 C>Y	No	Synonymous	Polimorfismo	13,3
<i>SCN5A</i>	87 A>G	No	Synonymous	Polimorfismo	100
	3183 A>G	No	Synonymous	Polimorfismo	60
	5457 T>Y	No	Synonymous	Polimorfismo	33,3

Tabla IV.1.3: Polimorfismos más frecuentes encontrados en nuestra cohorte de enfermos con SQTl y FVI.

Valor diagnóstico y pronóstico del estudio genético en nuestro medio. Utilidad en la FVI

De los once enfermos con SQTl estudiados, diez presentaban prolongación del intervalo QTc en el ECG y uno tenía un valor límite (caso 3: QTc 442 milisegundos). El caso 3 se diagnosticó de SQTl mediante test de epinefrina y posteriormente el estudio genético mostró una mutación missense en SCN5A.

Los cuatro enfermos con FVI presentaban un intervalo QTc dentro de la normalidad y dos de ellos presentan mutaciones de tipo *missense* no asociadas previamente a SQTl. En la figura IV.1.2 podemos observar la utilidad del estudio genético en los enfermos con intervalo QTc normal.

Los casos con mutaciones en SCN5A presentaron mayor prevalencia de parada cardíaca que los casos con mutaciones en KCNH2, si bien la edad de presentación en éstos últimos fue más precoz y su intervalo QTc más prolongado, no siendo estadísticamente significativo.

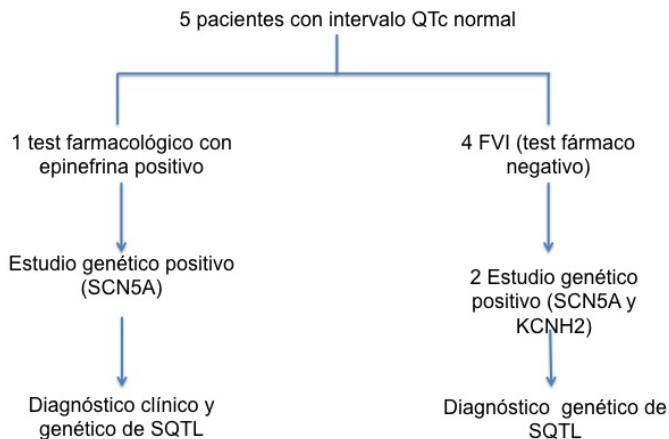


Figura IV.1.2: Valor diagnóstico del test genético en el SQTl. En los casos con probabilidad clínica alta (test farmacológico positivo) y test genético inicial con KCNQ1, KCNH2 y SCN5A negativo no se puede excluir el SQTl. En los casos de FVI, una mutación en estos genes sugiere SQTl, aunque es preciso el estudio de las propiedades biofísicas del canal iónico para confirmarlo definitivamente.

El registro de eventos sufridos por los enfermos una vez iniciado tratamiento con betabloqueantes en función del canal afecto se muestra en la figura IV.1.3. Se recogieron únicamente síncope, taquicardia ventricular “torsade de pointes”, fibrilación ventricular descarga apropiada del DAI. Los enfermos con mutación en *KCNH2* presentaron en total dos episodios de “torsade de pointes” y un síncope, mientras que los que presentaban mutación en *SCN5A* presentaron un síncope y una descarga apropiada de DAI.

Estudio en familiares asintomáticos

Se han estudiado familiares directos (padres, hermanos e hijos) de los enfermos con mutaciones *missense*, tanto previamente estudiadas como causantes de SQTl como no descritas con anterioridad. En los casos con mutaciones ya descritas no se encontró mutación en los familiares lo que nos ha permitido descartar la enfermedad en los familiares.

En casos con mutaciones hemos hallado la mutación buscada en dos familiares directos de un enfermo que presentó mutación en *KCNH2* (G343R que condiciona cambio de valina por metionina). Estos familiares tenían un intervalo QTc de 440 milisegundos en el ECG de superficie. Dado que la mutación no está descrita no se puede atribuir una relación causa-efecto directa, por lo que no se puede confirmar ni descartar la enfermedad en estos familiares.

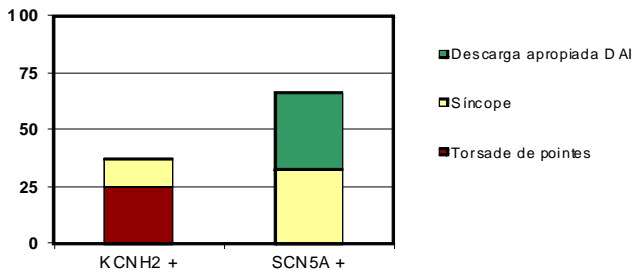


Figura IV.1.3: Probabilidad de sufrir un evento (síncope, descarga apropiada de DAI o torsade de pointes) tras el inicio de betabloqueantes. Los enfermos con mutaciones en SCN5A tenían mayor frecuencia de eventos tras el tratamiento betabloqueante, aunque este resultado no es estadísticamente significativo ($p > 0,05$)

Cabe destacar el caso con mutación en el gen KCNH2 (A1910R, cambia glicina por ácido glutámico) que presentaban tres familiares con la misma mutación e intervalo QT corregido prolongado en el electrocardiograma (figura 1). A pesar de la alta probabilidad de relación causal directa, esta mutación debe ser estudiada mediante análisis de corrientes iónicas a través del canal afectado por la mutación con la técnica patch clamp^{28,29} para poder asociarla directamente a la enfermedad.

En el resto de estudio a familiares destaca la positividad del polimorfismo missense A1673R en SCN5A en dos familiares directos del caso índice número 8 (FVI), ambos con intervalo QTc normal. Esta mutación está descrita previamente como candidata para establecer estudios de predicción de la enfermedad, pero no como relación causal directa, por lo que no podemos confirmar la enfermedad ni en probando ni en familiares.

El resto de análisis genético de familiares ha sido negativo, lo que permitirá descartar la enfermedad en los familiares, una vez estudiado el efecto que estas mutaciones tienen en las propiedades biofísicas del canal iónico.

DISCUSIÓN

No existen datos del genotipo de los enfermos de SQT1 en nuestra población. Nuestro trabajo es el primero en nuestro país que secuencia los tres genes más importantes del SQT1 en una serie de pacientes. Previamente se habían publicado mutaciones en casos aislados³⁰, pero no series de enfermos.

Estudios previos demuestran que en el 65-70% de los casos de SQT1 se detecta alteración genética subyacente, siendo el gen más frecuentemente mutado el KCNQ1 seguido del KCNH2^{19,31}. Nosotros hemos encontrado una frecuencia de mutaciones algo superior a estudios previos (81,8 %)³². En nuestra serie el gen KCNH2 fue el más frecuentemente mutado con un 53,3 % de los casos totales y un 77,7 % de los casos con genotipo positivo. El segundo gen más frecuentemente mutado fue el SCN5A (18,1% del total de casos de SQT1). Sin embargo, una de las dos mutaciones *missense* detectadas en este gen está previamente estudiada y no ha podido establecerse claramente su patogenicidad³³. No hemos encontrado ninguna mutación en KCNQ1, lo cuál difiere de datos previos en los que este gen es responsable del mayor número de casos de SQT1^{19,34}.

Únicamente dos mutaciones estaban previamente descritas como causa de SQT1. En dichos pacientes fue posible, gracias al estudio genético, descartar definitivamente la enfermedad en familiares asintomáticos. Para establecer la patogenicidad de las mutaciones en el resto sería preciso un estudio de las propiedades biofísicas del canal iónico afectado bajo esa mutación concreta. Sin embargo, ciertos datos como la zona del canal afecto, el cambio aminoacídico resultante y la ausencia de esta proteína en los controles sanos orientan sobre la probable patogenicidad de la mutación³⁵. Ello contribuyó a aumentar la rentabilidad

diagnóstica del test genético en nuestros enfermos y familiares. Tres mutaciones en la región N-terminal de KCNH2 y una en una región muy cercana al poro, no previamente descritas, fueron la causa probable de la enfermedad de tres enfermos de nuestra serie. Se ha demostrado que multitud de mutaciones en esta región N-terminal de KCNH2 aceleran la desactivación del canal bloqueando la corriente de potasio y por lo tanto prolongando la repolarización y, por lo tanto, el intervalo QT³⁶. La mutación hallada en el sexto dominio transmembrana de herG, región muy cercana al poro y cuyas mutaciones se asocian con frecuencia a disrupción de la corriente de potasio, es la probable responsable del SQTl dado que está descrita una mutación en una posición nucleotídica previa (1909, cambiando el aminoácido de ácido glutámico a lisina)³⁷ y existe asociación familiar.

Los datos de la literatura indican que el 25 % de los enfermos de SQTl permanece con genotipo negativo a pesar del análisis de todos los genes descritos como causa de SQTl. En nuestra serie, el 18,1 % de los enfermos con SQTl y el 50 % de los casos de FVI permanecieron con genotipo negativo a pesar de la secuenciación de los tres genes. Además, un caso de SQTl y otro de FVI presentaron mutaciones con poca probabilidad de ser patógenas. Ello subraya la necesidad de extender el análisis genético en los casos negativos al resto de genes descritos para el SQTl, así como la importancia de explorar nuevos genes candidatos para explicar la causa del SQTl^{21,34}.

El estudio genético puede ser una prueba complementaria útil en el abordaje diagnóstico y pronóstico del SQTl¹⁴, aunque son necesarios más estudios. Nosotros hemos analizado las variables diagnósticas y pronósticas y realizado una comparación de las mismas en función del genotipo subyacente encontrado. Los casos con SQTl tipo 2 se asociaron en nuestra población a mayor longitud de intervalo QT corregido por frecuencia y edades más precoces de presentación que los casos con alteración del gen SCN5A y aquéllos con genotipo negativo. Sin embargo, los casos con SQTl tipo 3 se asociaron a parada cardíaca con más frecuencia. Los casos con mutaciones en KCNH2 presentaron menor número de eventos arrítmicos

tras el tratamiento con betabloqueantes. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos debido al pequeño tamaño muestral, por lo que estas conclusiones deben ser contrastadas en un estudio más amplio.

No existen datos previos acerca de la utilidad del estudio genético del SQTl en el diagnóstico de la FVI. De hecho la FVI se ha relacionado más con el síndrome de QT corto en trabajos previos¹¹. No obstante, dado que la penetrancia del SQTl es inferior al 100 % nos planteamos la hipótesis de estudiar la rentabilidad diagnóstica del estudio genético del SQTl en pacientes que hubiesen sufrido un episodio de FVI con intervalo QT corregido normal y habiendo excluido otras causas. Dos de los cuatro pacientes estudiados presentaron mutaciones *missense* en alguno de los tres genes analizados. Uno de ellos presentó tres mutaciones en la región N-terminal de KCNH2, con alta probabilidad de alterar la corriente de potasio a través del canal y, por tanto, de ser responsables de SQTl, en este caso con baja penetrancia. Este resultado debe confirmarse definitivamente con el estudio de las propiedades biofísicas del canal afecto por estas mutaciones. Nuestro trabajo sugiere que el test genético puede ser útil en aquellos pacientes con fibrilación ventricular idiopática en los que no se llegue al diagnóstico a pesar de la realización de otras pruebas complementarias como el electrocardiograma, el estudio electrofisiológico, test farmacológicos, ecocardiograma o la resonancia magnética nuclear.

CONCLUSIONES

El gen más frecuentemente mutado en los pacientes con SQTl atendidos en nuestro medio fue el KCNH2. No hubo ninguna mutación en KCNQ1. Sólo una pequeña proporción de mutaciones estaba previamente descrita. El estudio genético se mostró como una técnica útil en el abordaje de familiares asintomáticos, sobre todo cuando la mutación estaba previamente descrita. Nuestro trabajo sugiere que el estudio genético de estos tres genes puede ser una prueba útil en el estudio diagnóstico de la FVI, aunque esta hipótesis debe ser contrastada en otro estudio con mayor tamaño muestral.

Bibliografía

1. Curran ME, Splawsky I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*. 1995; 80: 795-803
2. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, *et al*. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*. 1995; 80: 805-11
3. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005; 2: 507-17.
4. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics*. 1998; 51: 86-97.
5. Roberts R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:9-21.
6. Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Brugada R, Brugada P, Brugada J. Bases genéticas de las arritmias malignas y las miocardiopatías. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:422-36.
7. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Effect of clinical phenotype on yield of long QT syndrome genetic testing. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:764-8
8. Ackerman MJ. Genetic testing for risk stratification in hypertrophic cardiomyopathy and long QT syndrome: fact or fiction? *Curr Opin Cardiol* 2005;20:175- 81.
9. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome clinical impact. *Circulation* 1999;99:529 -33.

10. Haïssaguerre M, Sacher F, Nogami A, Komiya N, Bernard A, Probst V *et al.* Characteristics of recurrent ventricular fibrillation associated with inferolateral early repolarization role of drug therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:612-9.
11. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation.* 1999;99:529-33.
12. Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J *et al.* Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation.* 2009;120:278-85
13. Ilan Goldenberg, Arthur J. Moss. Long QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:2291-300.
14. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M *et al.* Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1866-74.
15. Khositseth A, Hejlik J, Shen WK, Ackerman MJ. Epinephrine-induced T-wave notching in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2005;2:141-6
16. Vyas H, Hejlik J, Ackerman MJ. Epinephrine QT stress testing in the evaluation of congenital long-QT syndrome: diagnostic accuracy of the paradoxical QT response. *Circulation.* 2006 Mar 21;113(11):1385-92
17. Shimizu W, Noda T, Takaki H, Kurita T, Nagaya N, Satomi K. Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Feb 19;41(4):633-42.
18. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation.* 1993;88:782-4.
19. Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. Clínica y genética en el Síndrome de QT largo. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60:739-52.
20. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL *et al.* Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 2000;102:1178-85.

21. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005;2:507-17
22. Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Fox J, Giuli LC *et al.* Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation*. 2000;102:2796-8.
23. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen, *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 1998;280:69–77.
24. MacKinnon R, Cohen SL, Kuo A, Lee A, Chait BT. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*. 1998;280:106–109
25. Chen J, Xie X, Zhu J, Tao Q, Wang X. Single-nucleotide polymorphisms in SCN5A gene in Chinese Han population and their correlation with cardiac arrhythmias. *Genet Med*. 2004;6:159.
26. Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, *et al.* Scn4b-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-qt syndrome. *Circulation*. 2007;116:134-42.
27. Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, *et al.* Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*. 2006;114:2104-12.
28. Tamargo J, Caballero R, Núñez L, Gómez R, Vaquero M, Delpón E. Genetically engineered mice as a model for studying cardiac arrhythmias. *Front Biosci*. 2007;12:22-38.
29. Berecki G, Zegers JG, Wilders R, Van Ginneken AC. Cardiac channelopathies studied with the dynamic action potential-clamp technique. *Methods Mol Biol*. 2007;403:233-50.
30. Zamorano-León JJ, Alonso-Orgaz S, Moreno J, Cinza R, García-Torrent MJ, Pérez-Castellano N *et al.*, Novel mutation (H402R) in the S1 domain of KCNH2-

encoded gene associated with long QT syndrome in a Spanish family. *Int J Cardiol.* 2009. [Epub ahead of print]

31. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, *et al.* Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA.* 2005;294:3027-8.

32. Morita H, Wu J, Zipes DP. The QT syndromes: Long and short. *Lancet.* 2008;372:750-63.

33. Anson BD, Ackerman MJ, Tester DJ, Will ML, Delisle BP, Anderson CL, *et al.* Molecular and functional characterization of common polymorphisms in HERG (KCNH2) potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H2434-41

34. Chiang CE, Roden DM. The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications.

J Am Coll Cardiol. 2000;36:1-12.

35. Millat G, Chevalier P, Restier-Miron L, Da Costa A, Bouvagnet P, Kugener B *et al* Spectrum of pathogenic mutations and associated polymorphisms in a cohort of 44 unrelated patients with long QT syndrome. *Clin Genet.* 2006;70:214-27.

36. Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC. Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J Biol Chem.* 1999;274:10113-10118.

37. Hayashi K, Shimizu M, Ino H, Yamaguchi M, Mabuchi H, Hoshi N *et al.* Characterization of a novel missense mutation E637K in the pore-S6 loop of HERG in a patient with long QT syndrome. *Cardiovasc Res.* 2002;54:67-76.

IV.2: Functional Effects of a novel missense mutation in KCNH2 associated with type 2 Long QT Syndrome⁹⁸

Irene Amorós * Juan Jiménez-Jáimez* Luis Tercedor, Adriana Barana, Ricardo Gómez, Marta González de la Fuente et al. (* means contributed equally). Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 Long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2011;8:463-470.

Ver ANEXO II

Abstract

Background Long QT syndrome (LQTS) is characterized by a prolonged QT interval that can lead to severe ventricular arrhythmias (*torsades de pointes*) and sudden death. Congenital LQTS type 2 (LQT2) is due to loss of function mutations in the KCNH2 gene encoding Kv11.1 channels responsible for the rapid component of the delayed rectifier current.

Objective The purpose of this study was to determine the functional properties of the LQT2-associated mutation p.E637G found in a Spanish family.

Methods Wild-type (WT) and p.E637G Kv11.1 channels were transiently transfected in Chinese hamster ovary cells, and currents were recorded using the patch-clamp technique.

Results The p.E637G channels lost inward rectification and K⁺ selectivity, generating small but measurable slowly activating, noninactivating currents. These important alterations were corrected neither by cotransfection with WT channels nor by incubation at low temperatures or with pharmacological channel blockers. As a consequence of its effects on channel gating, the mutation significantly reduced the outward repolarizing current during the action potential (AP), resulting in a marked lengthening of the duration of a simulated human ventricular AP.

Conclusion We have identified and characterized an LQT2 associated mutation that through removal of C-type inactivation and reduction of K^+ selectivity causes the QT prolongation observed in the patients carrying the mutation. Moreover, the results obtained demonstrate the importance of the glutamic acid at position 637 for the inactivation process and K^+ selectivity of Kv11.1 channels.

Keywords Long QT syndrome; Kv11.1 channels; Missense mutation; Patch-clamp; HERG

Abbreviations: **AP:** action potential; **CHO:** Chinese hamster ovary cells; **E_{rev} :** reversal potential; **IE637G:** current generated by p.E637G Kv11.1 channels; **IKr:** rapid component of the delayed rectifier K current; **IKv11.1:** current generated by Kv11.1 channels; **IWT:** current generated by WT Kv11.1 channels; **IWT/E637G:** current generated by cells cotransfected with WT and p.E637G Kv11.1 channels; **I-V:** current-voltage; **k :** slope of the activation/inactivation curve; **LQTS:** long QT syndrome; **SEM:** standard error of the mean; τ_{act} : Time constant of activation; τ_f : fast time constant of deactivation; τ_s : slow time constant of deactivation; **V_h :** midpoint of the activation/inactivation curve; **WT:** wild-type (Heart Rhythm 2011;8:463–470) © 2011 Heart Rhythm Society.

INTRODUCTION

Long QT syndrome (LQTS) is characterized by a prolonged QT interval that can be associated with syncope and sudden death due to torsades de pointes, ventricular tachycardia, and fibrillation.¹ Congenital LQTS type 2 (LQT2) is due to loss-of-function mutations in the *KCNH2* gene (*HERG*).¹ *KCNH2* encodes the pore-forming subunit of the channels (*Kv11.1*) that generate the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current (*IKr*), which is critical for action potential (AP) repolarization.² Approximately 450 LQT2-associated mutations are known so far, and most of them are missense mutations.² The studies demonstrated that these mutations mostly affect protein folding, promote retention in the endoplasmic reticulum, or disrupt trafficking to the surface membrane.² Other mutations alter the gating of the channels by several mechanisms, including enhancing inactivation, acceleration of the deactivation rate, or shifting in the voltage dependence of channel inactivation.²⁻⁴ We have identified a LQT2-associated missense mutation in a Spanish family, which results in the substitution of glutamic acid to the uncharged amino acid glycine at position 637 (p.E637G). Change of this residue to charged amino acids such as lysine (p.E637K) or aspartic acid (p.E637D) has been previously associated with LQT2,^{5,6} although only the functional properties of p.E637K were studied.⁵ The p.E637K channels did not generate measurable currents in *Xenopus* oocytes, however, when p.E637K and wild-type (WT) channels were coexpressed, the currents generated displayed lower amplitude and small changes in the voltage dependence of activation, inactivation, and K⁺ selectivity compared with WT currents.

This study aims to determine the effects of the substitution of a negatively charged residue (E) located in the outer pore region by a neutral amino acid (G) on *HERG* channel properties and to identify the mechanism by which p.E637G mutation of *Kv11.1* channels can lead to QT prolongation.

METHODS

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves and conforms to the principles outlined in the Declaration of Hel- sinki. Informed consent was obtained for the genetic screening test. Genomic DNA was isolated from white blood cell by conventional methods. Polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism analyses were used to screen for mutations in KCNQ1, KCNH2, and SCN5A. Human cardiac KCNH2 was kindly gifted by Dr. C. Bezzina (University of Amsterdam, The Netherlands).⁷ The p.E637G mutation was introduced using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as described elsewhere.^{8,9} WT and p.E637G channels were transiently transfected in Chinese hamster ovary (CHO) cells, and currents were recorded using the whole- cell patch-clamp configuration.⁸⁻¹⁰ For simulating the shapes of ventricular APs, we employed the Grandi-Bers model of a human ventricular AP.¹¹ Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Paired or unpaired *t-test* or one-way analysis of variance followed by the Newman-Keuls test were used to assess statistical significance where appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Case description

A woman diagnosed with epilepsy at age 11 was referred to the Arrhythmias Unit for evaluation because of a ventricular fibrillation episode. She had been followed up in the Epilepsy Unit with poor response to antiepileptic drugs. Indeed, she often had syncope in response to auditory stimuli such as the sound of the

telephone. Magnetic resonance imaging of the head and electroencephalography showed no abnormal findings. At the age of 43, triggered by the buzzing of an alarm clock, she suddenly lost consciousness with no reaction to external stimuli. When the emergencies services arrived, she was in ventricular fibrillation, which required external defibrillation with 200 J. The basal electrocardiogram of the proband showed a marked QT prolongation (Bazzett-corrected QT interval [QTc] of 560 ms), suggesting an LQT2 (Figure IV.2.1A). Her two daughters (aged 25 and 23) also presented with prolonged QTc (Figures IV.2.1B and C), although they are neurologically and cardiologically asymptomatic at this time.

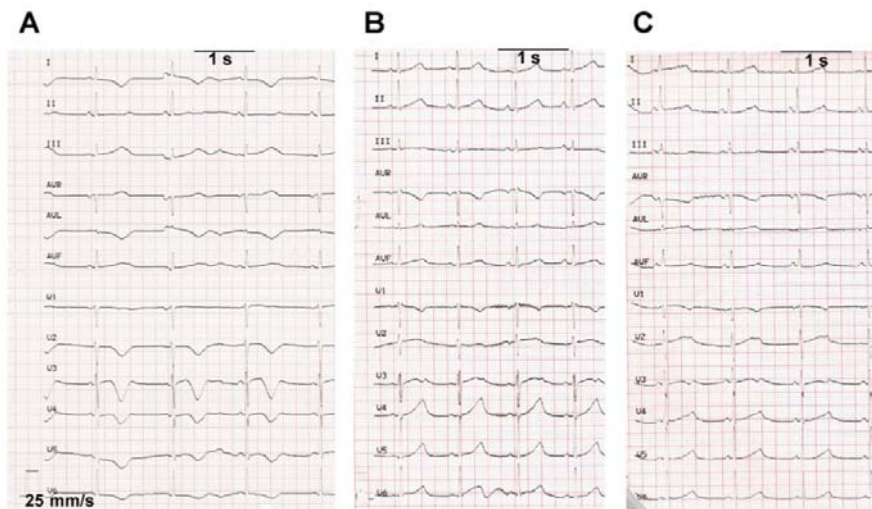


Figure IV.2.1 Twelve-lead electrocardiogram of the proband (A) and her two daughters (B and C) showing a marked QT prolongation (A: 560 ms; B: 490 ms; C: 550 ms).

Genetic analysis

Direct DNA sequence analysis from the proband identified a mutation at nucleotide 1910 of *KCNH2* consisting of an adenine-to-guanine substitution. This mutation leads to an amino acid substitution from glutamic acid to glycine at position 637 of the *Kv11.1* channel (Figure IV.2.2B) and was not observed in the DNA samples of more than 200 control subjects. Sequence analysis of all the other exons of *KCNH2* did not reveal any other mutation, and screening for mutations in *KCNQ1* and *SCN5A* was negative. Her two daughters presented the same mutation in *KCNH2* (Figure 2A), and both of them were diagnosed with LQTS based on the Schwartz score (> 4 points).¹ The proband and her daughters also carried a polymorphism (g.1956T>C) in *KCNH2*, which does not cause substitution in the encoded amino acid (Tyr652). Her sister, brother, and parents, who did not have a prolonged QTc, did not present the mutation (Figure IV2.2A). The penetrance of LQTS among the mutation carriers was 100%.

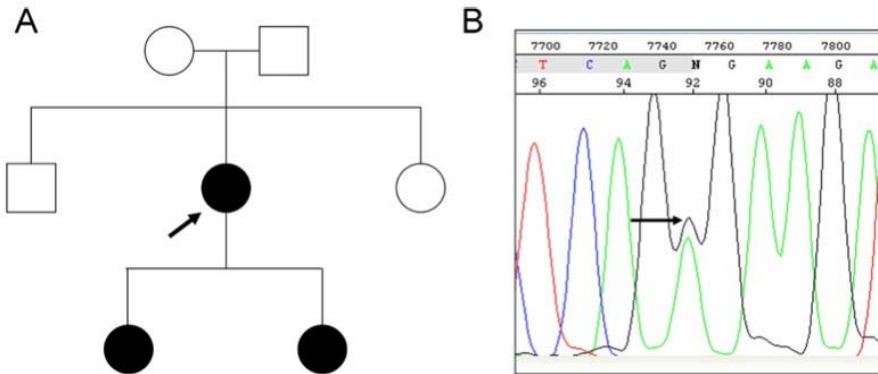


Figure IV.2.2. **A:** Pedigree of the proband's family. The *arrow* indicates the proband, and *black symbols* indicate the presence of the mutation (heterozygosity). Males are shown as *squares*, and females as *circles*. **B:** DNA sequence analysis in the proband. The same single nucleotide substitution from adenine to guanine (*arrow*) was observed in the three affected patients.

Functional characterization of p.E637G channels

To determine the mechanism by which mutation of p.E637G of Kv11.1 channels can lead to LQTS, we compared currents recorded in CHO cells expressing homotetrameric WT (IWT) and p.E637G (IE637G) or heterotetrameric WT/p.E637G (IWT/E637G) channels. Currents were recorded using standardized protocols by applying 5-s pulses from -80 mV to voltages between -80 and -60 mV in 10 mV increments. As shown in [Figure 3A](#), WT Kv11.1 channels generated a slowly activating current ($\tau_{ac} = 951 \pm 85$ ms at 0 mV, $n=21$) whose amplitude progressively increased with pulses up to 0 mV and then progressively decreased at potentials > 0 mV owing to the fast C-type inactivation, resulting in the bell-shaped I-V curve typical of Kv11.1 channels ([Figure IV.2.3B](#)). The p.E637G channels generated a current with significantly lower amplitude at potentials between -40 and +40 mV ([Figures IV.2.3A](#) and [IV.2.3B](#)). IE637G amplitude at 0 mV was very small, which did not allow a reliable measurement of the activation kinetics. Therefore, it was measured at +40 mV, yielding a τ_{ac} value of 734 ± 136 ms ($n = 8$). Interestingly, IE637G did not display inward rectification ([Figures 3A](#) and [B](#)), and thus the I-V curve did not exhibit a bell-shaped morphology. When p.E637G and WT Kv11.1 channels were coexpressed, the current generated did not exhibit inward rectification either; however, it was larger than IE637G at potentials $> +20$ mV ($P < 0.05$, $n = 6$; [Figure IV.2.3B](#)).

Tail currents were recorded on repolarization to -60 mV for 5 s. A biexponential function was fitted to the tail current traces recorded after pulses to +60 mV, yielding a τ_f and τ_s values of 221 ± 27 and $1,340 \pm 178$ ms for WT Kv11.1 channels. The p.E637G mutation did not modify tail current kinetics ([Table 1](#)). However, unlike WT, deactivating tail currents of p.E637G and WT/p.E637G Kv11.1 channels were inward over the range of voltages tested ([Figure IV.2.3A](#)), which suggested an alteration in K⁺ selectivity. To examine whether the p.E637G

mutation affected ion selectivity of the channel, we determined the reversal potential (E_{rev}) in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G Kv11.1 channels (Figure 4A, 4B, Table 1). The E_{rev} values were much more positive for p.E637G and WT/p.E637G than for WT channels ($P < 0.001$ vs. WT), suggesting that p.E637G and WT/p.E637G channels were less selective for K^+ ions than for WT channels.

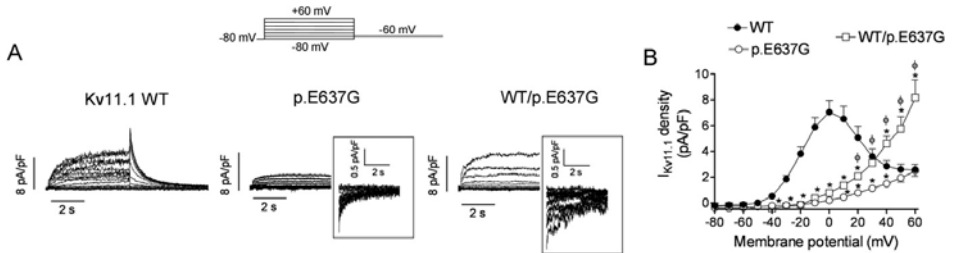


Figure IV.2.3: Traces obtained by applying the protocol shown at the top (A) and current density-voltage relationships (B) for currents recorded in cells transfected with WT, p.E637G, and WT/p.E637G Kv11.1 channels. Each point represents the mean \pm SEM of six or more experiments.

Mean activation curves and the fit of a Boltzmann function to the data for WT, p.E637G, and WT/p.E637G channels are depicted in Figure IV.2.4C. As mentioned, the tail currents generated by p.E637G and WT/p.E637G channels were inward after pulses to potentials between -30 and +60 mV (Figure IV.2.4C). Normalized activation curves demonstrated that the mutation alone or when coexpressed with WT shifted the midpoint toward more positive potentials and decreased the slope of the curve ($P < 0.05$; Figure IV.2.4D, Table IV.2.1).

The loss of inward rectification strongly suggested that the p.E637G mutation disrupted the inactivation process of the channel. To confirm this hypothesis, we looked for changes in the steady-state inactivation (availability) of the channels using standardized protocols described elsewhere.¹⁰ Figure IV.2.4E shows normalized, corrected for closing inactivation curves for WT, p.E637G, and WT/p.E637G channels together with the Boltzmann fits to the data. The V_h and k for WT channels

were -62.3 ± 5.9 mV and 28.1 ± 1.3 , respectively (Table IV.2.1). As expected, inactivation of both p.E637G and WT/p.E637G channels was greatly reduced compared with WT channels, in such a way that at +20 mV, $93.1\% \pm 0.7\%$ of the WT channels were inactivated, while only $20.5\% \pm 5.5\%$ and $34.4\% \pm 7.8\%$ of p.E637G and WT/p.E637G channels, respectively, were inactivated at this potential ($P < 0.05$ vs. WT; Figure IV.2.4E). Since dofetilide preferentially interacts with Kv11.1 channels in the inactivated state, we tested whether the p.E637G mutation also affects Kv11.1 channel affinity for this drug. Blockade induced by $1 \mu\text{M}$ dofetilide in p.E637G and WT/p.E637G was significantly smaller than in WT channels (Figure

Table 1 Time- and voltage-dependent properties of WT and mutant Kv11.1 channels

	Activation			Deactivation			Inactivation		
	$V_{1/2}$, mV	k , mV	τ_{act} , ms	τ_f , ms	τ_s , ms	$V_{1/2}$, mV	k , mV	E_{rev} , mV	
WT	-11.9 ± 2.1	10.2 ± 1.2	951 ± 85	221 ± 27	$1,340 \pm 178$	-62.3 ± 5.9	28.1 ± 1.3	-78.3 ± 0.7	
p.E637G	-1.9 ± 2.9^a	22.7 ± 4.6^a	734 ± 136	160 ± 35	$1,271 \pm 300$	-5.9 ± 2.4^a	4.8 ± 1.3^a	-17.8 ± 0.9^a	
WT/p.E637G	-3.1 ± 2.0^a	18.6 ± 2.9^a	$1,025 \pm 200$	238 ± 55	$1,996 \pm 453$	$-30.8 \pm 5.3^{a,b}$	10.0 ± 5.1^a	-18.4 ± 4.0^a	
p.E637G (Fexof)	-0.9 ± 1.6^a	19.7 ± 3.2^a	998 ± 120	176 ± 26	$1,262 \pm 167$	-7.1 ± 5.1^a	3.8 ± 5.4^a	-20.5 ± 1.4^a	

IV.2.4F).

Table IV.2.1: Note: V_h and k : midpoint and slope values of the activation/inactivation curves; τ_{ac} : time constant of activation, measured at 0 mV in WT and at +40 mV in the rest of the constructs; τ_f and τ_s : fast and slow time constants of deactivation of tail currents at -60 mV recorded after pulses to +60 mV.

Effects of the incubation of cells expressing p.E637G channels with pharmacological chaperones

Some reports have demonstrated that trafficking of Kv11.1 channel mutants can be restored by reducing the incubation temperature during cell culture¹³ or by incubation with compounds (4-phenylbutyrate or glycerol) or drugs (dofetilide, terfenadine or its metabolite fexofenadine) that act as protein-stabilizing agents by improving channel trafficking (pharmacological chaperones).¹⁴ Reducing the incubation temperature during cell culture to 27°C or incubation of the p.E637G transfected cells with $1 \mu\text{M}$ terfenadine or $1 \mu\text{M}$ dofetilide for 24 hours did not

modify current properties compared with that recorded under control conditions (not shown). Conversely, when p.E637G transfected cells were incubated with 1 μ M fexofenadine (Figure IV.2.5A) or 5 mM 4-phenylbutyrate (Figure IV.2.5B), the current generated was larger but with the same time- and voltage-dependent features as those generated by nonincubated cells ($n = 8$ in each group). Furthermore, the Erev of IE637G recorded in cells incubated with fexofenadine or 4-phenylbutyrate was similar to that obtained in nonincubated cells (Figure IV.2.5C, Table IV.2.1). IWT recorded in cells incubated with fexofenadine or 4-phenylbutyrate were identical to those generated by nonincubated cells (Figure IV.2.5B).

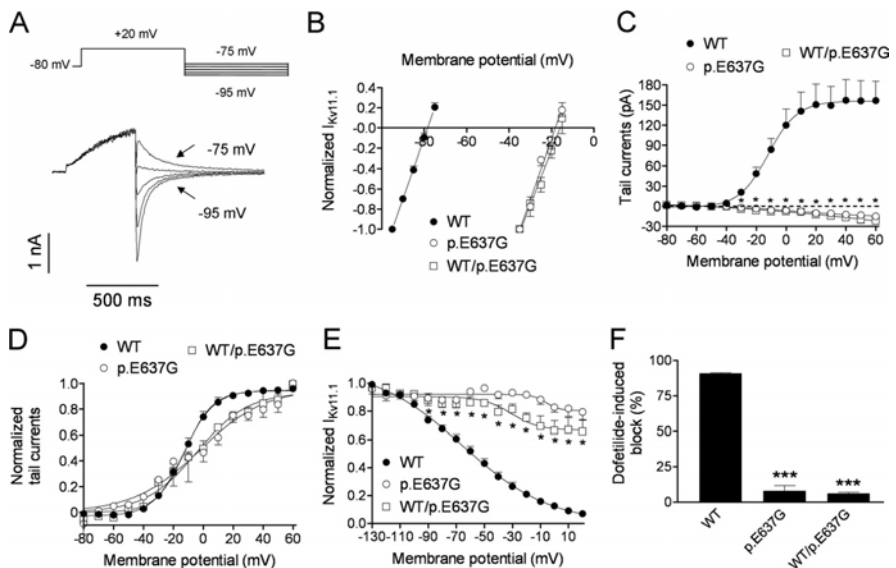


Figure IV.2.4. A: IWT traces recorded by applying 500-ms pulses from -80 to +20 mV followed by repolarization to voltages between -95 and -75 mV in 5-mV increments. **B:** Normalized amplitude of tail currents recorded in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G on return to potentials between -95 and -75 mV or between -35 and -15 mV, respectively. Mean (C) and normalized (D) activation curves as calculated from peak tail-current amplitudes recorded on return to -60 mV in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G. **E:** Corrected for closing inactivation curves constructed by plotting the initial current at +40 mV recorded in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G Kv11.1 channels. In C and E, *P < 0.05 vs. WT. **F:** Dofetilide (1 μ M)-induced block measured as reduction of the amplitude of the tail currents recorded at -60 mV after pulses to +60 mV in WT, p.E637G, and WT/p.E637G channels. ***P

<0.001 vs. WT.

Physiological consequences of the p.E637G mutation

To determine the consequences of p.E637G mutation in a physiologically relevant setting, we used a human endocardial AP voltage clamp protocol (Figure IV.2.6A). In cells transfected with WT channels, current was small at the peak of the AP owing to the rapid inactivation of the channels. However, as the voltage became less positive, amplitude of the outward current progressively increased, reaching a maximum before the final declining phase of the AP. Cells transfected with either p.E637G or WT/p.E637G channels generated a small current that rapidly activated, coinciding with the peak of the AP, and progressively decreased as the voltage became more negative. Due to the loss of K⁺ selectivity, an inward depolarizing Na⁺ current was produced during the final phase of repolarization. Therefore, the mutation significantly reduced the charge crossing the membrane estimated from the integral of the current traces compared with WT channels (Figure IV.2.6B). Furthermore, incubation of cells expressing p.E637G with fexofenadine or 4-phenylbutyrate resulted in charge values larger than in nonincubated cells that were also significantly lower than those obtained in cells expressing WT channels (Figure IV.2.6B).

Simulation of the effects of p.E637G mutation on the cardiac AP

The effects of the mutation on the AP characteristics were simulated using a theoretical model of a human ventricular myocyte. The model was run for endocardial and epicardial cells at different frequencies ranging between 0.1 and 3 Hz. Given the heterozygous nature of the disease, in the patient most of the channels will be heterotetramers of WT and p.E637G subunits. Therefore, the model was run considering the conductance of WT channels and also the conductance reduction (70.2%) produced by WT/p.E637G channels. Furthermore, the time constants, midpoint, and slope values of the activation/inactivation curves and the E_{rev} for WT and WT/p.E637G channels were also incorporated.

As can be observed, currents obtained by incorporating these values were similar to those recorded experimentally (Figure IV.2.6C). As a consequence of the modifications in the current properties, the mutation prolonged the AP duration measured at 50% and 90% of repolarization (19.2% and 22.1%, respectively, at 1 Hz in endocardial cells; Figure IV.2.6D). The AP duration prolongation was greater in endocardial than in epicardial cells and at slow than at fast driving frequencies (inset of Figure IV.2.6D). Furthermore, neither early after-depolarizations nor alternans of the AP duration were predicted by the model when it was run at 0.1 and 3 Hz, respectively. Conversely, alternans were observed when the epicardial and endocardial models were run in control conditions.

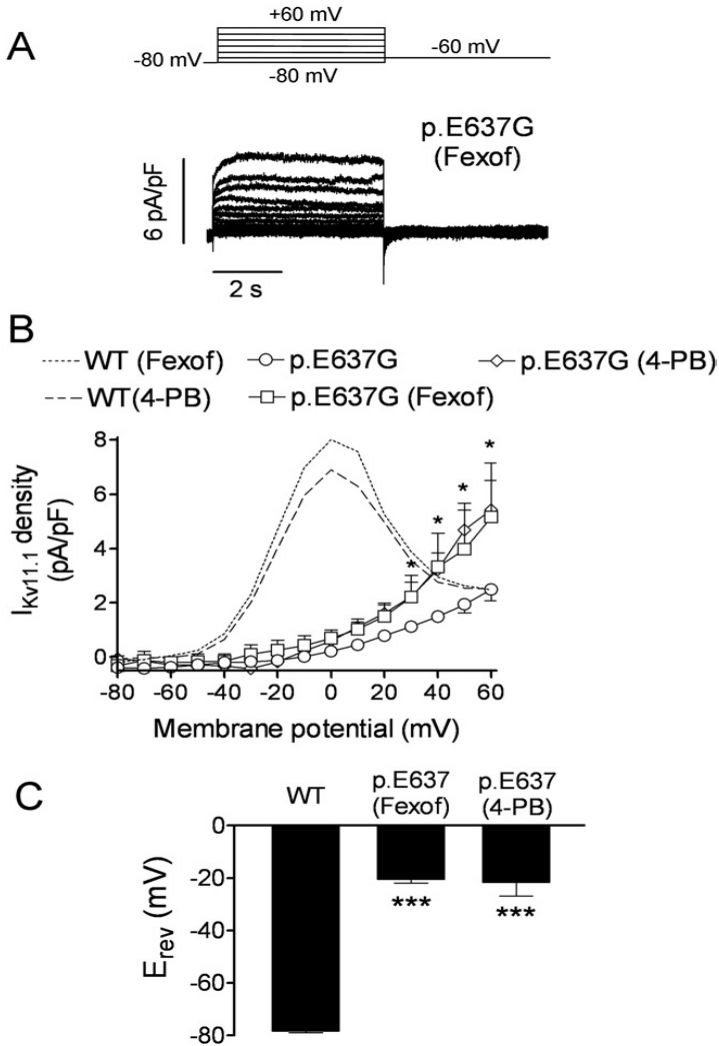


Figure IV.2.5. A: Current traces recorded by applying the protocol shown at the top in cells transfected with p.E637G Kv11.1 channels incubated with 1 μ M fexofenadine for 24 hours. **B:** Current density-voltage relationships for currents recorded in cells transfected with p.E637G Kv11.1 channels incubated or not with 1 μ M fexofenadine (Fexof) and 5 mM 4-phenylbutyrate (4-PB). * $P < 0.05$ vs. nonincubated cells. *Dotted and dashed lines* represent current density-voltage relationships for WT Kv11.1 channels incubated with fexofenadine and 4-phenylbutyrate, respectively. **C:** Mean E_{rev} for currents recorded in cells expressing WT or p.E637G incubated with fexofenadine and 4-phenylbutyrate. *** $P < 0.001$ vs. WT. Each point/bar represents mean \pm SEM of six or more experiments.

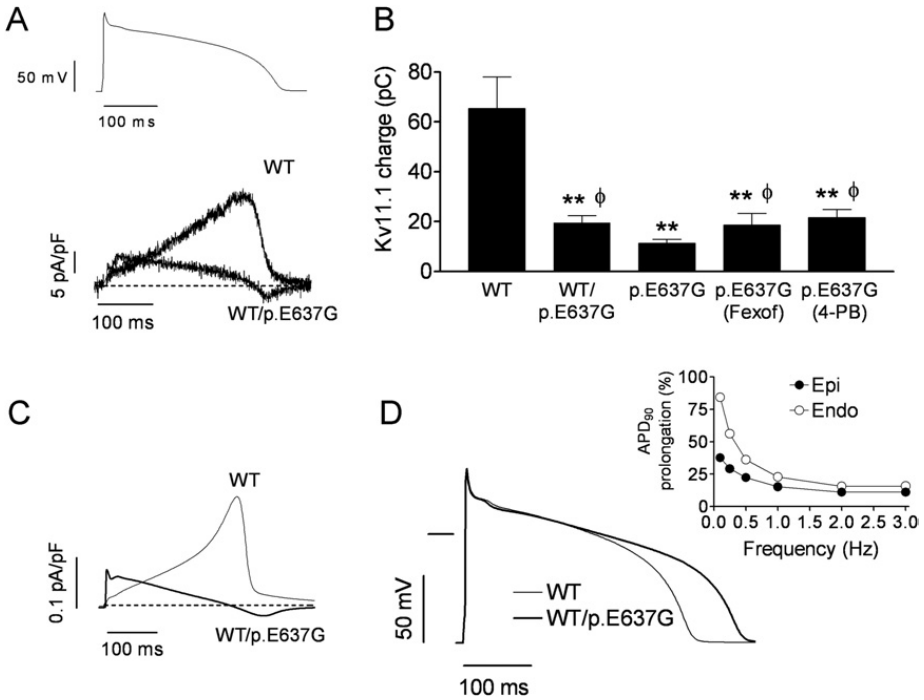


Figure IV.2.6: A: Current traces elicited by AP command signals (top) as voltage protocol recorded in cells expressing WT or WT/p.E637G channels. **B:** Mean charge crossing the membrane through WT or mutant Kv11.1 channels. Each bar represents the mean \pm SEM of six or more experiments. **P < 0.01 vs. WT; ϕ indicates significant difference between WT and mutant. **C:** Current traces (C) and AP (D) simulated using the Grandi-Bers model of ventricular AP by incorporating data from WT or WT/p.E637G Kv11.1 channels. The inset in **D** shows the frequency dependence of the AP duration prolongation.

DISCUSSION

In this study, we have characterized a LQT2-associated missense mutation, which implies a substitution of the glutamic acid to glycine at position 637, which is located in the outer mouth of the pore at the beginning of S6 (Figure IV.2.7B). The mutation abolished inward rectification by disrupting C-type inactivation of Kv11.1

channels and eliminated the K⁺ selectivity. These alterations caused a marked decrease of the Kv11.1 current (IKv11.1) amplitude during the AP, which explains the QT prolongation observed in the carriers of this mutation.

p.E637 mutation alters channel gating

We have found a single base substitution (g.1910A>G) in the KCNH2 gene in a 43-year-old woman. The proband, who presented a marked prolongation of the QT interval, often had syncope in response to auditory stimuli and was diagnosed with LQT2 after a ventricular fibrillation episode. Genetic screening identified the same missense mutation in her two daughters, who also presented QT prolongation, although they are asymptomatic at this time. The proband had been diagnosed with epilepsy and treated unsuccessfully with oxcarbazepine for 32 years. Later, neurological data obtained after her reevaluation were not consistent with epilepsy. Furthermore, after the treatment with beta-blockers was implemented, she did not experience any other cardiac or epileptic episode. Nevertheless, since Kv11.1 channels are also expressed in the central nervous system, we cannot discard the presence of neurally mediated seizures in patients carrying this mutation. Indeed growing evidence suggests a pathogenic link between LQTS and epilepsy, particularly in LQT2 patients.^{2,15}

At physiologically relevant membrane potentials, the IKv11.1 amplitude recorded by applying depolarizing pulses in cells expressing p.E637G and WT/p.E637G channels was significantly smaller than that recorded in cells expressing WT channels. Importantly, coexpression of WT and mutant channels reduced current density by more than 50% compared with the expression of WT alone, suggesting that p.E637G mutation produced a dominant negative effect.

Moreover, the mutation induced severe alterations in the voltage dependence of activation (a positive shift in the midpoint and a marked change in the slope of the activation curve), a loss of channel selectivity (E_{rev} was shifted by 60 mV to more

positive potentials), and a disruption of C-type inactivation (the current did not display inward rectification). Thus, our results support that the activation, inactivation, and K⁺ selectivity in Kv11.1 channels are functionally related¹⁶ and highlight the importance of the Glu637 residue in the control of these processes. Mutations in some amino acids of the outer mouth of the pore region of Kv11.1, comprising the extracellular portions of S5 and S6 domains and the pore loop, also modified channel voltage dependence of activation, disrupted C-type inactivation, and eliminated K⁺ selectivity.^{16,17} Based on these results, it was proposed that this outer pore region, which is unique among voltage-dependent K⁺ channels, is a key determinant of the special features of Kv11.1 channels.^{16,18} In this regard, it seems that the conformational flexibility of this region, as a consequence of a reduced hydrogen bonding capability, is an important contributing factor.¹⁶ Therefore, it could be possible that the introduction of a glycine at position 637 increases the hydrogen bonding capability, which in turn is detrimental to C-type inactivation. Indeed, Glu637, which is highly conserved among the Kv11.x channel family, is substituted by a glycine in other voltage-gated K⁺ channels such as Kv1.5 or Kv7.1 (Figure IV.2.7A), which displays inactivation properties very different from those of Kv11.1.

Hayashi et al⁵ described the effects produced by another mutation at this position (p.E637K) and found somewhat different results. They showed that expression of p.E637K in *Xenopus* oocytes did not produce detectable currents. However, coexpression of p.E637K and WT Kv11.1 channels generated inward rectifying currents with small modifications in their biophysical properties. Indeed, they described a positive shift in the voltage dependence of activation without variations in the slope of the activation curve, a negative shift in the voltage dependence of inactivation, and a 6-mV positive shift in the E_{rev} compared with WT channels. The apparent discrepancies between our results and those obtained by Hayashi et al could be attributed to the different amino acid for which the glutamic acid is substituted (Lys vs. Gly).

It has been described that defective Kv11.1 channel trafficking can cause LQT2 in most cases.^{2,19} Furthermore, some reports demonstrated that trafficking of these mutants can be restored by reducing the incubation temperature during cell culture¹³ or by incubation with unspecific chaperones (4-phenylbutyrate) and high- (terfenadine, dofetilide) or low-affinity (fexofenadine) Kv11.1 channel blockers.^{14,19} Expression of p.E637G channels was modified neither by reducing the incubation temperature during cell culture nor by incubation with terfenadine or dofetilide. The latter could be attributed to the low affinity for p.E637G channels exhibited by dofetilide, which in turn is probably due to the facts that dofetilide is an inactivated-state Kv11.1. blocker and p.E637G channels do not inactivate. Conversely, incubation with fexofenadine and 4-phenylbutyrate significantly increased current amplitude and density, without affecting the biophysical features of p.E637G channels, that is, absence of inward rectification, disruption of inactivation, and loss of K⁺ selectivity.

Physiological consequences of the mutation

The alterations in the channel gating induced by the p.E637G mutation produced a marked reduction in IK_{v11.1} amplitude during an AP, leading to a delayed repolarization. Indeed, the charge crossing the membrane was reduced in mutant channels. Interestingly, when integrating all the alterations induced by the mutation in a simulated human ventricular AP, a marked lengthening of the AP duration was produced, which correlates with the QT prolongation observed in the mutation carriers. It may seem surprising that a mutation that reduces inactivation can prolong AP duration. However, it should be considered that loss of Kv11.1 channel inactivation leads to the elimination of the outward tail current produced by the fast recovery of inactivated channels upon repolarization.¹⁷ Moreover, it is possible that the positive shift of E_{rev} induced by p.E637G mutation can also contribute to the delay in the repolarization process.¹⁷ Indeed, Na⁺ ions can be carried through these

mutant channels, resulting in an inward current at the end of repolarization, as shown by the AP clamp experiments. The AP prolongation may result in the development of early after-depolarizations, which can lead to severe ventricular arrhythmias. However, in the model used, neither early after-depolarizations nor alternans were generated in epicardial and endocardial cells. Importantly, the prolongation induced by the mutation was greater in endocardial than in epicardial cells, especially at slow frequencies. This fact suggests that the mutation would exacerbate the transmural dispersion of repolarization, which has been identified as the principal arrhythmogenic substrate in LQTS.²⁰

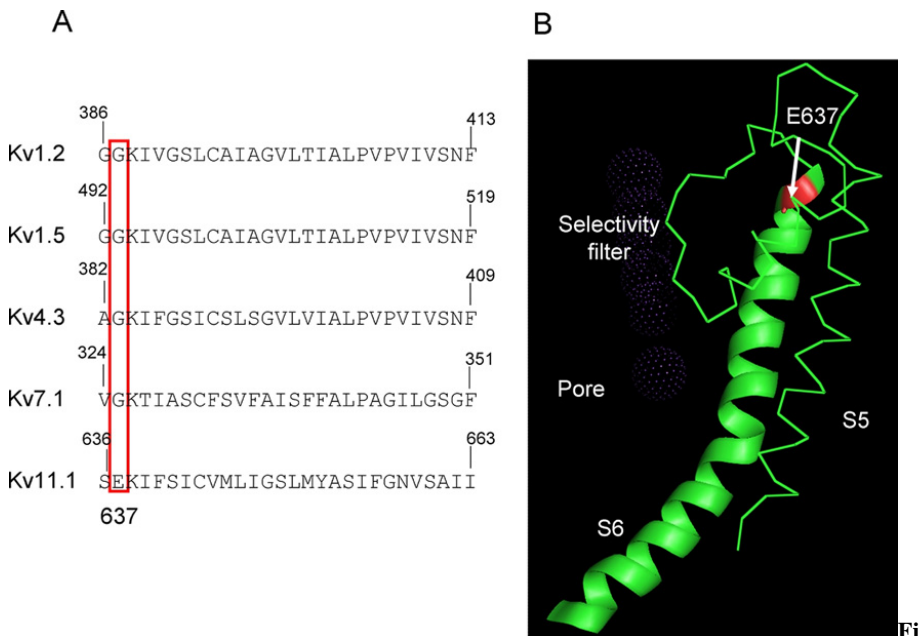


Figure IV.2.7: **A:** Amino acid sequence alignments of the S6 domain of several voltage-dependent K⁺ channels. **B:** Molecular modeling of S5 and S6 segments of Kv11.1 channels using the crystalized structure of Kv1.2 as a template showing the location of Glu637 residue (red).

Recent data have demonstrated the relevance of the location, coding type, and topology of the mutation to predict the clinical phenotype of the patient.^{21,22} Indeed, the QTc is longer and cardiac events are more frequent in patients with mutations in

the transmembrane pore region (comprising S5 and S6 segments and the P-loop) than in patients with mutations in transmembrane nonpore (S1 to S4), N- or C-terminus regions, in patients with missense mutations than in patients with either frameshift/nonsense or other mutations, and in patients with mutations located in α -helical domains than among patients with mutations in β -sheet domains or other uncategorized locations.²¹ Therefore, p.E637G is a high-risk mutation considering that it is missense and is located in the α -helical domain of the S6 segment.

CONCLUSION

We have identified a LQT2-associated mutation that through removal of C-type inactivation and reduction of K⁺ selectivity decreases outward repolarizing current during the AP, leading to a marked delay of repolarization. Moreover, the results obtained demonstrate the importance of Glu637 in the inactivation process and ion selectivity of Kv11.1 channels.

References

1. Roden DM. Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2008;358:

169–176.

2. Sanguinetti MC. HERG1 channelopathies. *Pflugers Arch* 2010;460:265–276.

3. Zhao JT, Hill AP, Varghese A, et al. Not all hERG pore domain mutations have a severe phenotype: G584S has an inactivation gating defect with mild phenotype compared to G572S, which has a dominant negative trafficking defect and a severe phenotype. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:923–930.□

4. Shushi L, Kerem B, Goldmit M, et al. Clinical, genetic, and electrophysiologic characteristics of a new PAS-domain HERG mutation (M124R) causing long QT syndrome. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2005;10:334–341.□

5. Hayashi K, Shimizu M, Ino H, et al. Characterization of a novel missense mutation E637K in the pore-S6 loop of HERG in a patient with long QT syndrome. *Cardiovasc Res* 2002;54:67–76.□

6. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 2005;294:2975–2980.

□7. Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A, et al. A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res* 2003;59: 27–36.□

8. Gómez R, Caballero R, Barana A, et al. Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;105:383–392.

9. Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, et al. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311 decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:15631–15636.□

10. Caballero R, Moreno I, González T, et al. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003;107:889–895. □
11. Grandi E, Pasqualini FS, Bers DM. A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca²⁺ transient. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:112–121.
- 12. Spector PS, Curran ME, Zou A, et al. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J Gen Physiol* 1996;107:611–619. □
13. Paulussen A, Raes A, Matthijs G, et al. A novel mutation (T65P) in the PAS domain of the human potassium channel HERG results in the long QT syndrome by trafficking deficiency. *J Biol Chem* 2002;277:48610–48616. □
14. Rajamani S, Anderson CL, Anson BD, et al. Pharmacological rescue of human K channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation* 2002;105:2830–2835. □
15. Johnson JN, Hofman N, Haglund CM, et al. Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology* 2009;72:224–231.
- 16. Liu J, Zhang M, Jiang M, et al. Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol* 2002;120:723–737. □
17. Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, et al. Novel gain-of-function mechanism in K⁺ channel-related long-QT syndrome: altered gating and selectivity in the HERG1 N629D mutant. *Circ Res* 2000;86:507–513. □

18. Ju P, Pages G, Riek RP, et al. The pore domain outer helix contributes to both activation and inactivation of the HERG K⁺ channel. *J Biol Chem* 2009;284:1000–1008.□
19. Anderson CL, Delisle BP, Anson BD, et al. Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism. *Circulation* 2006;113:365–373.
20. Antzelevitch C. Ionic, molecular, and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade de pointes. *Europace* 2007;9(Suppl 4):iv4–iv15.□
21. Shimizu W, Moss AJ, Wilde AA, et al. Genotype-phenotype aspects of type 2 long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2052–2062.□
22. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, et al. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009; 120:1752–1760.

IV.3: Diagnosis of Unexplained Cardiac Arrest: preliminary results of the FIVI-GEN study.⁹⁷

Jiménez-Jáimez Juan, Tercedor-Sánchez L, Álvarez-López Miguel, Galdeano

Ricardo Sebastián, Melgares-Moreno Rafael. *Proceedings of the 15th world Congress on Heart Disease. Internantional Academy of cardiology. Annual Scientific Session 2010. Vancouver BC, Canadá. July 24-27- 2010. 229-234. (ISBN 978-88-7587-617-3)*

VER ANEXO III

I SUMMARY

Cardiac arrest without evidence of rythm or structural heart disease may be due to genetic disorders with low penetrance. Our aim was to study the usefulness of genetic screening in a small sample of patients with idiopathic ventricular fibrillation. Nine patients with apparently unexplained cardiac arrest and no evident cardiac disease were included. They underwent systematic evaluation including genetic and pharmacological testing for the long QT and Brugada Syndrome.

Three patients presented *missense* mutations, two of them in SCN5A and one in KCNH2. One patient had high-probability Brugada Syndrome-causing mutations. Other patient had three missense mutations in the N-terminal region of KCNH2 with high probability of pathogenicity for the long QT syndrome. In conclusion, genetic testing for the long QT syndrome may be a useful tool to unmask a long QT or Brugada Syndrome in apparently unexplained cardiac arrest.

II BACKGROUND

Cardiac arrest without evidence of structural heart disease is a condition usually caused by subclinical cardiomyopathies and primary electrical disorders. When all the conventional tests are unable to reach a diagnosis we call it idiopatic ventricular

fibrillation (figure IV.3.1).¹⁻² These tests include an echocardiography demonstrating left ventricular ejection fraction $> 50\%$, normal coronary arteries in angiography, resting electrocardiogram with QTc < 440 milliseconds in men and < 460 milliseconds in women and without persistent ST-segment elevation in V1 and V2 (Brugada signs), no structural heart disease in cardiac magnetic resonance and negative procainamide and epinephrine tests.²⁻³ Despite the use of these pharmacological studies that can recognise underlying channelopathies such as Brugada or Long QT syndrome, the etiology of sudden cardiac arrest still remains unexplained in a high proportion of patients (33,3 % 44 % in both studies of Kranh et al)²⁻³.

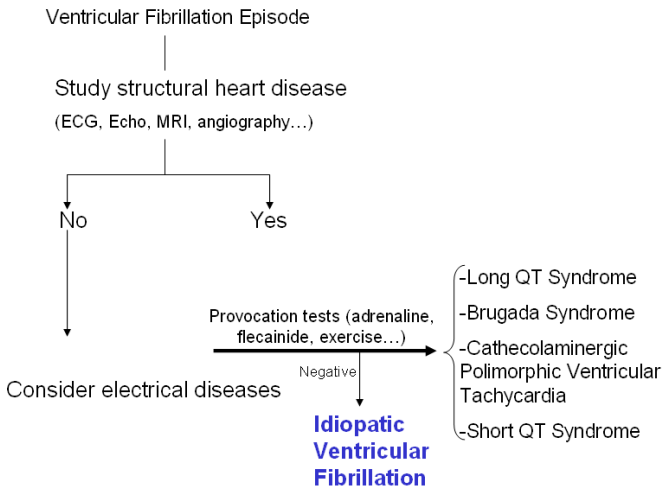


Figure IV.3.1: Diagnostic flow diagram illustrating the progressive testing strategy. Note all conventional tests that must result negative to conclude the diagnosis of Idiopathic Ventricular Fibrillation.

If we rule out other possible causes for it (ionic disorders, subclinical cardiomyopathies...), electrical disorders must be considered. The most feasible explanation for the lack of sensitivity of pharmacological tests in cardiac channelopathies is what is called “repolarization reserve”. This concept, first introduced by Roden⁴, consists of a strong safety of ventricular repolarization in

normal hearts due to the co-existence of multiple and different potassium channels. So, in a normal situation, despite the blockade of one single type of channels, this does not lead to QT prolongation and ventricular arrhythmias. To sum up, loss of function mutation in one important potassium channel can lead to a torsade de pointes tachycardia with normal QTc interval y surface electrocardiogram

Few works have demonstrated an important contribution of targeted genetic screening for channelopathies to the yield of the diagnosis in sudden cardiac arrest when all conventional tests, including pharmacological tests, are negative. Our aim was to study the prevalence of *missense* mutations for Brugada and Long QT Syndrome in patients who have suffered a cardiac arrest episode with no evidence of structural or electrical cardiac disease in conventional tests

III MATERIAL AND METHODS

Nine patients with Sudden Cardiac Arrest were included and underwent standard testing to rule out underlying heart disease (Figure IV.3.1). This included continuous ECG telemetry, transthoracic echocardiography, and coronary angiography, exercise testing, cardiac magnetic resonance imaging, and intravenous adrenaline and procainamide challenge. Adrenaline and procainamide infusions were performed through a peripheral intravenous line with continuous ECG monitoring.

Targeted genetic testing was performed in patients after systematic clinical testing. Genetic testing was performed on the following genes: KCNQ1, KCNH2, SCN5A for Long QT syndrome and SCN5A for Brugada Syndrome.

We designed a trasversal study to evaluate prevalence of mutations and results were analysed using descriptive statistics such as mean, median, mode and proportion.

IV RESULTS

Table IV.3.1 shows baseline characteristics of the nine patients included.

Three patients presented mutations, two of them in SCN5A and one in KCNH2. One of the SCN5A mutations was a high-probability Brugada Syndrome-causing mutation (case 9). The patient with KCNH2 mutations had three *missense* mutations in the N-terminal region of KCNH2 with high probability of pathogenicity for the long QT syndrome (case 4). The other positive-genotype patient presented one mutation in SCN5A, but with low probability of pathogenicity for both diseases (case 2). Graphic shown in figure IV.3.2 illustrates the proportion of final diagnosis reached due to genetic test.

N=9	Age	Sex	QTc	Symptoms before cardiac arrest
Case 1	24	Male	366	No
Case 2	58	Female	360	Syncope
Case 3	10	Male	400	Palpitations
Case 4	11	Female	390	No
Case 5	52	Female	412	No
Case 6	43	Male	420	Syncope
Case 7	47	Female	430	No
Case 8	35	Male	400	No
Case 9	53	Female	406	No
Total	37 ± 18,1 (10-58)	55% Females	398,2 ± 23,2 (360-430)	66,6 % No

Table IV.3.1

Case 4

This 11 year old girl presented with idiopathic ventricular fibrillation episode. QTc interval in surface electrocardiogram was 390 milliseconds and epinephrine test

was negative. Three *missense* mutations were found in the N-terminal region of KCNH2.

Case 9

All conventional tests were studied in this 53 year old patient with negative result, including flecainide test (figure IV.3.3A). She presented a frame-shift mutation g98747- 98748insT (D1816fs) located in the fourth domain of alpha subunit of sodium channel (SCN5A). Similar mutations have been described previously related to Long QT Syn- drome type 3 and Brugada Syndrome. Interestingly, final diagnosis between Long QT and Brugada Syndrome was not possible until direct relatives were studied (figure in next article). Two sisters, one son and two nieces presented the same mutation, and some of them showed a pathological electrocardiogram after flecainide infusion suggesting Brugada Syndrome (Figure IV.3.3B and IV.3.3C). All of them were asymptomatic except one (marked with *), who presented atrial fibrillation, but with negative flecainide test.

Before having studied direct relatives it was impossible for us to make a final diagnosis, because SCN5A is involved in both diseases: Long QT 3 Syndrome and Brugada Syndrome.

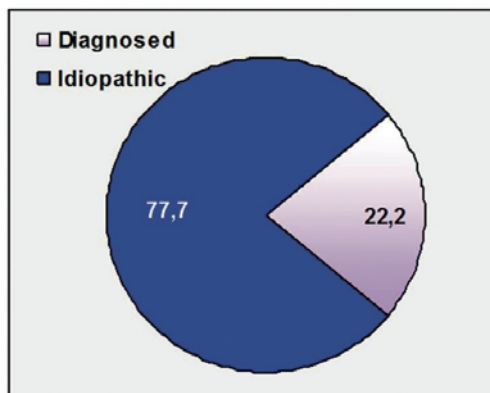


Figure IV.3.2: Final diagnosis was obtained in two out of nine patients thanks to genetic screening

V CONCLUSION

We have described the prevalence of Long QT and Brugada Syndrome mutations in a small sample of patients with idiopathic ventricular fibrillation. Our data suggest the great value that genetic test may achieve when managing patients with cardiac channelopathies. Moreover, we have observed a markedly variable clinical expressivity in patients affected by the same mutation for Brugada Syndrome with a very wide spectrum of clinical manifestations. This means that it is essential to study direct relatives because penetrance usually is incomplete and they can show the clue for a correct diagnosis

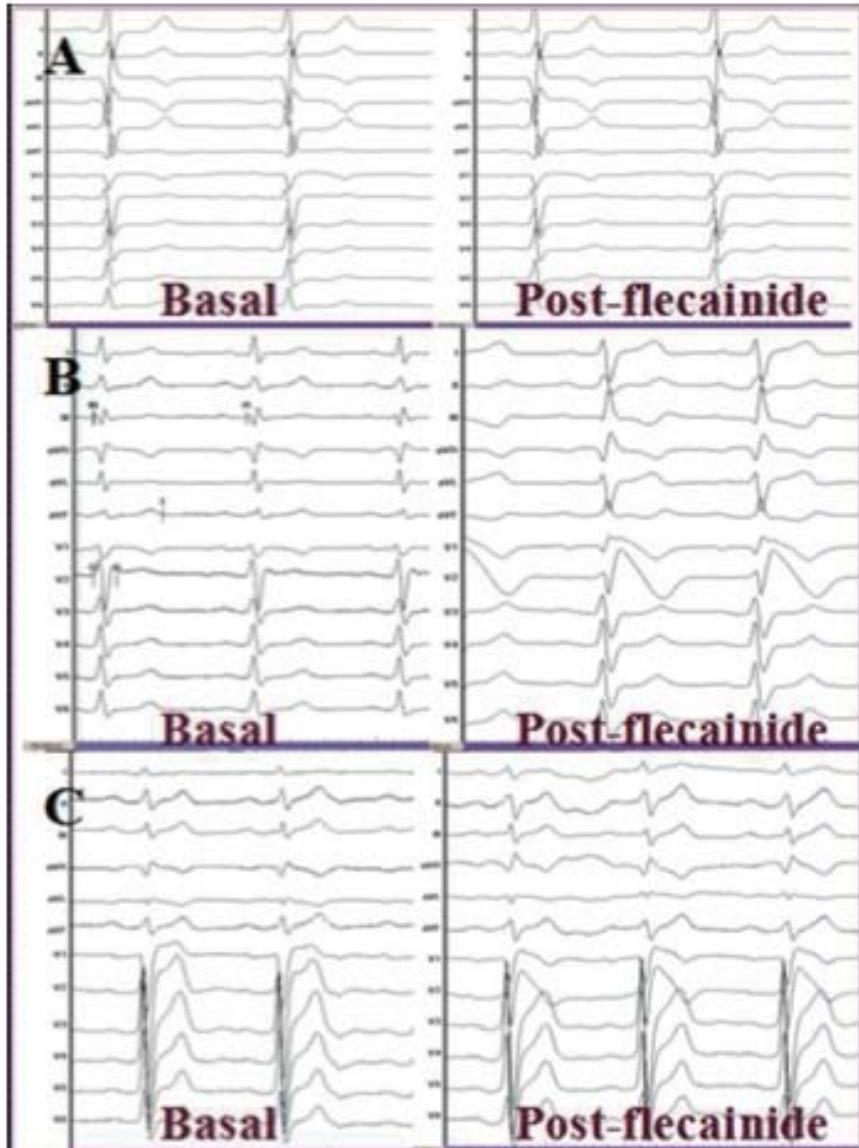


Figure IV.3.3: Basal (left) and post-flecainide electrocardiogram (right) in proband (A), her sister (B) and her son (C). Note the pathological basal electrocardiogram in her son, that presented the same mutation but was asymptomatic.

References

1. Behr E, Wood DA, Wright M, Syrris P, Sheppard MN, Casey A, Davies MJ, McKenna W. Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet*. 2003;362:1457–1459.
2. Krahn AD, Gollob M, Yee R, Gula LJ, Skanes AC, Walker BD, Klein GJ. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of adrenaline and procainamide infusion. *Circulation*. 2005;112:2228–2234.
3. Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation*. 2009;120:278-85.
4. Roden DM. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Intern Med* 2006;259:59–69.

IV.4: Baja penetrancia en canalopatías cardíacas: utilidad del estudio genético

Juan Jiménez-Jáimez M.D¹, Miguel Álvarez M.D¹, María Algarra M.D¹, Rosa Macías Ruíz M.D¹, Rocío Peñas¹, Francisca Valverde¹, Gustavo Tortajada¹, Jose Antonio Lorente Acosta M.D, Ph D², Rafael Melgares M.D, Ph D¹. Luis Tercedor M.D¹

1: Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. Spain.

2: Departamento de Medicina Legal y Toxicología, Universidad de Granada, GENYO - Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica y Oncología, Granada, Spain

Enviado para publicación a Revista Española de Cardiología

Resumen

Introducción: Las canalopatías cardíacas son trastornos genéticos que pueden causar muerte súbita. Entre ellas se encuentran el Síndrome de QT largo y el Síndrome de Brugada. Ambos se diagnostican en base a unos criterios previamente publicados. Nuestro objetivo es evaluar la sensibilidad de estos criterios en una muestra genotipada de pacientes con canalopatías.

Material y Métodos: Se incluyeron 15 familias y 31 sujetos portadores de mutaciones probablemente patogénicas para Síndrome de QT largo o Brugada. Realizamos estudio clínico y electrocardiográfico para analizar el cumplimiento de los criterios diagnósticos. El estudio estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS 17.0.

Resultados: El 48,3 % de los individuos cumplía criterios de alta probabilidad de Síndrome de QT largo o Brugada. Entre la población con mutación sugerente de

Síndrome de QT largo, sólo 10 de 21 sujetos mostraron un Índice de Schwartz mayor o igual a 4. Tanto la mediana de la puntuación de Schwartz como el intervalo QTc fueron menores en familiares asintomáticos que en probandos. En la población con Síndrome de Brugada el 60 % no cumplía los criterios diagnósticos actualmente vigentes, siendo esto más frecuente en familiares asintomáticos. El test farmacológico con epinefrina y flecainida ayudó a establecer el diagnóstico en dos familias portadoras de mutación con fenotipo negativo.

Conclusión: Los criterios diagnósticos actuales para Síndromes de QT largo y Brugada tuvieron una baja sensibilidad en nuestra muestra de pacientes genotipados. Esto fue más acentuado en familiares asintomáticos. El test genético apoyado por el test farmacológico pueden incrementar la sensibilidad diagnóstica especialmente en familiares asintomáticos.

Canalopatías. Síndrome de QT largo. Síndrome de Brugada. Muerte Súbita Cardíaca. Fibrilación Ventricular Idiopática. Mutación genética

Abstract

Introduction: Cardiac channelopathies are genetic disorders that may cause sudden death due to ventricular arrhythmias, among which we find Long QT Syndrome and Brugada Syndrome. Both are diagnosed using previously published criteria. Our aim is to study the sensitivity and usefulness of these criteria in genotyped patients with channelopathies.

Methods: Fifteen families were included and 31 patients were assessed. All of them carried mutations in Long QT or Brugada Syndrome genes with high probability of pathogenicity. We performed ECG and clinical history to calculate Schwartz score and to verify criteria for Brugada Syndrome. Statistical analysis was carried out with SPSS 17.0 program.

Results: More than a half of patients did not fulfil diagnostic criteria. Among the Long QT Syndrome population, only 10 out of 21 patients fulfilled criteria for high probable Long QT Syndrome (Schwartz Score > 4). Median value for Schwartz score was 4 in probands and 1,5 in relatives ($p=0,02$). QTc interval was significantly higher in probands than relatives. In Brugada Syndrome population, only 4 out of the 10 genotyped patients showed type 1 Brugada pattern in surface ECG, so 60 % did not fulfil current criteria for Brugada Syndrome. This was more frequent in asymptomatic relatives. Pharmacological test with epinephrine or flecainide helped to reach the diagnosis in doubtful cases.

Conclusions: Current diagnostic criteria for channelopathies had a low sensitivity in our genotyped sample of patients. This was more frequent in asymptomatic relatives. Genetic and pharmacological test in silent carriers is useful and should be considered as part of the diagnostic criteria

Key words: Channelopathies. Long QT Syndrome. Brugada Syndrome. Sudden Cardiac Death. Idiopathic Ventricular Fibrillation

INTRODUCCIÓN

La muerte súbita en sujetos con corazón estructuralmente normal (Síndrome de la muerte súbita arrítmica, o SADS, del inglés Sudden Arrhythmic Death Syndrome) suele ser de origen arrítmico y está causada predominantemente por canalopatías o trastornos de los canales iónicos cardíacos.¹ Entre estas se incluyen como más prevalentes el Síndrome de QT largo (SQTL), el Síndrome de Brugada (SB), la Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica (TVCP) y la Fibrilación Ventricular Idiopática (FVI).² Las características comunes de las canalopatías son un origen genético definido, un corazón estructuralmente normal, una predisposición a provocar arritmias ventriculares y muerte súbita y una penetrancia clínica habitualmente incompleta.³ La evaluación cardiológica exhaustiva con electrocardiograma (ECG) de superficie y test farmacológicos de flecainida y epinefrina consigue identificar la etiología subyacente a un episodio arrítmico en una proporción sustancial de los casos⁴⁻⁶. Aquellos con muerte súbita en que no se llega a un diagnóstico final a pesar de realizar las pruebas convencionales se catalogan de FVI.

Para el diagnóstico de las canalopatías, y más concretamente del SQTL y SB, existen unos criterios diagnósticos propuestos y vigentes hasta la fecha (tablas 1.1 y 1.3 de la presente Tesis Doctoral). Los criterios de Schwartz, publicados en 1985, modificados en 1993⁷ consideran el diagnóstico de SQTL como probable cuando la puntuación alcanza 4 ó más puntos, y tienen en cuenta datos electrocardiográficos, clínicos y de historia familiar (tabla 1.1). Para el SB, los criterios vigentes desde el año 2005⁸ exigen la presencia del patrón de Brugada tipo 1 en al menos dos derivaciones precordiales del ECG de superficie basal o tras la infusión de un bloqueante de sodio intravenoso (tabla 1.3).

Ambos criterios diagnósticos no tienen en cuenta la información del estudio genético. Estudios recientes sugieren la importancia del estudio genético combinado con test farmacológico dirigido por fenotipo para llegar al diagnóstico en casos dudosos debido a la penetrancia clínica incompleta de estos trastornos, sobre todo en familiares asintomáticos.⁹⁻¹³

El objetivo de nuestro trabajo es analizar la validez de los criterios diagnósticos en sujetos con diagnóstico de canalopatía altamente probable en base al resultado del test genético, y estudiar su valor diagnóstico en probando y familiares, apoyado por el test farmacológico en pacientes portadores de mutación genética y fenotipo negativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió a los casos índice sugerentes de padecer una canalopatía en base a presentar una o varias de las siguientes características: haber sufrido arritmias ventriculares polimórficas de origen no filiado o síncope de perfil cardiogénico, presentar un ECG sugerente de SQTL o SB o ser familiar directo de una persona fallecida de muerte súbita probablemente arrítmica o SADS (autopsia sin hallazgos estructurales y contexto de la muerte sugerente de muerte súbita cardíaca). A todos ellos se les sometió a estudio genético para secuenciar los genes más prevalentes en SQTL y SB. En caso de ser negativo se excluyeron del estudio incluso si el diagnóstico de canalopatía parecía probable por otros datos. Los familiares directos de los pacientes con mutación positiva se estudiaron con ECG y test genético para buscar la misma mutación encontrada en el probando. Los casos positivos se

incluyeron en el estudio y los negativos se excluyeron, así como los casos con causa secundaria y reversible de prolongación del intervalo QTc (figura IV.4.1).

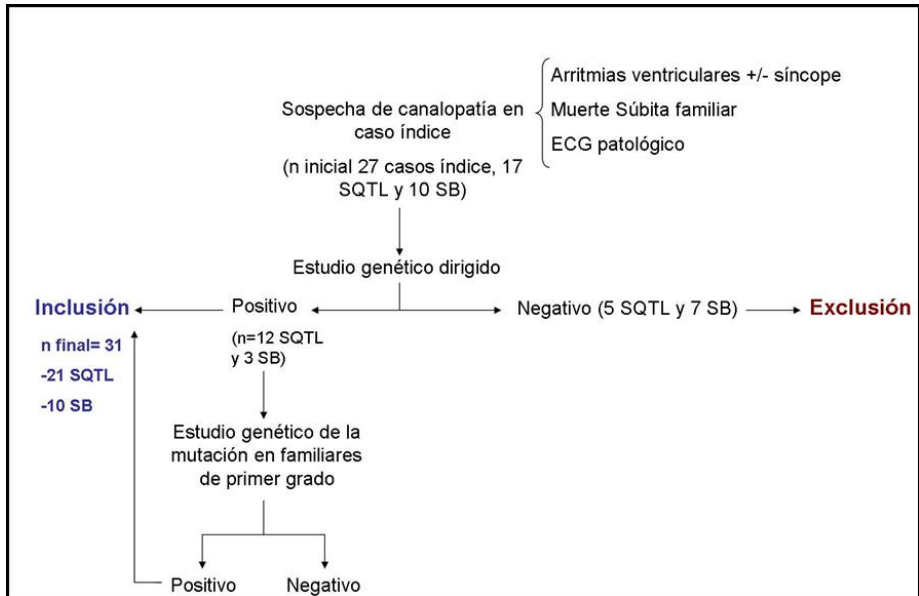


Figura IV.4.1: Algoritmo de inclusión de pacientes. Se excluyeron aquellos casos índice y familiares con genotipo negativo. Nótese que la prevalencia mutacional fue similar a estudios previos, con un 70,5 % para el SQTL y un 30 % para el SB.

La mutación hallada debía estar asociada con alta probabilidad a SQTL o SB, bien por haber sido descrita previamente o bien por presentar características moleculares que hagan considerarla con alta probabilidad patogénica, como la localización en la proteína, el cambio aminoacídico resultante o efectos descritos de mutaciones en zonas cercanas del mismo gen.¹⁴

Todos los pacientes genotipados fueron sometidos a estudio con ECG a 25 y 50 mm/s, midiendo el intervalo QTc por la fórmula de Bazet¹⁵ y buscando signos de patrón de Brugada tipo 1 (elevación de segmento ST en al menos dos derivaciones precordiales de más de 1 mm con morfología típica). En todos los sujetos se practicó

ecocardiografía transtorácica para descartar cardiopatía estructural. En los casos sin fenotipo en el ECG se realizaron test farmacológicos con epinefrina y/o flecainida^{13,16} orientado en función de genotipo y/o factores epidemiológicos sugerentes (muerte súbita en familiar en reposo para el SB o situación de máximo esfuerzo para el SQTL, estrés físico o emocional desencadenante de síncope para el SQTL, síncope o arritmias ventriculares en respuesta a estímulos auditivos o en relación al baño para diferentes subtipos de SQTL, etc). Se calculó el índice de Schwartz en aquellos sujetos portadores de mutación en genes responsables de SQTL. Se evaluó de forma dicotómica el cumplimiento o no de criterios diagnósticos para el SB.

Estudio estadístico

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0 (Chicago 17.0). Se estudió con variables descriptivas la proporción de sujetos que cumplieran criterios diagnósticos en cada patología (medidas de tendencia central como la media y la mediana y de proporción como el porcentaje). Posteriormente se realizó comparación estadística mediante test no paramétricos (U de Mann Whitney y Test exacto de Fisher) entre probando y familiares directos para buscar diferencias en cuanto variables de expresión fenotípica.

El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de nuestro hospital y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para ser estudiados con secuenciación genética.

Resultados

Se evaluaron inicialmente 27 casos índice con sospecha de padecer una canalopatía (figura 1); en 17 casos se sospechaba SQTl y en los otros 10 SB. Cinco casos de SQTl se excluyeron del estudio por no presentar confirmación genética del diagnóstico (prevalencia mutacional del 70,5 %) y 7 casos índice con diagnóstico clínico de SB no mostraron mutaciones en SCN5A, por lo que también fueron excluidos (prevalencia mutacional del 30 %).

Las mutaciones halladas en los pacientes con SQTl se localizaban principalmente en el gen KCNH2; encontramos una mutación en KCNQ1 y en dos casos el gen afectado fue el SCN5A. Estas mutaciones fueron descritas previamente por nuestro grupo en un trabajo reciente^{10,17}. En el caso del SB las tres mutaciones halladas no estaban previamente descritas y se describen en la tabla IV.4.1 De todos los casos positivos, en dos se había realizado el estudio genético por FVI con ECG y test farmacológicos normales.

Mutaciones en	Código de	Código de	Efecto
SCN5A	nucleótido	aminoácido	
Familia 1	g39846G>A	V281M	<i>Missense</i>
Familia 2	g98747- g98748insT	D1816fs	<i>Frameshift</i>
Familia 3	g93141A>C	Y1449S	<i>Missense</i>

Tabla IV.4.1

El 20 % de las mutaciones halladas estaban previamente descritas como asociadas a SQTL, mientras que en otros dos casos nuestro grupo realizó un estudio de las propiedades electrofisiológicas del canal mutado en un modelo celular. En el resto de las mutaciones nos apoyamos en los datos anteriormente expuestos para establecer su patogenicidad.^{14,17}

Incluyendo a los familiares de primero y segundo grado que mostraron la misma mutación altamente sospechosa de patogenicidad se alcanzó finalmente un tamaño muestral de 31 sujetos portadores de mutaciones (21 SQTL, de los que 12 eran probandos y 9 familiares; 10 SB, 3 probandos y 7 familiares).

De acuerdo con los criterios mencionados anteriormente, 15 de los 31 sujetos analizados cumplían criterios diagnósticos de la canalopatía en cuestión descritos en la tabla IV.4.1, lo que supone un 48,3 % del total. A continuación y en las tabla 3 y 4 se exponen los resultados en función del tipo de canalopatía y el análisis comparativo de la expresión fenotípica entre probandos y familiares.

Síndrome de QT largo

De los 21 pacientes genotipados para el SQTL tan sólo 10 cumplían criterios de diagnósticos de Schwartz de alta probabilidad de padecer un SQTL (un 47,2 %). 4 pacientes presentaban probabilidad intermedia para SQTL (19 %) y 7 pacientes mostraron una baja probabilidad de padecer SQTL de acuerdo con lo criterios diagnósticos actuales (33,3%). En la figura IV.4.2 se representa la diferencia entre probandos y familiares de la puntuación de Schwartz.

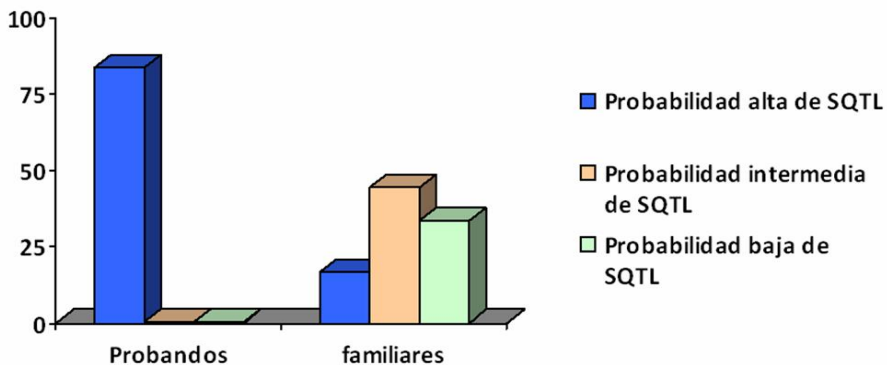


Figura IV.4.2: Probabilidad de padecer SQTL según el Índice de Schwartz en probandos y familiares. Nótese la alta proporción de familiares asintomáticos con baja o intermedia probabilidad para SQTL respecto a los probandos.

Como se aprecia en la figura IV.4.3A, esta alta proporción de pacientes que no cumplen criterios de SQTL muestran, en general, valores de intervalo QTc normales o en límite superior de la normalidad, lo que hace que su puntuación final de Schwartz esté por debajo de 4 puntos. El coeficiente de correlación Rho de Spearman para ambas variables fue de 0,89, es decir, alta correlación entre ambos parámetros. Analizando por subgrupos, y como se muestra en la figura IV.4.3A, la proporción de pacientes que presenta puntuación de Schwartz inferior a 4 puntos es significativamente mayor entre los familiares directos, habitualmente asintomáticos, que entre los casos índices. La mediana de la puntuación de Schwartz para el grupo de probandos fue de 4,25 mientras que en el grupo de familiares fue de 1,5 ($p=0,02$). La mayoría (7 de 9) de los familiares asintomáticos tenían un índice de Schwartz inferior a 4.

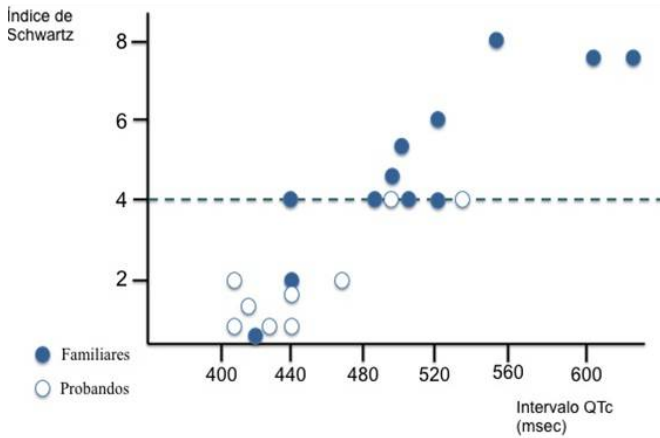
Los valores del intervalo QTc fueron los siguientes: el grupo de casos índice tuvo un intervalo QTc medio de $523,1 \pm 92,3$ milisegundos mientras que en

familiares era de $451,2 \pm 48,3$ milisegundos ($p < 0,05$), figura 3B. Interesantemente, no todos los probandos mostraron intervalo QTc prolongado ni puntuación de Schwartz mayor o igual a 4. De hecho, dos casos índice que habían presentado episodio de fibrilación ventricular mostraron ECG de superficie normales y su puntuación de Schwartz indicaba baja probabilidad de SQTL.

Síndrome de Brugada

De los 10 casos portadores de mutación en SCN5A causante de SB tan sólo 4 cumplían los criterios vigentes para el diagnóstico de esta canalopatía. Este porcentaje era mayor en los probandos que en los familiares directos (tabla IV.4.2). De los 3 casos índice uno, que se había presentado como fibrilación ventricular, no cumplía criterios diagnósticos al no mostrar el patrón de Brugada en ningún momento tras flecainida intravenosa (familia 2 en tabla IV.4.1). En este caso el diagnóstico fue posible gracias al estudio genético y al test farmacológico en dos familiares directos que sí cumplían criterios diagnósticos al desarrollar el patrón de Brugada tipo 1 tras flecainida (figura IV.4.4).

En otro caso el ECG presentaba el patrón tipo 1 en una sola derivación, por lo que no cumplía los criterios diagnósticos.



B

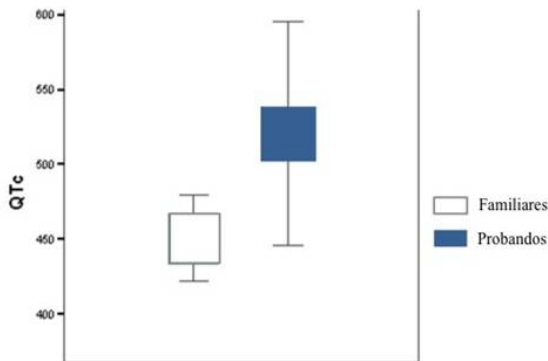


Figura IV.4.3: A: Gráfico representativo de la distribución de los intervalos QTc en probandos (color azul) y familiares (color blanco). Se observa la buena correlación entre los valores del intervalo QTc y el Índice de Schwartz. La línea de puntos representa el valor 4 del Índice de Schwartz a partir del cual el diagnóstico de SQTl es probable. Nótese la gran cantidad de familiares que no alcanzan dicho valor y los dos casos índice, ambos con historia de FV, con puntuación inferior a 2. B: Comparación de la longitud del intervalo QTc entre probando y familiares.

Síndrome de QT largo			
	Probandos(n=12)	Familiares (n=9)	Valor P
Variables Clínicas			
Síncope (%)	66,6	0	0,01
Parada cardíaca (%)	91,6	0	0,001
Sordera congénita (%)	1	0	NS
Variables electrocardiográficas			
Intervalo QTc (ms)	523,1 ± 92,3	451,2 ± 48,3	0,02
FC (lpm)	62	68	NS
Alternancia de la onda T (%)	8,3	0	NS
Torsade de Pointes (%)	8,3	0	NS
Puntuación de Schwartz	4	1,5	0,02

Tabla IV.4.3

Test farmacológicos

En los probandos y/o familiares con ECG normal o que no cumplían criterios diagnósticos se realizó test farmacológico con epinefrina y/o flecainida en función de la sospecha clínica. El test de epinefrina ayudó a confirmar el diagnóstico en una familia con una mutación en *KCNH2*, todos asintomáticos y familiares de un sujeto con muerte súbita a los 25 años de edad (figura IV.4.4A). En el caso del SB, el test de flecainida demostró el patrón tipo 1 en dos familiares directos de la probando con FVI y una mutación en *SCN5A*, confirmando el diagnóstico en los 3 sujetos (figura IV.4.4B).

Síndrome de Brugada			
	Probandos(n=3)	Familiares (n=7)	Valor P
Síncope	1 (33 %)	1 (14 %)	NS
Fibrilación Ventricular	2 (66 %)	0 (0%)	NS
Patrón tipo 1 espontáneo o tras flecainida (%)	2 (66,6%)	2 (28 %)	NS
Criterio diagnóstico positivo	2 (66 %)	2 (28 %)	NS

Tabla IV.4.4

DISCUSIÓN

El diagnóstico de los trastornos de los canales iónicos cardíacos en ocasiones no es sencillo. Para ello se establecieron hace años unos criterios diagnósticos que aún siguen vigentes (tablaa 1.1 y 1.3).^{7,8} La observación de que numerosos casos de pacientes con diagnóstico genético confirmado de SQT1 y SB no cumplían criterios diagnósticos no es reciente, si bien no hay ningún estudio en concreto que verifique su sensibilidad en una muestra genotipada de pacientes.^{3,18}

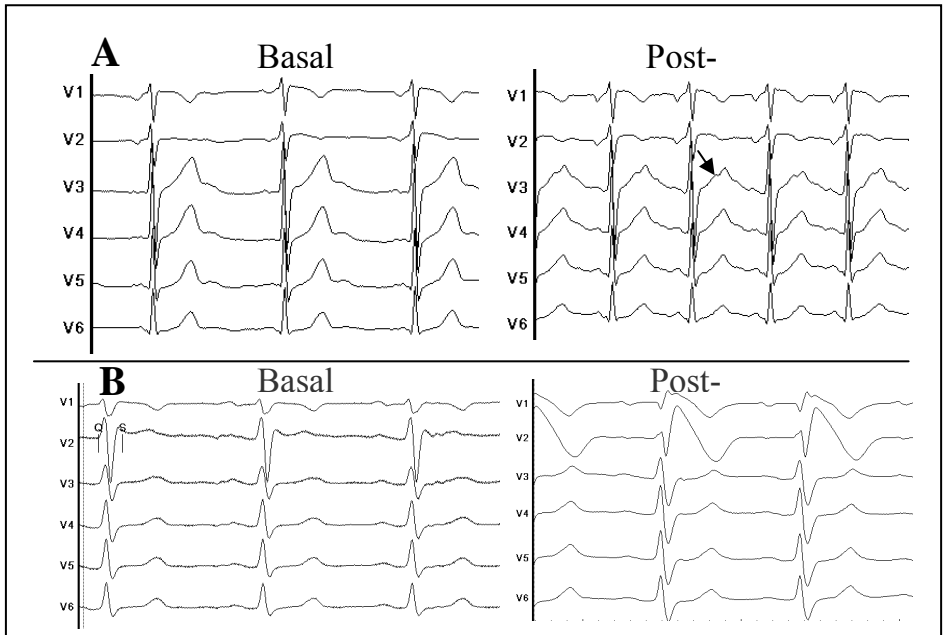


Figura IV.4.4: Test farmacológico en casos dudosos (ECg a 50 mm/seg.). A: Corresponde a un familiar portador de mutación en *KCNH2*, hermano de un hombre con muerte súbita y autopsia. Sin hallazgos patológicos. Nótese la onda T mellada en su rama ascendente tras la

infusión de adrenalina, signo característico de SQTL tipo 2¹⁶. B: Test de flecainida en familiar directo de mujer afectada por FV y ECG de superficie normal. El ECG de base ya sugiere la presencia de SB.

Nosotros presentamos una serie de pacientes con SQTL y SB con diagnóstico genético altamente probable en los que hemos estudiado cada uno de los criterios diagnósticos. Nuestro principal hallazgo es que menos de la mitad de los pacientes serían diagnosticados de canalopatía altamente probable en caso de que no dispusiéramos del estudio genético y, eventualmente, de los test farmacológicos. Este hecho ha sido más acentuado en familiares asintomáticos, en los que en más del 70 % de los casos no se cumplían criterios diagnósticos. En el caso del SB ya se sugirió en un trabajo reciente que era necesaria una revisión para incluir los casos que mostrasen el patrón tipo 1 en una sola derivación, ello aumentaría la sensibilidad diagnóstica en nuestra serie al haber un paciente genotipado que mostró el patrón en una sola derivación.¹⁹

El hecho de padecer una canalopatía silente o con baja penetrancia no la exime del potencial riesgo de producir arritmias ventriculares y muerte súbita.²⁰⁻²² En la serie de Priori *et al* se demostró que la penetrancia clínica en ciertas familias con muerte súbita familiar podía ser extremadamente baja para el SQTL.³ Asimismo, en el registro CASPER de fibrilación ventricular idiopática se demostró que de 63 pacientes analizados con ECG normal, en 24 se demostró la existencia de una canalopatía subclínica desenmascarada gracias a los tests farmacológicos y genéticos.⁹ En el trabajo que presentamos 1 paciente con SQTL y uno con SB no cumplían criterios diagnósticos y se habían presentado como FVI. Aunque el intervalo QTc > 500 milisegundos y el patrón de Brugada espontáneo tipo 1 parecen aumentar el riesgo de muerte súbita,^{23,24} el hecho de no mostrar estas alteraciones en el ECG de superficie reduce el riesgo arrítmico, pero no lo elimina por completo. Por ello, es relevante detectar estos casos de familiares asintomáticos para poder establecer medidas preventivas como la evitación de fármacos y situaciones

potencialmente inductores de arritmias, y considerar el tratamiento con betabloqueantes en el caso del SQTL.

La identificación de una mutación en un sujeto en el cuál sospechamos una canalopatía debe ser convenientemente interpretada. Nuestro estudio sugiere que el test genético puede ser determinante para alcanzar el diagnóstico de una canalopatía oculta. Sin embargo, un hallazgo genético sin clara repercusión o cosegregación familiar con la patología puede llevar a error.^{14, 25} Por ello las mutaciones genéticas encontradas deben ser convenientemente evaluadas e interpretadas por un equipo experto y conocedor de la genética cardiovascular. Todas las mutaciones presentes en nuestros pacientes mostraban muy alta probabilidad de ser causantes de SQTL o SB. Esto lo razonamos en base a la posición en la proteína del aminoácido afectado, el tipo de cambio aminoacídico resultante y la afectación de la estructura de la proteína esperable.¹⁴ En algunos casos la mutación estaba descrita previamente en la literatura, a veces incluso con estudio de las propiedades electrofisiológicas del canal “in vitro”, y la conclusión sobre sus posibles efectos patogénicos en estos casos fue más evidente.^{17,26,27}

Los criterios diagnósticos vigentes no tienen en cuenta los hallazgos genéticos a la hora de establecer la probabilidad de padecer la canalopatía en cuestión. En nuestra serie de pacientes la sensibilidad de los criterios vigentes actualmente no llegó al 50 %. Asimismo, aunque en el SB sí se considera la respuesta a fármacos bloqueantes de los canales sodio dentro de los criterios, en el SQTL el test de epinefrina no está incluido en su valoración. El test de epinefrina, validado en diferentes protocolos por el grupo de Shimizu y por el grupo de la Clínica Mayo,^{16,28,29} contribuye a aumentar la precisión diagnóstica de los hallazgos genéticos dudosos o no fácilmente interpretables, sobre todo en casos de SQTL tipo I. En dichos trabajos proponen que el aporte del test de epinefrina supone un elevado valor predictivo negativo (hasta el 96 %) en descartar que el hallazgo genético sea casual, haciendo patente un fenotipo que se mostraba oculto en el ECG basal. En nuestra serie, tal y como se aprecia en la figura IV.4.2A, encontramos sujetos

portadores de mutación en SCN5A y KCNH2 con intervalo QTc normal. La realización del test de epinefrina en una de estas familias, a pesar de no ser en KCNQ1 la mutación sino en KCNH2, posibilitó en diagnóstico en 3 miembros afectados (figura IV.4.4A). Tal y como muestran nuestros resultados, el test farmacológico con epinefrina o flecainida debe ser contemplado no solo en probandos con fenotipo negativo, sino también en familiares; en ocasiones, como en el caso del SB mostrado en la figura 4A, el caso índice muestra un fenotipo negativo y no cumple criterios diagnósticos, con lo que el diagnóstico no se alcanza. Fue el estudio de los familiares mediante test con flecainida el que permitió alcanzar el diagnóstico de SB en el probando que compartía la mutación con los portadores silentes.

En nuestra serie, la combinación del uso del test genético y farmacológico nos ha ayudado a llegar al diagnóstico en todas las familias (n= 31 sujetos estudiados). La inclusión en los criterios diagnósticos del test genético con hallazgo de mutaciones con alta probabilidad patogénica junto con el test de adrenalina y/o flecainida puede ayudar a incrementar la sensibilidad para el diagnóstico de forma significativa.

CONCLUSIONES

Los criterios diagnósticos actuales para canalopatías tuvieron una baja sensibilidad en nuestra muestra de pacientes y familiares genotipados. Esto fue más acentuado en el grupo de familiares asintomáticos, que mostró una muy baja penetrancia con alta prevalencia de ECG de superficie normal. En contextos sugerentes de posible canalopatía (FVI, muerte súbita inexplicada o síncope de perfil cardiogénico sin aparente cardiopatía), el uso combinado de los test genéticos y farmacológicos en pacientes y familiares contribuye a aumentar el rendimiento del

protocolo diagnóstico detectando casos de SQTL y SB con fenotipo basal no diagnóstico.

Bibliografía

1. Behr ER, Casey A, Sheppard M, Wright M, Bowker TJ, Davies MJ, et al. Sudden arrhythmic death syndrome: a national survey of sudden unexplained cardiac death. *Heart* 2007;93:601e5.
2. Marban E. Cardiac channelopathies. *Nature* 2002;415:213e18
3. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome clinical impact. *Circulation*. 1999;99:529–33.
4. Behr E, Wood DA, Wright M, Syrris P, Sheppard MN, Casey A et al. Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *The Lancet* 2003;362:1457e9.
5. Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M, Syrris P, Hughes S, Tome Esteban MT et al. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J* 2008;29:1670e80.
6. Tan HL, Hofman N, van Langen IM, van der Wal AC, Wilde AA. Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation* 2005;112:207e13.
7. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation*. 1993;88:782-4.
8. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D et al. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 2005;111:659e70.
9. Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation*. 2009;120:278–85.
10. Jiménez-Jáimez J, Tercedor-Sánchez L, Alvarez-López M, Martínez-Espín E, Sebastián Galdeano R, Almansa-Valencia I, et al. Estudio genético en el síndrome de QT largo en nuestro medio. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:71-4.

11. Lande G, Kyndt F, Baró I, Chabannes D, Boisseau P, Pony JC et al. Dynamic analysis of the QT interval in long QT1 syndrome patients with a normal phenotype. *Eur Heart J*. 2001r;22:410-22
12. Krahn AD, Gollob M, Yee R, Gula LJ, Skanes AC, Walker BD, et al. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of adrenaline and procainamide infusion. *Circulation*. 2005;112:2228–2234.
13. Fish JM, Antzelevitch C. Role of sodium and calcium channel block in unmasking the Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2004;1:210-7
14. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, Harris-Kerr C, Pungliya MS, Alders M, et al. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation*. 2009;120:1752-60.
15. Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart*. 1920;7:353-70.
16. Shimizu W, Noda T, Takaki H, Nagaya N, Satomi K, Kurita T. Diagnostic value of epinephrine test for genotyping LQT1, LQT2, and LQT3 forms of congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2004;1:276-83
17. Amorós I, Jiménez-Jáimez J, Tercedor L, Barana A, Gómez R, de la Fuente MG et al. Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2011;8:463-70.
18. Vincent GM, Timothy KW, Leppert M, Keating MT. The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long QT syndrome. *N Engl J Med*. 1992;327:846–852.
19. Richter S, Sarkozy A, Paparella G, Henkens S, Boussy T, Chierchia GB et al. Number of electrocardiogram leads displaying the diagnostic coved-type pattern in Brugada syndrome: a diagnostic consensus criterion to be revised. *Eur Heart J*. 2010;31:1357-64.
20. Roden DM, Yang T. Protecting the heart against arrhythmias: potassium current physiology and repolarization. *Circulation* 2005; 112:1376– 8.
21. Goldenberg I, Horr S, Moss AJ, Lopes CM, Barsheshet A, McNitt S et al. Risk for life-threatening cardiac events in patients with genotype-confirmed long-QT syndrome and normal-range corrected QT intervals. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:51-9

22. Varró A, Papp JG. Low penetrance, subclinical congenital LQTS: concealed LQTS or silent LQTS? *Cardiovasc Res.* 2006;70:404-6
23. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M et al. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1866-74.
24. Probst V, Veltmann C, Eckardt L, Merregalli PG, Gaita F, Tan HL et al. Long-term prognosis of patients diagnosed with Brugada syndrome: Results from the FINGER Brugada Syndrome Registry. *Circulation.* 2010 ;121:635-43.
25. Darbar D. Is it time to develop a "pathogenicity" score to distinguish long QT syndrome causing mutations from "background" genetic noise? *Heart Rhythm.* 2009;6:1304-5
26. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2005;2:507-17.
27. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 2000;102:1178-85.
28. Shimizu W, Noda T, Takaki H, Kurita T, Nagaya N, Satomi K, et al. Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:633-642.
29. Vyas H, Hejlik J, Ackerman MJ. Epinephrine QT stress testing in the evaluation of congenital long-QT syndrome: diagnostic accuracy of the paradoxical QT response. *Circulation.* 2006;113:1385-92.

IV.5: Novel SCN5A mutation associated with Idiopathic Ventricular Fibrillation due to subclinical Brugada Syndrome.⁹⁹

Juan Jimenez-Jaimez, Miguel Alvarez-Lopez, Luis Tercedor Sanchez, Pablo Santiago, Maria Algarra, Rocio Peñas, Francisca Valverde, Rafael Melgares Moreno. Novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation due to subclinical Brugada syndrome. *Cardiogenetics* 2012; 2:e1;1-5

VER ANEXO IV

Abstract

Idiopathic ventricular fibrillation can be caused by subclinical channelopathies such as Brugada syndrome. Our objective is to study the clinical behaviour of a new *SCN5A* mutation found in a woman with idiopathic ventricular fibrillation. A 53-year-old woman presented with multiple episodes of ventricular fibrillation, a structurally normal heart and normal baseline electrocardiogram. Genetic testing included *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2* and *KCNJ2* and identified a mutation in *SCN5A* (D1816fs/g98747-98748insT). We studied 15 immediate family members by means of electrocardiogram, echocardiogram, flecainide challenge test and genetic study. Eight subjects had the mutation. The flecainide challenge test was positive for Brugada syndrome in two subjects in the case group and none in the control group. The PR and QRS intervals on the baseline electrocardiogram were longer in the case group. The left atrial volume indexed to body surface was higher in the case group, likely due to the fact that two patients with the mutation had atrial fibrillation and none had it in the control group. The D1816fs/g98747-98748insT mutation in *SCN5A* may be associated with idiopathic ventricular fibrillation and Brugada syndrome with a broad phenotypic spectrum and incomplete penetrance. Genetic testing may be useful to identify the etiology of idiopathic ventricular fibrillation in patients with a negative thorough clinical evaluation.

INTRODUCTION

Ventricular fibrillation (VF) is a lethal arrhythmia that leads to a dramatic reduction in cardiac output and causes cardiac arrest and sudden death in several minutes if cardiopulmonary resuscitation manoeuvres are not begun quickly. It usually occurs as a result of structural heart conditions such as ischaemic heart disease and cardiomyopathy.^{1,2} After ruling out structural abnormalities, the most prevalent cause of VF are genetic channelopathies, including long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome (BS) and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.³⁻⁵ If all diagnostic tests are negative, it is classified as idiopathic ventricular fibrillation (IVF). This condition is uncommon because diagnostic studies have an increasingly wide scope and provide a confirmed diagnosis in most cases.⁶

Subclinical channelopathies are one possible cause of IVF. Primary cardiac ion-channel diseases can be difficult to diagnose because of their limited phenotypic expression in surface electrocardiograms (ECG) and in drug challenge tests due to their incomplete genetic penetrance.⁷ In these cases, genetic studies are of growing importance.⁶ The increasing availability of genetic studies has led to a larger number of subclinical channelopathy diagnoses that initially present as IVF.⁸ However, genetic findings must be interpreted correctly, since most mutations detected have not been described and many are not clinically relevant.⁹

We conducted an exhaustive clinical study of a novel mutation in *SCN5A* (D1816fs/g 98747-98748insT) in a Spanish family in which the index case presented as IVF. We have not found previous descriptions of this variant and there are no functional studies in a cellular context. Previous studies have involved mutations in nearby locations on the protein both in LQTS and also in BS,^{10,11} but there is no evidence of this mutation causing cardiac ion-channel diseases or IVF.

Diagnostic possibilities include LQTS type 3 or BS, or no pathogenic implications in the case of this mutation. Our main objective was to study the clinical

pathogenicity and association of this mutation with possible subclinical channelopathy in the form of LQTS type 3 or BS.

MATERIAL AND METHODS

Description of the index case

A 53-year-old woman without personal or family history of interest presented an episode of VF that was successfully treated. The initial study involved an ECG (Figure IV.5.1), echocardiogram, cardiovascular magnetic resonance and coronary angiography. The QTc interval calculated by Bazett's formula¹² was 412 milliseconds and there were no signs suggesting Brugada pattern in right precordial leads. The left ventricular ejection fraction was 60%, with no evidence of hypertrophy or chamber dilatation. Coronary arteries showed no significant atherosclerotic lesions.

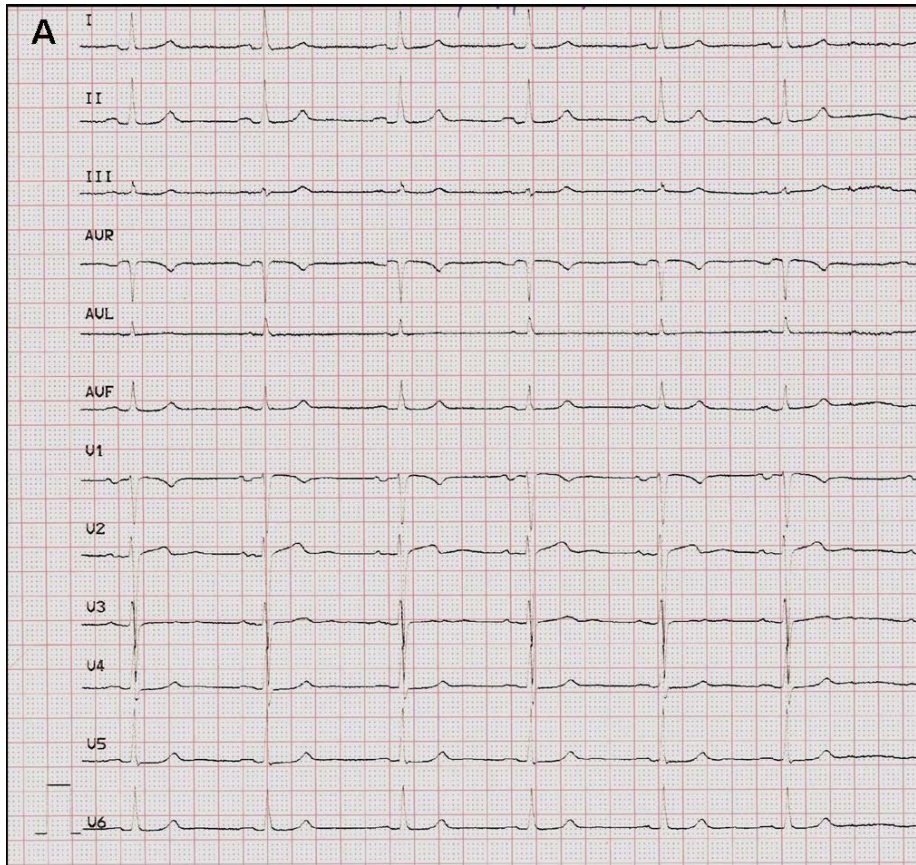


Figure IV.5.1: Baseline electrocardiogram of the index case showing sinus rhythm at 55 beats per min, normal PR, QRS and QTc intervals and absence of Brugada pattern findings.

A drug challenge test was performed with an initial bolus of $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}$ epinephrine, followed by continuous infusion at $0.10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. for 10 min., performing a twelve-lead ECG. The test was negative for LQTS according to current criteria.¹³ After a washout period, we performed a flecainide challenge test giving $2 \text{ mg}/\text{kg}$ in a continuous infusion for 10 min,¹⁴ with a baseline ECG and further recordings every 2 min. This was negative for BS.

An electrophysiological study was performed in view of recurrent episodes of VF triggered by ventricular extrasystoles on the upper-left axis and short accompanying interval (Figure IV.5.2A), which was resistant to continuous infusion of beta blockers, amiodarone, procainamide and isoprenaline. Along the mid-apical septum of the right ventricle, Purkinje potentials were recorded at a level of the distal insertion of the right branch. These potentials preceded the onset of the QRS of the VF-inducing ventricular extrasystole by 45 ms, and the VF was self-limiting on one occasion. Radiofrequency applications eliminated the ventricular extrasystoles and VF episodes (Figure IV.5.2B). On day 7, a single-chamber automatic defibrillator was implanted, and during 18 months of follow-up, the device had not recorded any ventricular arrhythmias and the ECG remains normal.

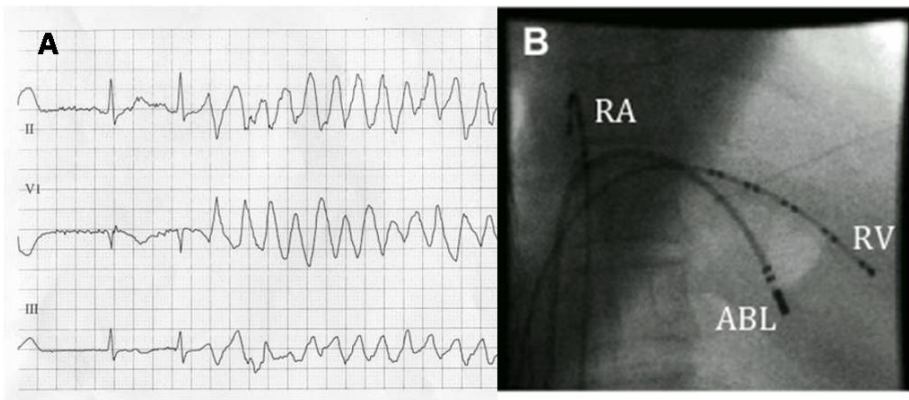


Figure IV.5.2: **A)** Electrocardiogram recording on admission, with ventricular fibrillation episode triggered by ventricular extrasystoles (arrow). **B)** Fluoroscopy-guided radiofrequency ablation of the ventricular focus triggering the VF episodes. RA, right atrium; RV, right ventricle; ABL, ablation catheter.

In view of all these data, the final diagnosis was IVF. Considering how useful genetic testing has been in previous studies for LQTS and BS in patients with IVF,^{6,8} we performed genetic sequencing of the genes *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*,

KCNE2 and *KCNJ2*. Analysis included the entire genes. In *SCN5A* we identified a heterozygous insertion-type mutation (D1816fs/g98747-98748insT) in exon 28, affecting the C-terminal domain (Figure IV.5.3). There were no mutations in the rest of the genes.

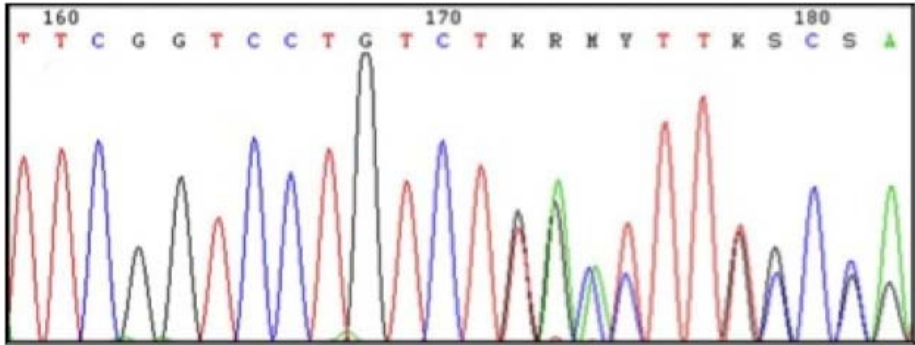


Figure IV.5.3: Heterozygous insertion mutation D1816fs/g98747-98748insT in exon 28 of *SCN5A*.

Study population

16 subjects were included (15 immediate family members and the index case). The family tree is shown in Figure IV.5.4. A detailed history was taken on all subjects, with emphasis on past syncopes. The study protocol for these subjects consisted of an ECG, echocardiography, flecainide challenge test and genetic study focused on the *SCN5A* mutation found in the proband. All subjects signed an informed consent in order to be included in the study. All the procedures performed were approved by the Ethics Committee at our hospital.

One of the immediate family members was excluded from the electrocardiographic, echocardiographic and drug challenge tests since she had Tetralogy of Fallot, having undergone surgery in childhood for this condition, which altered the baseline values of these studies.

Electrocardiogram

The surface ECGs at 25 and 50 mm/s were evaluated by two cardiologists specialised in electrophysiology. The PR, QRS and QTc intervals were analysed using Bazzet's formula.¹² The presence of type 1 Brugada pattern was defined as persistent ST segment elevation in right precordial leads with typical morphology. The presence of atrial fibrillation on ECG was confirmed with a second ECG three months later.

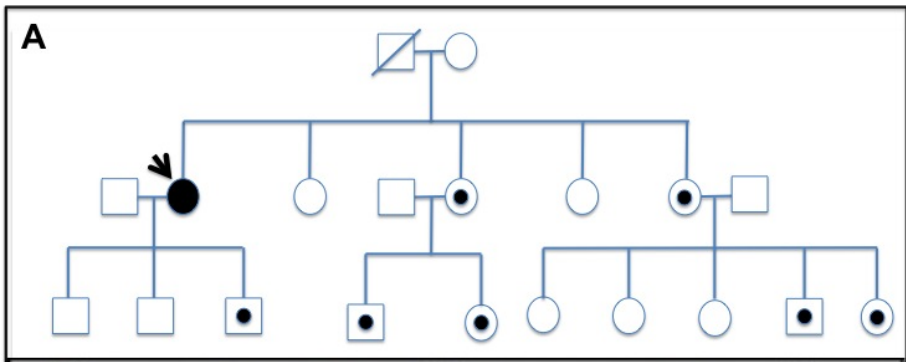


Figure IV.5.4: Family tree: The arrow points to the proband and genetic carriers have a black circle in the middle.

Measurement of echocardiographic parameters

Echocardiographic studies were performed with the Acuson X300 System (Siemens®). All measurements were taken following the guidelines of the American Society of Echocardiography.¹⁵ The left ventricular ejection fraction was calculated using the modified Simpson method. The left atrial anteroposterior diameter was measured on the parasternal long axis at ventricular end-systole. The left atrial lateral diameter was measured in the apical four-chamber view, also at ventricular end-

systole. The left atrial volume was calculated by biplane measurements in the apical two- and four- chamber views at ventricular end-systole. The endocardial border of the left atrium was traced, excluding pulmonary veins and the left atrial appendage. The left atrial volume was later calculated using the modified Simpson method, indexing it to body surface area. Data were obtained on peak velocity of early and late diastolic mitral filling (E and A waves respectively).

Flecainide challenge test

For the drug challenge test we administered flecainide intravenously peripherally, and performed continuous electrocardiographic monitoring. Two mg/kg flecainide was infused as a continuous infusion for 10 min., performing a baseline ECG and repeating a recording every 2 min. The right precordial leads were located in the usual position (fourth intercostal space) and also one intercostal space higher up. ST segment behaviour was monitored from V1-V3, looking for any signs of BS. The test was classified as positive, negative or indeterminate according to previously published standards. It was considered positive if an ST elevation >1 mm was observed in right precordial leads with Brugada pattern typical morphology.¹⁴

Genetic study

We took a blood sample for direct sequencing and DNA analysis of immediate family members in order to identify the presence of the *SCN5A* mutation that had been found in the index case (Figure IV.5.3).

Statistical analysis

The study subjects (n=16) were divided into two groups for statistical comparison. One group consisted of patients with the *SCN5A* mutation (case group, n=8) and the other group was composed of immediate family members without the *SCN5A* mutation (control group, n=8). A statistical comparison was performed in all

cases using the aforementioned electrocardiographic, echocardiographic and drug challenge test data as dependent variables.

Nonparametric tests were used to calculate the *P*: the Mann Whitney U test to compare the mean and standard deviation and Fisher's exact test and the Chi-square test to compare proportions. A *P* value <0.05 was considered as statistically significant. To study concordance between the two observers in the analysis of electrocardiographic parameters we used a nonparametric correlation test (Spearman's Rho coefficient). All calculations were performed with SPSS 17.0 (Chicago, USA).

RESULTS

Eight immediate family members had the mutation in *SCN5A* found in the index case and eight did not (Figure IV.5.4). There were no statistically significant differences between groups in terms of age or sex. One subject in the group with the *SCN5A* mutation had suffered an episode of VF (the proband) and another subject had had an exertional syncopal episode of uncertain origin ten years before the study and is under follow up; the rest were asymptomatic. All subjects in the control group were asymptomatic. The result of the statistical comparison between the two groups analysing electrocardiographic, echocardiographic and flecainide test parameters is shown in Table IV.5.1.

Table 1. Statistical comparison between the two groups analysing electrocardiographic, echocardiographic and flecainide test parameters.

Variable	SCN5A + (D1816fs/g98747-98748insT) (n=8)	SCN5A – (n=8)	P
Clinical parameters			
Age (years)	38±15	31±19	NS
Men/Women	3/5	2/6	NS
Syncope	1 (12.5%)	0 (0%)	NS
VF	1 (12.5 %)	0 (0%)	NS
ECG parameters			
Spontaneous Brugada pattern (%)	0 (0%)	0 (0%)	NS
PR interval (ms)	196.7±27	150±29	0.01
QRS interval (ms)	112.8±16	90.8±12	0.04
QTc interval (ms)	393±25	399±22	NS
Atrial fibrillation (%)	2 (25%)	0 (0%)	NS
Echocardiographic parameters			
LA anteroposterior diameter (mm)	41.6±3.8	32.3±4.7	<0.05
LA lateral diameter (mm)	43.1±6.5	39.8±5	NS
Peak E wave velocity (cm/s)	75±11	84±9	NS
Peak A wave velocity (cm/s)	50±20	61±19	NS
Left ventricular EF (%)	63%	61%	NS
Indexed LA volume (mL/m ²)	40.9±8.9	32.4±5.8	<0.05
Positive drug test for BS (%)	2 (25%)	0 (0%)	NS

LA, Left atrium; EF, Ejection fraction; BS, Brugada syndrome; VF, Ventricular fibrillation; NS, Not significant.

Table IV.5.1

Electrocardiogram abnormalities

There was very high correlation between the two observers' measurements of the PR and QTc intervals and high correlation in their evaluation of the QRS interval (Table IV.5.2).

No patients in the case group or control group showed the Brugada pattern on their baseline ECG. The QTc interval was similar in both groups without statistically significant differences. The value of the PR interval in milliseconds was significantly higher in subjects with the SCN5A mutation, compared with the controls (196.7±27.6

vs. 150 ± 28.9 milliseconds, respectively). The QRS interval was also statistically significantly higher in the cases compared with the controls (112.8 ± 16.6 vs 90.8 ± 12.4 milliseconds, respectively). Atrial fibrillation was present in two cases and in none of the controls (Table IV.5. 1).

Table 2. Concordance between the two observers for electrocardiogram measurements expressed by Spearman's Rho correlation coefficient (0: no concordance, 1: full concordance).

		Observer 1	Observer 2	Spearman's Rho coefficient
PR interval (ms)	Cases	196.7 ± 25	196.7 ± 29	0.947
	Controls	155 ± 22	145 ± 30	
QRS interval (ms)	Cases	116.5 ± 23	109.1 ± 13	0.744
	Controls	94.2 ± 14	87.5 ± 10	
QTc interval (ms)	Cases	390.2 ± 26	395.8 ± 24	0.912
	Controls	403 ± 20	395 ± 22	

Table IV.5.2

Alterations in echocardiographic parameters

The left atrial volume indexed to body surface area was significantly higher in the *SCN5A* mutation cases compared with controls, although this included the two patients that had atrial fibrillation. The mean volume indexed to body surface area in the cases was 40.92 ± 8.9 mL/m² and in controls it was 32.4 ± 5.8 mL/m². The volume was bigger in the two subjects who presented atrial fibrillation compared with the others. These two cases had the *SCN5A* mutation and one of them was the index case that had had an episode of VF.

The left atrial anteroposterior diameter measured on the parasternal long axis was greater in the cases than in the controls. However, the difference in lateral diameter was not of statistical significance.

The other echocardiographic parameters did not differ between the groups, including left ventricular systolic function and diastolic transmitral flow velocities.

Flecainide drug test

Two cases with *SCN5A* mutation developed the typical Brugada pattern following intravenous infusion of flecainide. They were both asymptomatic and one of them had a QRS interval in the upper limit of the normal range in the baseline ECG (Figure IV.5.5). However, the index case, which showed a more aggressive clinical phenotype with VF, did not have any electrocardiographic changes following the drug challenge.

No subjects were positive for Brugada syndrome pattern in the control group. This result was not statistically significant (Table IV.5.1).

Flecainide test sensitivity and specificity for the identification of the *SCN5A* mutation carriers was 29% and 100% respectively.



Figure IV.5.5: Positive flecainide test in two direct relatives of the proband.

DISCUSSION

A diagnosis of IVF means that it has been impossible to diagnose the underlying aetiology in a case of recovery from cardiac arrest. Recently, genetic studies have been found to play a part in the diagnostic protocol, detecting masked channelopathies or mutations that generate major distortions in proteins in cardiac ion channels, and which are predisposing factors for VF. Cardiac sodium channel alpha subunit mutations (Na1.5V) are a known cause for Brugada syndrome, being present in around 20 % of patients. However, having a *SNC5A* mutation has been also related to Long QT syndrome, dilated cardiomyopathy and cardiac conduction system disease. So *SCN5A* mutations can lead to ventricular fibrillation and sudden

death by different mechanisms, suggesting it plays an important role in cardiac electrical stability.

In this study we have provided clinical evidence of the causality of a previously unde- scribed mutation in *SCN5A* in BS, which pre- sented as IVF. We identified the nucleotide insertion mutation D1816fs/g98747-98748insT, located in exon 28, in the C-terminal region of the alpha subunit of the sodium channel, in a Spanish family affected by sudden cardiac death of unknown aetiology. This variant was not present in a sample of 200 healthy control subjects.

We have not found previous descriptions of this variant and there are no studies that analyse the behaviour of this variant in a cellular context. However, there is consensus that the first portion of the C-terminal region, which has a helical structure, plays a determinant role in stabilising the channel inactivation process, thus contributing to cardiac repolarisation.¹⁷ Previous studies have analysed the functional consequences of mutations in nearby regions in the protein on the physiology of cardiac action potential. Thus, Tan *et al.*¹¹ described a family with carriers of the L1821fs mutation who developed different conduction disturbances, atrial fibrillation and ventricular tachycardia. Furthermore, Cormier *et al.*¹⁰ evaluated the functional changes associated with channel mutation at position 1885, finding a tenfold associated increase in the percentage of channels that fail in the inactivation process, leading to functional gain and therefore potential QT interval prolongation.

The insertion-type mutation that we have described here changes the reading frame in a large number of nucleotides, generating a truncated protein. There is a high probability that the patient's IVF is caused by this mutation because it changes the amino acid sequence in an important region in the *SCN5A* ion channel, with a probable impact on channel physiology and action potential. A functional study in a cellular model could be helpful to support the pathogenicity of the mutation and to

evaluate its functional effect. This is not always feasible, although, as our work suggests, familial cosegregation data and clinical studies are the main way to evaluate the pathogenicity of a novel mutation. In this case we used a clinical study protocol to test the Spanish family carrying the mutation in the C-terminal region of *SCN5A*. Our aims in doing so were to identify the possible association of this mutation with subclinical channelopathy and to analyse its clinical behaviour.

The diagnoses of LQTS and the BS are mainly based on clinical, electrocardiographic and drug challenge test findings.¹⁸ Some studies have associated BS with prolonged conduction intervals in surface ECGs, especially with reference to the QRS interval.¹⁹ Drug challenge tests with epinephrine and flecainide show low sensitivity but high specificity in detecting channelopathies, and so they provide a valuable diagnostic tool in the study of this novel mutation in *SCN5A*.⁷ Echocardiography might play a role in *SCN5A* mutation carriers presenting with atrial fibrillation, particularly focusing on left atrial size and volume measurements, which have been previously studied in BS.²⁰

Our results suggest an association between this mutation and baseline and post-flecainide electrocardiographic. Although some of these results are not statistically significant there is a clear tendency towards the association between this mutation and the presence of the Brugada pattern after the flecainide infusion. These findings suggest that the D1816fs/g98747-98748insT mutation located in exon 28 of *SCN5A* is pathogenic and is responsible for the development of BS. Likewise, our work shows a tendency to the association of this mutation with atrial fibrillation, as previously reported.²¹

Broad clinical spectrum and incomplete penetrance

A wide range of phenotypic manifestations has been reported for BS, from asymptomatic patients, to syncope and ventricular fibrillation. Similarly, the electrocardiographic manifestations of spontaneous and post-flecainide Brugada

pattern are not present in all cases.²² Our study confirms these findings in BS caused by the reported *SCN5A* mutation, with only one patient among the eight cases that were studied presenting VF, another with syncope and six being asymptomatic. Interestingly, none of them showed spontaneous Brugada pattern, and only two of them showed it following an intravenous flecainide infusion. Surprisingly, the index case who had suffered an episode of ventricular fibrillation did not have any alternation in her baseline or post-flecainide ECG, although she did have atrial fibrillation and left atrial enlargement. This is consistent with previous studies that suggest a negative prognostic value of atrial fibrillation and left atrial volume in BS.²⁰

CONCLUSIONS

The heterozygous insertion mutation D1816fs/g98747-98748insT present in exon 28 of the C-terminal region of *SCN5A*, is likely associated with BS and IVF. It also seems to promote the development of atrial fibrillation. Our study describes a broad phenotypic spectrum with a majority of asymptomatic patients, as well as low clinical penetrance in view of the normal baseline and post-flecainide ECG found in most patients. This underlines the need for a complete family study with baseline ECG and flecainide challenge test in patients who have IVF.

REFERENCES

1. Connolly SJ, Hallstrom AP, Cappato R, et al. Meta-analysis of the implantable cardioverter defibrillator secondary prevention trials: AVID, CASH and CIDS studies: Antiarrhythmics vs Implantable Defibrillator study; Cardiac Arrest Study Hamburg; Canadian Implantable Defibrillator Study. *Eur Heart J* 2000;21:2071-8.
2. Behr E, Wood DA, Wright M, et al. Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet* 2003;362:1457-9.
3. Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, et al. Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome: International Long-QT syndrome Registry Research Group. *N Engl J Med* 1998;339: 960-5.
4. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, et al. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;16:196-200.
5. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, et al. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 2002;105:1342-7.
6. Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation* 2009;120:278-85.
7. Krahn AD, Gollob M, Yee R, et al. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of adrenaline and procainamide infusion. *Circulation* 2005;112:2228-34.
8. Jiménez-Jáimez J, Tercedor-Sánchez L, Alvarez-López M, et al. Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio. *Rev Esp Cardiol* 2011;64:71-4.
9. Darbar D. Is it time to develop a "pathogenicity" score to distinguish long QT syndrome causing mutations from "background" genetic noise? *Heart Rhythm* 2009;6:1304-5.
10. Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, et al. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;277:9233-41.
11. Tan HL, Hofman N, van Langen IM, et al. Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation* 2005;112:207-13.

12. Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;7:353- 70.
13. Shimizu W, Noda T, Takaki H, et al. Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long- QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2003;41: 633-42.
14. Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, et al. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000;101:510-5.
15. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440-63.
16. Shewan LG, Coats AJ. Ethics in the author- ship and publishing of scientific articles. *Int J Cardiol* 2010;144:1-2.
17. Dhar Malhotra J, Chen C, Rivolta I, et al. Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* 2001;103:1303-10
18. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993;88:782-4.
19. Junttila MJ, Brugada P, Hong K, et al. Differences in 12-lead electrocardiogram between symptomatic and asymptomatic Brugada syndrome patients. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008;19:380-3.
20. Toh N, Morita H, Nagase S, et al. Atrial electrophysiological and structural remodeling in high-risk patients with Brugada syndrome: assessment with electrophysiology and echocardiography. *Heart Rhythm* 2010;7:218-24.
21. Morita H, Kusano-Fukushima K, Nagase S, et al. Atrial fibrillation and atrial vulnerability in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1437-44.
22. Govindan M, Batchvarov VN, Raju H, et al. Utility of high and standard right precordial leads during ajmaline testing for the diagnosis of Brugada syndrome. *Heart* 2010;96:1904-8.

IV. 6: Functional effects o a novel SCN5A mutation related to Idiopathic Ventricular Fibrillation *

Juan Jiménez-Jáimez, Luis Tercedor-Sánchez, Miguel Álvarez López, Gustavo D. Tortajada, María Algarra Cullel, Rafael Melgares Moreno.

**Arrhythmias Unit, Cardiology Department, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. Spain*

Trabajo pendiente de envío para publicación.

I.- INTRODUCTION

Idiopathic Ventricular Fibrillation (IVF) is an uncommon and lethal condition that causes sudden death. It has been suggested that the aetiology may be subclinical cardiac channelopathies that do not show their usual pathological findings in the surface electrocardiogram (ECG) but, however, they can produce ventricular arrhythmias and sudden death. Among these channelopathies we must include Long QT Syndrome (LQTS), Brugada Syndrome (BrS), Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) and Short QT Syndrome (SQTS).^{1,2}

Pharmacological tests (epinephrine and flecainide) are useful tools to unmask these concealed syndromes.³ Nevertheless, it is not impossible to have negative pharmacological tests and suffer a channelopathy and even ventricular fibrillation. Exhaustive family screening with ECG, echocardiogram and pharmacological tests is essential to verify the cosegregation of a novel mutation in a family and sometimes it gives the clue for the diagnosis.⁴⁻⁵ In some cases genetic testing is the only way to identify the underlying aetiology of IVF.¹ Genetic test is gaining importance to diagnose concealed cardiac channelopathies, but genetic results are not always easy to interpret because it is impossible to definitely know the clinical and biophysical consequences until we study the functional effects of the mutation in the sodium channel physiology. It is very useful to study the “in vitro behaviour” of ionic currents to establish a pathogenic link between a gene mutation and the observed clinical phenotype.

SCN5A mutations can cause sudden death by affecting the sodium channel properties in a variety of possible ways, such as prolonging the action potential (LQTS 3), shortening the action potential (BrS) or causing cardiac conduction system disease. We have previously described an extensive clinical study performed in a Spanish family, showing that some ECG and echocardiographic parameters were abnormal in relatives with a novel SCN5A mutation pointing to subclinical BrS.⁶

In this paper we describe the functional properties of this novel SCN5A mutation (D1816fs/g98747-98748insT) causing IVF due to familial BrS with a broad phenotypical spectrum and a low clinical penetrance.

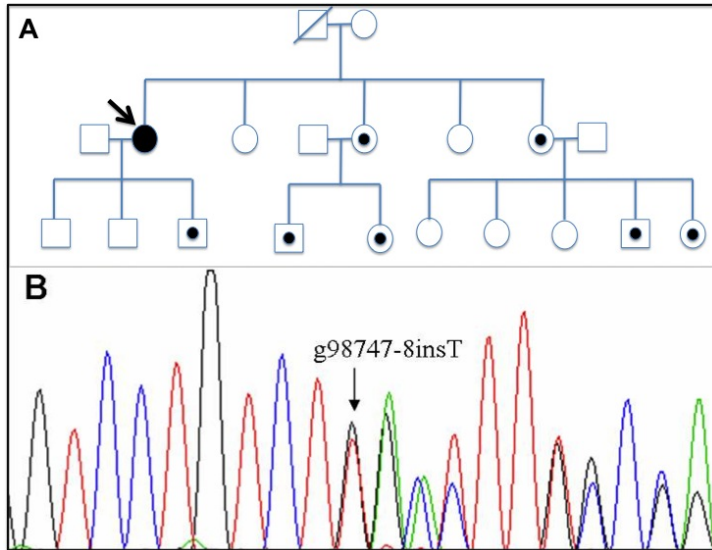


Figure IV.6.1: panel A shows the family tree. The arrow points to the index case, and all relatives carrying the heterozygous mutation are marked as black circles (females) and black squares (males). In white, relatives not carrying the *SCN5A* mutation (healthy subjects); B: Heterozygous insertion mutation D1816fs/g98747-98748insT in exon 28 of *SCN5A*.

II.- METHODS

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained for the genetic screening test in the index case and all the relatives studied. Genomic DNA was isolated from white blood cell by conventional methods. Polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism analyses were used to screen for mutations in *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2* and *SCN5A*. This identified a novel mutation in exon 28 of *SCN5A* affecting the C-terminal domain and it was present in the index case

and 7 family members (figure IV.6.1A and IV.6.1B). . There were no mutations in the rest of the genes.

Mutagénesis dirigida de los canales Nav1.5

Los genes que codifican la expresión de canal Nav1.5 WT (SCN5A) y de la subunidad beta SCN1B (hNavβ1) subclonados en el vector pCGI fueron proporcionados por la Dra. C. Bezzina, de la Universidad de Amsterdam (Amsterdam, Holanda). La mutación p.D1816fs en SCN5A se introdujo mediante el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) y fue confirmada mediante la secuenciación completa y en ambas direcciones de la región codificante de las dos cadenas de ADN.

Cultivo celular y transfecciones

Para el estudio electrofisiológico, las células de ovario de hamster chino (CHO) se transfectaron de forma transitoria con los vectores de expresión de los canales Nav1.5 WT y/o mutantes (p.D1816fs).

Las células CHO fueron cultivadas en placas de cultivo de 60 mm de diámetro con medio Ham-F12 suplementado con L-glutamina (Invitrogen, Barcelona, España), suero fetal bovino al 10% y antibióticos (800 UI de penicilina y 200 µg/mL de estreptomycin) para prevenir contaminaciones bacterianas, y mantenidas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los cultivos celulares fueron tratados con tripsina (0.5 mg/mL) cada 4-5 días. Para la transfección transitoria de los canales se utilizó el método del FuGENE XtremeGene (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Este método de consiste en la incubación del FuGENE XtremeGene, con el vector de expresión que codifica el canal Nav1.5 (0.8 µg para WT ó p.D1816fs), el que codifica la subunidad auxiliar hNavβ1 (0.8 µg), y el que codifica el antígeno de superficie CD8 (EBOpcD, 0.5 µg), conjuntamente con medio de cultivo Ham-F12

sin suero y sin antibiótico. En los experimentos en los que se co-transfectaron canales WT con canales p.D1816fs se utilizó 0.4 μg del ADNc de cada uno de ellos.

Tras las 48 h, se añadió a la placa de células transfectadas una solución de microesferas de poliestireno unidas a anticuerpos anti-CD8 (Dynabeads M-450; DYNAL, Oslo, Noruega). Los anticuerpos anti-CD8 se unían selectivamente a las células que habían sido transfectadas y expresaban en su superficie tanto el antígeno CD8 como el canal de Na^+ . De este modo, para la realización de los experimentos, las células se seleccionaron mediante su observación al microscopio por la presencia en la membrana de las microesferas de poliestireno. A continuación, las células se levantaron de la placa con rascadores de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de ellas permanecen intactas. Tras dejar reposar la suspensión de células durante 1 h a temperatura ambiente, se comenzaban los experimentos electrofisiológicos.

Soluciones

Para el registro de las corrientes, se colocó una alícuota de la suspensión de células CHO en una cámara de 0.5 mL montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Después de asentarse en el fondo de la cámara, las células fueron perfundidas a una velocidad de flujo de ≈ 1 mL/min con una solución externa que contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustado a $\text{pH}=7.4$ con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10 y EGTA 10 (ajustado a $\text{pH}=7.35$ con CsOH).

Técnicas de registro

Las corrientes generadas por los canales Nav1.5 WT y mutados fueron registradas utilizando la técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (*patch-clamp*) en su configuración de célula entera (*whole-cell*) (Hamill y cols., 1981).

Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software PCLAMP 9 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-24°C). En las condiciones experimentales utilizadas, las corrientes registradas permanecían estables durante más de 60 minutos. Asimismo para minimizar los cambios en la amplitud de las corrientes debidas a posibles variaciones en las propiedades voltaje-dependientes de los canales, los registros siempre se iniciaban tras un periodo de estabilización de 20 minutos.

Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas a partir de tubos capilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige, Tokio, Japón), utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments, Novato, CA, EEUU). Posteriormente, las micropipetas fueron pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el tamaño deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, fue de 0.5-1.5 M Ω . Las corrientes fueron muestreadas a 10 kHz, se filtradas a 5 kHz y almacenadas en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis. Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de 10 mV fueron registrados a 50 kHz, filtrados a 10 kHz y posteriormente utilizados para el cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula. En todos los experimentos, la resistencia en serie fue compensada manualmente con la unidad de

compensación de la resistencia en serie del amplificador Axopatch, alcanzándose en todos los casos una compensación superior al 80%.

Los valores medios de la resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de las células CHO fueron $1.9 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$ y $9.1 \pm 0.3 \text{ pF}$, respectivamente. Por su parte, la media de la amplitud máxima de las corrientes generadas por los canales Nav1.5 (I_{Na}) WT fue de $2.5 \pm 0.2 \text{ nA}$ ($n=21$). Por lo tanto, en estas condiciones, los posibles errores de voltaje debidos a las resistencias en serie eran mínimos ($<5 \text{ mV}$).

Protocolos de registro y análisis

Para el registro de la I_{Na} se utilizó un protocolo que consistía en la aplicación de pulsos de 50 ms de duración, desde un potencial de fijación de -120 mV hasta potenciales comprendidos entre -80 y +50 mV en incrementos de 5 mV. En cada experimento, la amplitud de la corriente, medida desde el nivel cero de corriente, se normalizó a la capacitancia de la célula (que es un índice de su tamaño) lo que permitió calcular la densidad de la corriente. Para la construcción de las relaciones densidad de corriente-voltaje se representó la densidad de la corriente en del potencial de membrana del pulso aplicado.

Para construir las curvas de inactivación, se utilizó un protocolo que consistía en la aplicación de un primer pulso de 500 ms de duración desde -120 mV hasta potenciales de membrana comprendidos entre -140 y -20 mV (en intervalos de 10 mV) (pulso condicionante), seguido de un breve pulso (20 ms) a -20 mV (pulso test). La representación de la amplitud de la corriente generada por el pulso test en función del potencial de membrana del pulso condicionante, nos permitió construir las curvas de inactivación. Las curvas de inactivación se construyeron a partir del ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales:

$$y = A / \{1 + \exp[(V_h - V_m)/k]\}$$

donde A es la amplitud de la corriente, V_h es el punto medio de la curva de inactivación, V_m es el potencial de membrana del pulso aplicado y k es la pendiente de la curva.

Para describir la cinética de inactivación de la corriente, se utilizó un análisis exponencial, ajustando la siguiente ecuación a los trazos de corriente:

$$y = C + A_1 \cdot e^{(-t/\tau_1)} + A_2 \cdot e^{(-t/\tau_2)} + \dots + A_n \cdot e^{(-t/\tau_n)}$$

donde τ_1 , τ_2 y τ_n son las constantes de tiempo del sistema, A_1 , A_2 y A_n son las amplitudes de cada uno de los componentes de la exponencial y C es el valor basal.

Para el análisis del proceso de recuperación de la inactivación, se utilizó un protocolo que consistía en la aplicación de dos pulsos idénticos (P1 y P2) de 500 ms de duración, desde un potencial de fijación de -120 mV hasta -20 mV con un intervalo de acoplamiento variable (0.1-500 ms). Para describir la cinética del proceso de recuperación de la inactivación, se ajustaron los datos experimentales a una función biexponencial.

Análisis del tráfico de los canales hacia la membrana citoplasmática

Para analizar el tráfico de los canales hacia la membrana, se transfectaron las células CHO, siguiendo los protocolos descritos anteriormente, con canales Nav1.5 conjugados con la proteína fluorescente verde (GFP) (proporcionados por el Dr. C. Antzelevitch del Masonic Medical Research Laboratory; Utica, Estados Unidos). La conjugación con la GFP permite identificar la localización celular del canal mediante microscopía confocal. Las células transfectadas se depositaron sobre un cubreobjetos recubierto con fibronectina para facilitar su adherencia y se mantuvieron en reposo durante 30 min. A continuación, las preparaciones se lavaron con solución salina (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado adicional y se incubaron con un marcador de membrana (conjugado de aglutinina de germen de trigo con Alexa Fluor 647, Invitrogen).

Finalmente, las preparaciones se lavaron con PBS tres veces más y se incubaron con medio de montaje “antifading” Prolong (Invitrogen).

La microscopía confocal se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal Leica TC5-SP5 AOBS (Mannheim, Alemania) con objetivos de inmersión en aceite de 20 y 63 aumentos. Para la visualización de la GFP se usó un láser con la línea de excitación a 488 nm, mientras que para la visualización del Alexa Fluor se utilizó un láser con la línea de excitación a 633 nm, respectivamente. Los rangos de detección se ajustaron apropiadamente para evitar interferencias entre los fluoróforos. El plano XY de la imagen se situó en 512x512 pixels y la intensidad del láser se ajustó al 6% de la intensidad máxima. El plano Z se cambiaba automáticamente en incrementos de 0.5 μm a lo largo de todo el volumen de la célula para obtener las imágenes de los distintos planos. Como índice de la expresión de los canales en la membrana se utilizó el porcentaje del volumen colocalizado entre la señal verde del canal y la señal roja del marcador de membrana, que fue calculado utilizando el software BioImageXD.

Análisis estadístico

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Los datos que aparecen en las representaciones gráficas se expresan como la media \pm EEM para un determinado número (n) de experimentos. Las comparaciones realizadas a un único voltaje fueron llevadas a cabo mediante la prueba *t* de Student. Para analizar el bloqueo a distintos voltajes y para comparar resultados entre más de dos grupos de experimentos se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de P resultó ser menor de 0.05.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras se utilizó la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v9.0)

(Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) y el programa Prism (v3.0 y v4.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU)

III.- RESULTS

Clinical study

The proband, marked in the figure with an arrow, suffered an episode of ventricular fibrillation but all the conventional tests, including drug challenge with flecainide and epinephrine, were negative, so it was classified as IVF (figure IV.6.2A). Exhaustive family screening detected an abnormal basal ECG in a son and a sister of the proband carrying the same SCN5A mutation, with slightly widened QRS in V1-V3 and positive response with development of type 1 Brugada pattern after flecainide continuous infusion at 2 mg/kg for 10 min ⁷(figures IV.6.2B and IV.6.2C). Interestingly, the index case presents sinus bradycardia (45-50 bpm) on basal status and under flecainide.

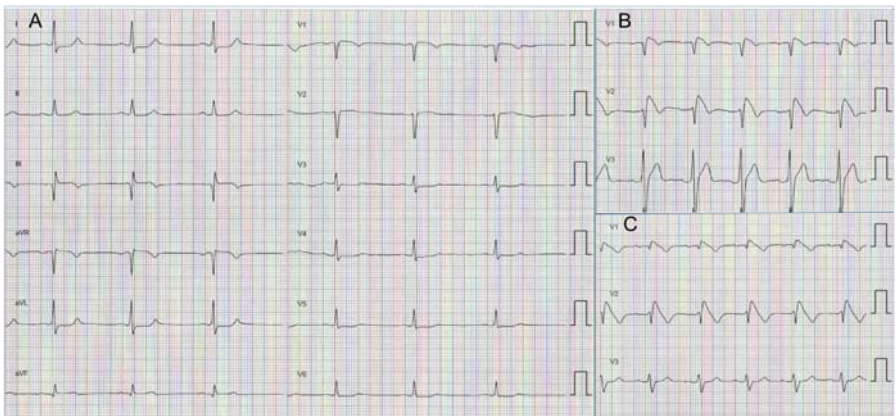


Figure IV.6.2: Flecainide test in index case (panel A) and two direct relatives (2B and 2C). Note the Brugada type 1 response in asymptomatic relatives and ECG with sinus bradycardia and no Brugada pattern after flecainide in the proband who had suffered the ventricular fibrillation episode.

Fifteen family members were studied (7 carrying the mutation and 8 without it) with ECG, echocardiogram and flecainide test. PR and QRS intervals were significantly prolonged (table IV.6.1) in patients carrying the mutation comparing to healthy relatives without the mutation. All the included relatives were asymptomatic but one, who suffered an episode of syncope in the past.

The index case underwent an implantable cardioverter defibrilator and is under regular follow up with no more arrhythmic events up to now.

ECG parameters	SCN5A	SCN5A .	P val
Spontaneous Brugada pattern (%)	0 (0%)	0 (0%)	NS
PR interval (ms)	196.7±2	150±29	0.04
QRS interval (ms)	112.8±1	90.8±12	0.04
Atrial fibrillation (%)	2 (25%)	0 (0%)	NS

Table IV.6.1

Caracterización funcional de los canales mutados p.D1816fs

Para determinar el mecanismo por el que la mutación p.D1816fs del canal Nav1.5 puede producir Síndrome de Brugada, se compararon las corrientes registradas en células CHO transfectadas con los canales WT, p.D1816fs, y en las que habían sido cotransfectadas con ambos (WT+p.D1816fs). Las corrientes se registraron tras aplicar pulsos de 50 ms de duración a potenciales comprendidos entre -80 y +50 mV en incrementos de 5 mV desde un potencial de fijación de -120 mV (Parte superior de la Figura IV.6.3A). En la Figura IV.6.3A se muestran los registros de corriente obtenidos en 3 células CHO diferentes transfectadas con los canales WT, p.D1816fs y WT+p.D1816fs. La Figura 1B muestra las relaciones densidad de corriente-voltaje obtenidas al representar la densidad de la corriente registrada en función del potencial de membrana del pulso aplicado. Los canales

Nav1.5 WT generaban una corriente de entrada cuya densidad aumentaba progresivamente con cada pulso aplicado hasta llegar a un valor máximo de -736 ± 117 pA/pF a -25 mV ($n=21$). A potenciales más positivos, la corriente disminuye gradualmente debido a que cuando la despolarización de la membrana es intensa, los canales pasan rápidamente al estado inactivo (Figura IV.6.3B) y, en consecuencia, las relaciones densidad-voltaje presentan una característica forma de campana (Figura IV.6.3B). En el gráfico de barras de la Figura IV.6.3C se representan los valores de densidad de la corriente máxima registrada en cada uno de los casos. La presencia de la mutación p.D1816fs reducía en más de un 90% la densidad de la corriente ($P < 0.01$, $n=10$) (Figura IV.6.3A-C). Estos resultados permiten concluir que la presencia de la mutación produce un cambio drástico en la proteína que forma el canal que conduce a la pérdida de función del mismo. Por otra parte, la densidad de la corriente registrada en células CHO que habían sido cotransfectadas al 50% con los canales WT y p.D1816fs (-349.9 ± 119 pA/pF, $n=10$) resultó ser significativamente mayor que la generada por los canales p.D1816fs ($P < 0.01$) y aproximadamente un 50% menor que la de la corriente generada por los canales WT (Figura IV.6.3A-C). Este resultado sugeriría que la corriente registrada en las células cotransfectadas corresponde principalmente a la generada por los canales WT cuya expresión y función no se ven afectadas por la presencia de los canales mutados.

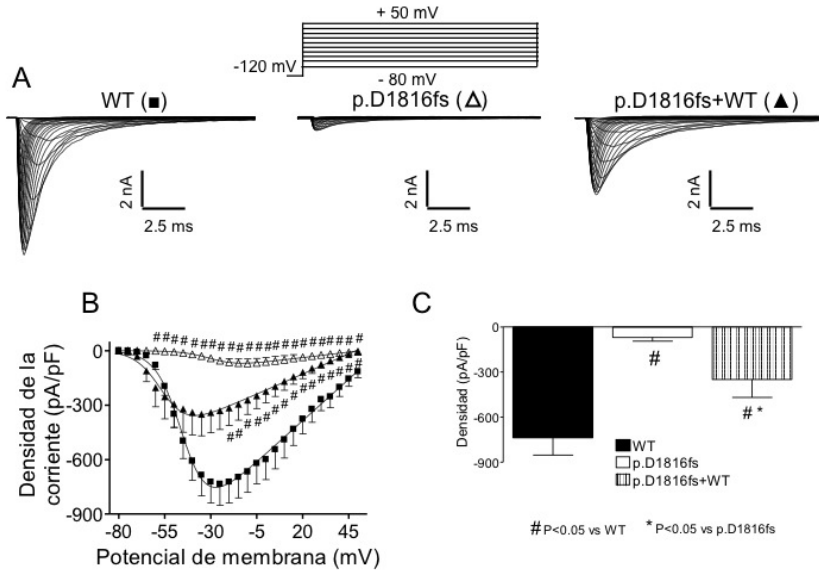


Figura IV.6.3: **A**, Trazos de corriente registrados en 3 células CHO diferentes transfectadas con los canales Nav1.5 WT (izquierda), p.D1816fs (centro) y WT+p.D1816fs (derecha) mediante la aplicación de pulsos de 50 ms desde -120 mV hasta potenciales comprendidos entre -80 y +50 mV en incrementos de 5 mV. **B**, Relaciones densidad de corriente-voltaje construidas al representar la densidad de corriente en función del potencial de membrana. **C**, Densidad de corriente máxima registrada en células CHO transfectadas con canales WT, p.D1816fs y WT+p.D1816fs. En B y C, # representa $P < 0.01$ frente a WT y * $P < 0.01$ frente a p.D1816fs. Cada punto o barra representa el valor medio \pm EEM de al menos 10 experimentos en cada grupo.

A continuación se analizó si la mutación modificaba la dependencia de voltaje de la inactivación del canal, es decir, la transición de los canales desde el estado cerrado (no conductor pero disponible para abrirse con la despolarización) hasta el estado inactivo en función del potencial de membrana. En la parte superior de la Figura IV.6.4A, se muestra el protocolo utilizado en este grupo de experimentos y que consistía en la aplicación de pulsos condicionantes de 500 ms desde -120 mV hasta potenciales de membrana comprendidos entre -140 y -20 mV, seguido de un pulso test de 20 ms a -20 mV. La Figura IV.6.4A muestra la representación de la amplitud de la corriente generada por el pulso test en función del potencial de

membrana del pulso condicionante (curva de inactivación) obtenida para los canales WT, p.D1816fs y WT+p.D1816fs. Se puede observar que la amplitud de la corriente generada por el pulso test disminuye progresivamente a medida que el potencial de membrana del pulso condicionante se va despolarizando para anularse a potenciales de membrana >-60 mV. La amplitud de la corriente generada por el pulso test es proporcional a la cantidad de canales que se encuentran en estado cerrado y pueden abrirse con la despolarización. A su vez, la cantidad de canales en estado cerrado depende del potencial de membrana del pulso condicionante, disminuyendo progresivamente a medida que éste se despolariza, puesto que con la despolarización los canales van pasando al estado inactivo. Para una mejor comparación, la amplitud de la corriente generada por cada uno de los canales se normalizó al valor máximo y se realizó el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos (Figura IV.6.4A). El ajuste de la ecuación de Boltzmann a las curvas de inactivación de los canales WT permitió obtener los valores del punto medio ($V_h = -80.7 \pm 2.1$ mV) y de la pendiente de la curva ($k = 6.4 \pm 0.3$ mV) ($n=21$). Los canales que presentaban la mutación p.D1816fs exhibieron un importante desplazamiento de la dependencia de voltaje de la inactivación hacia valores de potencial más positivos, de tal forma que el punto medio de la curva resultó ser -64.3 ± 3.9 mV ($P < 0.01$, $n=10$), sin que la pendiente de la misma se viese modificada ($k = 5.7 \pm 0.7$, $P > 0.05$). Estos resultados sugieren que la presencia de la mutación da lugar a una importante alteración de la estructura del canal que interviene en el control de la dependencia de voltaje de la inactivación. Por su parte, la dependencia de voltaje de los canales WT+p.D1816fs fue similar a la de los canales WT, por lo que los valores de punto medio y pendiente no fueron estadísticamente distintos ($P > 0.05$, $n=10$).

En el siguiente grupo de experimentos se determinaron los efectos producidos por la presencia de la mutación p.D1816fs sobre la cinética de inactivación (cinética de la transición desde el estado abierto al inactivo) y de reactivación (cinética de la transición desde el estado inactivo al cerrado) de los canales. Para analizar los efectos sobre la cinética de inactivación se ajustó una función biexponencial a los

trazos de corriente máxima generados por canales WT, p.D1816fs y WT+p.D1816fs, respectivamente. En células transfectadas con los canales WT, el ajuste proporcionó dos constantes de tiempo, una rápida ($\tau_r = 0.9 \pm 0.1$ ms) y una lenta ($\tau_l = 5.4 \pm 0.3$ ms) ($n=21$). El curso temporal de aparición de la inactivación no fue modificado por la mutación p.D1816fs, de tal forma que las constantes de tiempo obtenidas fueron de $\tau_r = 0.8 \pm 0.1$ ms y $\tau_l = 7.0 \pm 2.4$ ms ($n=10$, $P > 0.05$ con respecto a WT). Por último, las constantes de tiempo de inactivación rápida y lenta obtenidas al estudiar los canales WT+p.D1816fs ($\tau_r = 0.8 \pm 0.1$ ms y $\tau_l = 7.0 \pm 2.4$ ms) no fueron estadísticamente distintas de las de las generadas por los canales WT ($P > 0.05$, $n=10$).

Para analizar la cinética de reactivación de los canales se utilizó un protocolo en el que se aplicaban dos pulsos de 500 ms de duración (P1 y P2), desde un potencial de fijación de -120 mV hasta -20 mV con un intervalo de acoplamiento variable (0.1-500 ms). Durante la aplicación del primer pulso despolarizante (P1) los canales se abren y se inactivan. La aplicación del pulso P2 genera una corriente de amplitud progresivamente creciente a medida que el intervalo de acoplamiento entre los dos pulsos a potenciales negativos de membrana se va prolongando. La hiperpolarización permite la transición tiempo-dependiente de los canales desde el estado inactivo al estado cerrado desde el cual pueden abrirse con la despolarización. De esta forma, la amplitud de la corriente registrada con el pulso P2 será proporcional al número de canales que se han recuperado de la inactivación lo que permite analizar la cinética de la transición. Al representar el cociente entre la amplitud de la corriente registrada con el pulso P2 y la registrada con el pulso P1 en función de la duración del intervalo de acoplamiento y ajustar una ecuación biexponencial a dichos valores se obtuvieron las constantes de tiempo que describen el proceso de reactivación (Figura 4B). En el caso de los canales WT, las constantes de tiempo obtenidas fueron ($\tau_r = 3.5 \pm 0.6$ ms y $\tau_l = 20.9 \pm 3.9$ ms) ($n=21$). La presencia de la mutación p.D1816fs aceleró significativamente la velocidad de la fase rápida del proceso, de tal forma que el valor de la τ_r fue menor (1.5 ± 0.3 ms, $P < 0.01$; $n=10$), sin que se viera modificada la fase lenta ($\tau_l = 24.5 \pm 11.4$ ms, $P > 0.05$). Por su parte las constantes de tiempo de

reactivación en canales WT+p.D1816fs no fueron significativamente distintas de las obtenidas para canales WT ($\tau_r = 2.2 \pm 0.4$ ms y $\tau_i = 17.9 \pm 4.0$ ms, $n=10$).

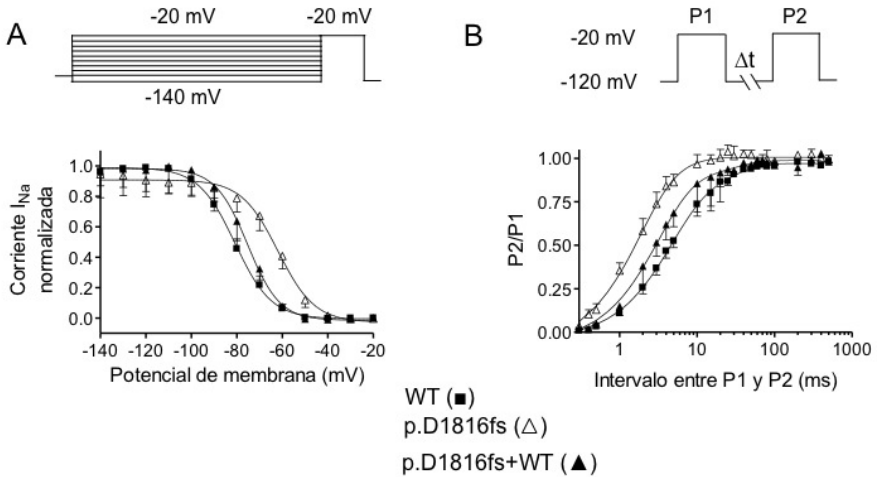


Figura IV.6.4: **A**, Curvas de inactivación construidas al representar la amplitud normalizada de la corriente registrada con el pulso de 20 ms a -20 mV en función del voltaje del pulso precedente para los canales WT, p.D1816fs y WT+p.D1816fs. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann. **B**, Valores medios del cociente entre la corriente obtenida con el segundo (P2) y el primer pulso (P1) en función del intervalo de acoplamiento. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación biexponencial. Cada punto representa el valor medio \pm EEM de al menos 10 experimentos en cada grupo.

Efectos de la mutación p.D1816fs sobre el tráfico de los canales hacia la membrana citoplasmática

La marcada disminución de la amplitud de la corriente generada por los canales con la mutación p.D1816fs sugería la posibilidad de que dicha mutación estuviera reduciendo el tráfico del canal hacia la membrana. Para evaluar dicha hipótesis, se comparó la expresión en la membrana de canales Nav1.5 WT, p.D1816fs y WT+p.D1816fs conjugados con GFP (verde) en células que además habían sido

incubadas con un marcador de membrana (rojo) (Figura IV.6.5A). El grado de expresión del canal en la membrana, vendrá determinada por la coincidencia de las señales de color verde y rojo (las áreas de coincidencia aparecen en color blanco en los paneles derechos de la Figura IV.6.5A). Como puede observarse en la Figura, el área de coincidencia y por tanto, la expresión en la membrana es mucho menor en la imagen de la célula transfectada con los canales p.D1816fs (centro) que las transfectadas con los canales WT (arriba) y WT+p.D1816fs (abajo). Para cuantificar estas diferencias, se calculó el porcentaje de volumen colocalizado en cada caso. Tal y como muestra la Figura IV.6.5B, éste parámetro resultó ser significativamente menor en las células transfectadas con los canales p.D1816fs que en las transfectadas con los canales WT y WT+p.D1816fs. Estos resultados permiten concluir que la mutación p.D1816fs disminuye marcadamente el tráfico de los canales hacia la membrana, lo que explicaría la importante disminución en la corriente registrada en células transfectadas con dichos canales.

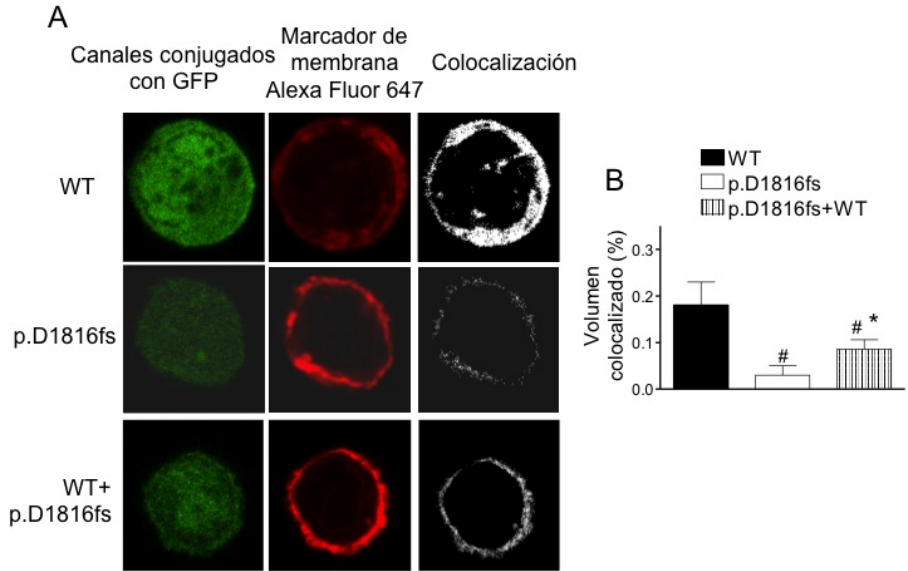


Figura IV.6.5. A, Imágenes bidimensionales representativas de la sección central de 3 células CHO diferentes transfectadas con los canales Nav1.5 WT (arriba), p.D1816fs (centro) y WT+p.D1816fs (abajo). Los paneles de la izquierda muestran la localización de los canales conjugados con la GFP (color verde), mientras que en los paneles centrales se muestra la presencia del marcador de membrana (color rojo). La colocalización de ambas señales se muestra en color blanco en los paneles de la derecha. B, Valores medios del porcentaje de volumen colocalizado en cada una de las situaciones. # representa $P < 0.01$ frente a WT y * $P < 0.01$ frente a p.D1816fs. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 células distintas en cada grupo.

III.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La mutación p1816.fs presentada no ha sido descrita con anterioridad en la literatura. En el presente trabajo realizamos una descripción funcional del efecto electrofisiológico de esta mutación sobre el canal de sodio Na1.5v y su correlación con los hallazgos clínicos y fenotípicos en una amplia familia española.

El canal de sodio NA1.5v, codificado por el gen SCN5A, está implicado en la génesis de arritmias ventriculares de forma muy variada, desde el SQTL tipo 3 y SB hasta trastornos del sistema de conducción y miocardiopatía dilatada. Por ello, a la hora de enfrentarnos a un caso de FVI en el cuál se detecte una mutación en SCN5A conviene considerar su posible implicación en el cuadro. No obstante hay que tener en cuenta, en base a los trabajos del grupo de Ackerman y colaboradores, que una buena parte de las variantes encontradas en SCN5A no tienen carácter patogénico, esto es, no producen alteración en las corrientes iónicas de sodio y por lo tanto no su puede asumir su papel en la etiopatogenia de la enfermedad. Es por ello que es muy útil disponer de estudios funcionales que correlacionen bien los hallagos clínicos, además de realizar un exhaustivo estudio familiar para verificar que la mutación cosegrega con el feotipo, es decir, que es positiva en sujetos con fenotipo positivo y es negativo en sujetos sin fenotipo.

Nosotros hemos realizado el estudio funcional de esta nueva mutación por inserción en heterocigosis en SCN5A. En los experimentos se demuestra un reducción significativa del tráfico de los canales iónicos a la membrana celular y una afecación de la corriente iónica de sodio respecto a los canales no mutados, lo cuál es muy sugerente de su participación en la enfermedad subyacente de la familia. Los hallazgos funcionales son los esperables en el SB que se demostró en varios miembros de esta familia.

Un aspecto interesante es la baja penetrancia clínica que presentan los portadores de la mutación en esta familia. Es conocido, tal y como muestra el trabajo número IV de esta Tesis Doctoral, que la penetrancia en canalopatías cardíacas es incompleta, es decir, es posible padecer un SQTL o SB, e incluso padecer arritmias ventriculares y MSC, y presentar un ECG de supeficie normal. Por ello adquiere relevancia la utilidad del test genético, convenientemente interpretado, para realizar el diagnóstico. Nuestro estudio funcional en esta familia demuestra que los canales mutados en heterocigosis tienen una afectación de la corriente iónica que, si bien es significativa respecto al WT, no presenta una gran diferencia en números

absolutos, como se muestra en la figura IV.6.3A. Sin embargo, al estudiar los canales mutados en homocigosis (situación distinta a la encontrada en nuestros pacientes) la reducción en la corriente de sodio es más relevante y la afectación del canal de sodio de mayor grado. Ello podría explicar la escasa penetrancia clínica con sólo 2 de 7 pacientes mostrando el típico patrón de Brugada electrocardiográfico en respuesta a flecainida (Figura IV.6. 2). El motivo por el cuál la paciente probando padeció el severo cuadro de FVI cuando su fenotipo electrocardiográfico es normal es aún desconocido. La hipótesis más plausible es el uso concomitante de fármacos bloqueadores de la corriente de sodio que generase una reducción significativa de la corriente y predispusiese a la paciente a padecer FV, si bien esto no está confirmado. Por ello es tan importante la detección de sujetos asintomáticos con canalopatía subclínica a través del test genético y aconsejarlos sobre la evitación de fármacos potencialmente arritmogénicos y evitación de desencadenantes típicos de arritmias.

Bibliografía

1. Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation*. 2009;28;120:278-85
2. Jiménez-Jáimez J, Tercedor-Sánchez L, Alvarez-López M, Martínez-Espín E, Sebastián Galdeano R, Almansa-Valencia I et al. Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:71-4.
3. Krahn AD, Gollob M, Yee R, Gula LJ, Skanes AC, Walker BD, Klein GJ. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of adrenaline and procainamide infusion. *Circulation*. 2005;112:2228–2234.
4. Behr E, Wood DA, Wright M, Syrris P, Sheppard MN, Casey A, Davies MJ, McKenna W. Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet*. 2003;362:1457–1459.
5. Gimeno JR, Lacunza J, García-Alberola A, Cerdán MC, Oliva MJ, García-Molina E et al. Penetrance and risk profile in inherited cardiac diseases studied in a dedicated screening clinic. *Am J Cardiol*. 2009;104:406-10.
6. Jiménez-Jáimez J, Álvarez-López M, Tercedor-Sánchez L, Santiago P, Algarra, M Peñas R, et al. Novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation due to subclinical Brugada Syndrome. *Cardiogenetics* 2012; 2:e1.
7. Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA, et al. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts.

Circulation. 2000;101:510–515.

8. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, Harris-Kerr C, Pungliya MS, Alders M, et al. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation*. 2009;120:1752-60.

Capítulo 5

DISCUSSION

V. DISCUSSION

This Doctoral Thesis makes a clinical description of series of patients with Brugada Syndrome, Long QT Syndrome and Idiopathic Ventricular Fibrillation. It is included under a long-term, larger project that aims to improve our knowledge about familial cardiopathies with high risk of sudden death. In our Health Service there are few Centres and groups specialized in this kind of pathologies. In the Arrhythmias Unit of the Virgen de las Nieves University Hospital and the Granada we have developed this work during the last 4 years, achieving high-impact journal papers and the production of this Doctoral Thesis.

This Thesis describes the mutation spectrum and its correlation with clinical findings in the LQTS for the first time in our country. We know many data and research about genetic background in cardiac channelopathies in other parts of the world, but we also know that geographical differences may exist and are important to be detected. This is one of the main findings of this research work: the most affected gene mutated in our LQTS population, although it is not a large sample of patients, was *KCNH2* instead of *KCNQ1* as previously reported. After having published the first paper of this Thesis, we found one patient carrying a *KCNQ1* mutation. The case was a eleven year old boy who suffered an episode of syncope while playing football. In the ECG it was clear the QTc interval prolongation up to 640 milliseconds with the typical LQT1 shape. His father had suffered three episodes of syncope a long time ago, but his ECG was normal. We found a previously described mutation in *KCNQ1* (c1022T,) changing alanine to valine. This mutation has been previously described in 90 families, causing high incidence of SCD related to sports and swimming.^{102,103} We know that treatment and arrhythmia triggers are different in other populations, and because of this our work is relevant in our country. Regarding BS there are limited data in our population about genetic etiology, and here we provide three new mutations.

Another finding of this Doctoral Research is related to patients with ventricular fibrillation and no structural heart disease nor pathological electrocardiogram. This group of patients are classified as IVF. Our main result with this work is that genetic and pharmacological tests to unmask cardiac channelopathies should be considered when assessing these patients. The fact of not achieving a diagnosis in a patient who has suffered syncope or ventricular fibrillation or even in people who have suffered a sudden cardiac death and the post-mortem examination does not show evidence of heart disease is uncommon now because the increasing complexity of diagnostic tests. However, it is interesting the study we have performed and described in part IV of RESULTS in this Thesis. Here we study the diagnostic criteria with ECG and clinical history, and we conclude that less than a half of patients with genotyped cardiac channelopathies present a typical surface ECG or fulfil clinical diagnostic criteria.

This work is the first step of an ambitious multicentric project that we are coordinating from Granada: the FIVI-Gen project. The most relevant paper about patients with IVF is the CASPER Registry.²⁶ This work included 63 patients with IVF and found a final diagnosis in 56 % of them. The clinical protocol used for that work consisted of pharmacological tests and genetic screening depending on the observed phenotype, not including the familial assessment as a tool to reach the final diagnosis. This is the great point where our project is different and may give some additional information. Our preliminary results, published and presented in this Doctoral Thesis, suggest that this percentage of positive diagnosis might increase using the protocol which is explained in the Section “MATERIAL Y MÉTODOS” of this thesis. More than ten Centres across Spain are currently participating in this project and the final size of the sample expected will allow results of a high impact and quality.

In a similar way to the previous project we are now working to extend the protocol to cases of SCD with normal post-mortem examination. (figure V.1). Our main aim is to coordinate eight Forensics and Legal Medicine Departments in Andalucía to collect all the cases of SCD with normal autopsy. With this we will be able to have a sample size to obtain conclusions about the demographical, clinical and genetical features of this populations, and compare these variables with the ones observed in people who have survived to the episode of Cardiac Arrest (currently studied in the FIVI-Gen project). In all the cases where we find a novel and undescribed mutation in sodium and potassium channels we will perform a functional study to try to establish the pathogenicity of the mutation.

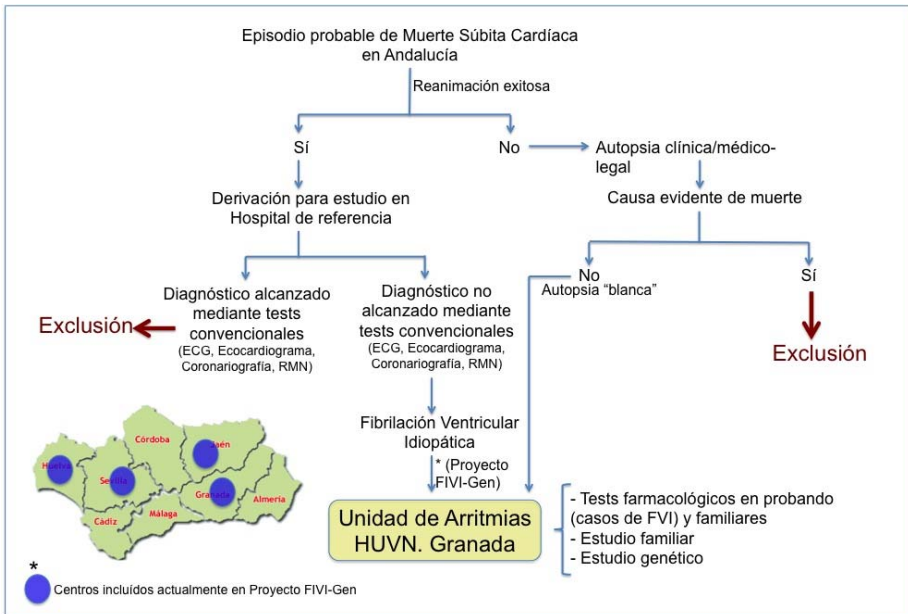


Figure V.1: Protocolo of the future research project.

Finally, the present Thesis describes two quite interesting studies about the pathophysiology of ion channels affected for certain mutations. Clinical correlation

with the observed data in the functional study is a valuable research connecting both clinical and basic research. We have studied two novel mutations from the basic science point of view, in *KCNH2* and *SCN5A*, and have correlated the results with the clinical behaviour observed in that patients. In both cases the data were original, one of them published in a high impact factor Journal and the other one pending to be sent to another Journal. Both works demonstrate an ion channel disfunction, evidence of reduced ionic current and correlation with the expected phenotype. There are no previous data about both mutations, so the clinical relevance of them is high. However, the key points to reach a final diagnosis continue to be the clinical and familial assessment including pharmacological and genetic tests.

To summarize, this Doctoral Thesis gives some new information about the natural history, clinical expression and genetic background of cardiac channelopathies in our population. This project will be continued with new multicentric works and basic research in collaboration with other national groups focused on the study of ion channel disorders.

Capítulo 6

CONCLUSIONES GENERALES GENERAL CONCLUSIONS.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

1.- El genotipo subyacente más prevalente en nuestra población con SQTl mostró una alta incidencia de mutaciones en KCNH2, a diferencia de otras poblaciones en que el gen más mutado es KCNQ1. En nuestra serie tan solo hallamos una mutación en KCNQ1. En el SB la prevalencia mutacional fue del 30 %, encontrando tres mutaciones no descritas previamente.

2.- El perfil clínico de nuestra serie de pacientes y familiares mostró una penetrancia clínica incompleta con alta prevalencia de portadores de mutación genética que mostraban un fenotipo (clínico y ECG) normal. Esto fue más acentuado en familiares del caso índice

3.- Este trabajo sugiere que la utilización combinada de test farmacológicos, estudio familiar y test genético dirigido o no por fenotipo posee una alta rentabilidad diagnóstica en la FVI.

4.- La mutación en SCN5A p1816f., en heterocigosis, de tipo *frameshift*, hallada en una paciente con FVI, produce una reducción del tráfico de canales de sodio a la membrana y una disminución de la corriente despolarizadora de sodio, concordando con el patrón fenotípico observado en la familia portadora de SB con penetrancia clínica incompleta.

5.- La mutación en KCNH2 E637G, en heterocigosis, de tipo *missense*, hallada en una familia española con SQTl y arritmias ventriculares y síncope en respuesta a estímulos auditivos, produce una acusada reducción de la corriente rápida repolarizadora de potasio y prolonga el potencial de acción, lo cuál se correlaciona con el genotipo observado en los pacientes portadores de la mutación de SQTl.

VI. GENERAL CONCLUSIONS

1.- The underlying genotype in our population with LQTS showed a high incidence of mutations in KCNH2, unlike other populations in which KCNQ1 gene is the most mutated. In our series we found only one patient with a mutation in KCNQ1. In our SB population the mutational prevalence was 30%, finding three novel mutations.

2. - The clinical profile of our series of patients and relatives showed incomplete clinical penetrance with high prevalence of mutation carriers that showed a normal phenotype (clinical and ECG). This was more frequent in relatives of the index case

3- This Thesis suggests that the combined use of pharmacological tests, familial screening and genetic test has a high diagnostic yield in IVF.

4 - The heterozygous mutation in SCN5A p1816f., , frameshift type, found in a patient with IVF, produces a reduction in the sodium channel trafficking to the cellular membrane and a reduced depolarizing sodium current, consistent with the phenotype observed in the family with a BS and low clinical penetrance.

5. - The heterozygous mutation E637G, in KCNH2, missense type, found in a Spanish family with LQTS and ventricular arrhythmias and syncope in response to auditory stimuli, produces a marked decrease in the outward repolarizing potassium current during the action potential, leading to a marked delay of repolarization, which correlates with the genotype observed in patients with LQTS mutation.

Bibliografía

1. Myerburg RJ, Castellanos A. Cardiac arrest and sudden cardiac death. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E, ed. *Braunwald's Heart Disease: A textbook of Cardiovascular Medicine*. 7th edn. Elsevier Saunders Company. Philadelphia, PA, 2004:865-908
2. Kuller LH. Sudden death-definition and epidemiologic considerations. *Prog Cardiovasc Dis* 1980;23: 1-12
3. Deedwania P. Global risk assessment in the presymptomatic patient. *Am J Cardiol* 2001; 88(7B):17J-22J.
4. Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P. et al. Task force on sudden cardiac death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2001;22:1374-1450
5. Albert CM, Chae CU, Grodstein F, Rose LM, Rexrode KM, Ruskin JN et al. Propective study of sudden cardiac death among women in the United States. *Circulation* 2003; 107:2096-2101.
6. Myerburg RJ, Interian A Jr, Mitrani RM, Kessler KM, Castellanos A. Frequency of sudden cardiac death and profiles of risk. *Am J Cardiol* 1997;80: 10F-19F
7. Burke AP, Farb A, Virmani R Goodin J, Smialek JE. Sports-related and non-sports related sudden death in young adults. *Am Heart J* 1991;121:568-575.

8. Steinberger J, Lucas R, Edwards JE and Titus JL. Causes of sudden unexpected cardiac death in the first two decades of life. *Am J cardiol* 1996; 77: 992-995
9. Marianne Arnestad, Lia Crotti, Torleiv O. Rognum, Roberto Insolia, Matteo Pedrazzinni, Chiara Ferrandi et al. Prevalence of Long QT syndrome Gene Variants in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation* 2007; 115;361-367
10. Virmani R, Burke AP, Farb A and Kark JA. Causes of sudden death in young and middle-aged competitive athletes. *Cardiol Clin* 1997; 15: 439-466
11. Behr ER, Casey A, Sheppard M, Wright M, Bowker TJ, Davies MJ, et al. Sudden arrhythmic death syndrome: □ a national survey of sudden unexplained cardiac death. *Heart* 2007;93:601e5.
12. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic □ causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006;92:316e20.
13. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome clinical impact. *Circulation*. 1999;99:529–33.
14. McWilliam JA. Fibrillar contraction of the Heart. *J Physiol (London)* 1887; 8: 296-310.
15. Allesie MA, Bonke FIM, Schopman FJG. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia II. The role of non-uniform recovery of excitability in the occurrence of unidirectional block as studied with multiple microelectrodes. *Circ Res* 1976; 39: 168-177.

16. Huikuri HV, Castellanos A, Myeburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473-1482.
17. Zipes DP, Wellens HJJ. Sudden cardiac death. *Circulation* 1998;98:2334-2351
18. Bayés de Luna A, Coumel P, Leclercq JF. Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmias on the basis of data from 157 cases. *Am Heart J* 1989;117:151-159.
19. Bastiaenen R, Behr ER. Sudden death and ion channel disease: pathophysiology and implications for management. *Heart* 2011;97:1365-1372
20. Martin CA, Matthews GD, Huang CL. Sudden cardiac death and inherited channelopathy: the basic electrophysiology of the myocyte and myocardium in ion channel disease. *Heart* 2012;98:536-543
21. Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C et al. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest.* 2002;110:1201-9
22. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature.* 1995;376:683-5.
23. Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balser JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel. *Circ Res.* 2000;86:E91-7.
24. Vincent GM, Timothy KW, Leppert M, Keating MT. The spectrum of

- symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long QT syndrome. *N Engl J Med.* 1992;327:846–852.
25. Lande G, Kyndt F, Baró I, Chabannes D, Boisseau P, Pony JC et al. Dynamic analysis of the QT interval in long QT1 syndrome patients with a normal phenotype. *Eur Heart J.* 2001;22:410-22.
 26. Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation.* 2009.28;120:278-85
 27. Balsler JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:599-613. Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ et al. SCN4B encoded sodium channel beta4 subunit in congenital Long QT Syndrome. *Circulation* 2007;116:134-142.
 29. Watanabe H, Koopman TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, et al. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada Syndrome and cardiac conduction system disease in humans. *J Clin Invest* 2008;118:2260-2268.
 30. Hu D, Barajas-Martínez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, et al. A mutation in the b3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:270-278
 31. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and acquired cardiac arrhythmia: *HERG* encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995;81:299 – 307.

32. Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 2003;113:829-840
33. Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. Clínica y genética en el síndrome de QT largo. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60:739-52.
34. Viskin S, Rosovski U, Sands AJ, Chen E, Kistler PM, Kalman JM, et al. Inaccurate electrocardiographic interpretation of long QT: the majority of physicians cannot recognize a long QT when they see one. *Heart Rhythm.* 2005; 2:569-74.
35. MacCormick JM, McAlister H, Crawford J, French JK, Crozier I, Shelling AN, et al. Misdiagnosis of long QT syndrome as epilepsy at first presentation. *Ann Emerg Med.* 2009; 54:26-32.
36. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, et al. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348:1866-74.
37. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the QT interval and sudden death. *Am Heart J.* 1957;54:59-68.
38. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome: An update. *Circulation* 1993; 88: 782 –784.

39. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*. 1995;80:795-803.
40. Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, et al. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet*. 1995;4:1603-7.
41. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;103:89-95.
42. Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ. Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 1999;74:1088-94.
43. Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Fox J, Giuli LC, et al. Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation*. 2000;102:2849-55.
44. Zareba W. Genotype-specific ECG patterns in long QT syndrome. *J Electrocardiol*. 2006;39:S101-6.
45. Moss AJ, Robinson JL, Gessman L, Gillespie R, Zareba W, Schwartz PJ et al. Comparison of clinical and genetic variables of cardiac events associated with loud noise versus swimming among subjects with the long QT syndrome. *Am J Cardiol*. 1999;84:876-9
46. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, et al.

- Ca(V)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*. 2004;119:19-31.
47. Narayan SM. T-wave alternans and the susceptibility to ventricular arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:269-81.
48. Roden DM, Yang T. Protecting the heart against arrhythmias: potassium current physiology and repolarization. *Circulation* 2005; 112:1376– 8.
49. Goldenberg I, Horr S, Moss AJ, Lopes CM, Barsheshet A, McNitt S et al. Risk for life-threatening cardiac events in patients with genotype-confirmed long-QT syndrome and normal-range corrected QT intervals. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:51-9
50. Varró A, Papp JG. Low penetrance, subclinical congenital LQTS: concealed LQTS or silent LQTS. *Cardiovasc Res*. 2006;70:404-6
51. Jons C, Moss AJ, Goldenberg I, Liu J, McNitt S, Zareba W et al. Risk of fatal arrhythmic events in long QT syndrome patients after syncope. *J Am Coll Cardiol*. 2010 ;55:783-8.
52. Goldenberg I, Bradley J, Moss A, McNitt S, Polonsky S, Robinson JL et al. eta-Blocker Efficacy in High-Risk Patients With the Congenital Long-QT Syndrome Types 1 and 2: Implications for Patient Management. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2010;21:893-901
53. Liu JF, Jons C, Moss AJ, McNitt S, Peterson DR, Qi M et al. Risk Factors for Recurrent Syncope and Subsequent Fatal or Near-Fatal Events in Children and Adolescents With Long QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:941-50.
54. Moss AJ, Shimizu W, Wilde AA, Towbin JA, Zareba W, Robinson JL, et al.

- Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene. *Circulation* 2007;115:2481e9.
55. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20:1391-6.
56. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, et al. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 2005;111:659e70.
57. Fish JM, Antzelevitch C. Role of sodium and calcium channel block in unmasking the Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* 2004;1:210-7
58. Gavrielatos G, Letsas KP, Pappas LK, Efremidis M, Sideris A, Kardaras F. Sensitivity and specificity of sodium channel blocking test in the diagnosis of Brugada syndrome. *Int J Cardiol.* 2010;141:e31-3.
59. Thomas K, Grant AO. Ethnicity and arrhythmia susceptibility. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008;19:427-9.
60. Junttila MJ, Brugada P, Hong K, Lizotte E, DE Zutter M, Sarkozy A et al. Differences in 12-lead electrocardiogram between symptomatic and asymptomatic Brugada syndrome patients. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008 ;19:380-3.
61. Richter S, Sarkozy A, Paparella G, Henkens S, Boussy T, Chierchia GB et al. Number of electrocardiogram leads displaying the diagnostic coved-type

- pattern in Brugada syndrome: a diagnostic consensus criterion to be revised. *Eur Heart J*. 2010;31:1357
62. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, et al. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2010;7:33-46
63. Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, et al. Mutations in the cardiac L-type Ca^{2+} channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010;7:1872e82.
64. Hoogendijk MG, Opthof T, Postema PG, Wilde AA, de Bakker JM, Coronel R, et al. The Brugada ECG Pattern: a marker of Ca^{2+} channelopathy, structural heart disease, or neither? Toward a unifying mechanism of the Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:283e90.
65. Viskin S, Wilde AA, Tan HL, Antzelevitch C, Shimizu W, Belhassen B, et al. Empiric quinidine therapy for asymptomatic Brugada syndrome: Time for a prospective registry. *Heart Rhythm* 2009;6:401e4.
66. Probst V, Veltmann C, Eckardt L, Meregalli PG, Gaita F, Tan HL, et al. Long-term prognosis of patients diagnosed with Brugada syndrome: Results from the FINGER Brugada Syndrome Registry. *Circulation*. 2010;121:635e43.
67. Raju H, Papadakis M, Govindan M, Bastiaenen R, Chandra N, O'Sullivan A, et al. Low prevalence of markers of sudden cardiac death in victims of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:2340e5.

68. Eckardt L, Probst V, Smits JPP, Bahr ES, Wolpert C, Schimpf R, et al. Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome. *Circulation* 2005;111:257e63.
69. Kamakura S, Ohe T, Nakazawa K, Aizawa Y, Shimizu A, Horie M, et al. Long-term prognosis of probands with Brugada-pattern ST-elevation in leads V1-V3. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009;2:495e503.
70. Paul M, Gerss J, Schulze-Bahr E, Wichter T, Vahlhaus C, Wilde AA, et al. Role of programmed ventricular stimulation in patients with Brugada syndrome: a meta-analysis of worldwide published data. *Eur Heart J* 2007;28:2126e33.
71. Priori SG, Gasparini M, Napolitano C, Della Bella P, Ottonelli AG, Sassone B et al. Risk stratification in Brugada syndrome: results of the PRELUDE (PRogrammed ELectrical stimUlation preDICTive valuE) registry. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:37-45.
72. Nishii N, Ogawa M, Morita H, Nakamura K, Banba K, Miura D, et al. SCN5A mutation is associated with early and frequent recurrence of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Circ J* 2010;74:2572e8.
73. Meregalli PG, Tan HL, Probst V, Koopmann TT, Tanck MW, Bhuiyan ZA, et al. Type of SCN5A mutation determines clinical severity and degree of conduction slowing in loss-of-function sodium channelopathies. *Heart Rhythm* 2009;6:341e8.
74. Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, et al. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2002;106:69e74.

75. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, et al. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;103:196e200.□
76. Cerrone M, Napolitano C, Priori SG. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: A paradigm to understand mechanisms of arrhythmias associated to impaired Ca²⁺ regulation. *Heart Rhythm* 2009;6:1652e9.
77. Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children: A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation* 1995;91:1512e19.
78. Krahn AD, Gollob M, Yee R, Gula LJ, Skanes AC, Walker BD, et al. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of adrenaline and procainamide infusion. *Circulation*. 2005;112:2228–2234.
79. Giustetto C, Schimpf R, Mazzanti A, Scrocco C, Maury P, Anttonen O, et al. Long-term follow-up of patients with short QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:587-95
80. Behr E, Wood DA, Wright M, Syrris P, Sheppard MN, Casey A, et al. Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet*. 2003;362:1457–1459.
81. Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA, et al. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation*. 2000;101:510–515
82. Haïssaguerre M, Derval N, Sacher F, Jesel L, Deisenhofer I, de Roy L, et al.

- Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N Engl J Med* 2008;358: 2016–23.
83. Nunn LM, Lambiase PD. Genetics and cardiovascular disease--causes and prevention of unexpected sudden adult death: the role of the SADS clinic. *Heart*. 2011;97:1122-7
 84. Gimeno JR, Lacunza J, García-Alberola A, Cerdán MC, Oliva MJ, García-Molina E et al. Penetrance and risk profile in inherited cardiac diseases studied in a dedicated screening clinic. *Am J Cardiol*. 2009;104:406-10.
 85. Jiang C, Atkinson DL, Towbin JA, Splawski I, Lehmann MH, Li H, et al. Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat Genet*. 1994;8:141–147.
 86. Towbin JA, Li H, Taggart RT, Lehmann MH, Schwartz PJ, Satler CA, et al. Evidence of genetic heterogeneity in Romano-Ward long QT syndrome: analysis of 23 families. *Circulation*. 1994;90:2635–2644.
 87. Vincent GM, Timothy KW, Leppert M, Keating MT. The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long QT syndrome. *N Engl J Med*. 1992;327:846–852.
 88. Roden DM, Yang T. Protecting the heart against arrhythmias: potassium current physiology and repolarization. *Circulation* 2005; 112:1376–8
 89. Cruz Robles D, De la Peña Díaz A, Arce Fonseca M, García Trejo JJ, Pérez Méndez OA, Vargas Alarcón G. Genetics and molecular biology of the congenital, and acquired heart disease. *Arch Cardiol Mex*. 2005;75:467-482
 90. Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Brugada R, Brugada P, Brugada J. Bases genéticas de las arritmias malignas y miocardiopatías. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:422-436.

91. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the encode pilot project. *Nature*. 2007;447:799-816.
92. Brugada R. Bases genéticas de las arritmias. *Rev Esp Cardiol*. 1998;51:274-285.
93. José Luque. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Elsevier España 2006. pp 344-346.
94. García-Castro M, García C, Reguero JR, Miar A, Rubín JM, Alvarez V, et al . The spectrum of SCN5A gene mutations in Spanish Brugada syndrome patients. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:856-9.
95. Zamorano-León JJ, Alonso-Orgaz S, Moreno J, Cinza R, García-Torrent MJ, Pérez- Castellano N et al. Novel mutation (H402R) in the S1 domain of KCNH2-encoded gene associated with long QT syndrome in a Spanish family. *Int J Cardiol*. 2010. 142:206-8.
96. Jiménez-Jáimez J, Tercedor-Sánchez L, Alvarez-López M, Martínez-Espín E, Sebastián Galdeano R, Almansa-Valencia I et al. Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:71-4.
97. Jiménez-Jáimez Juan, Tercedor-Sánchez L, Álvarez-López Miguel, Galdeano Ricardo Sebastián, Melgares-Moreno Rafael. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of genetic screening for channelopathies. *Proceedings of the 15th world Congress on Heart Disease. Internantional Academy of cardiology. Annual Scientific Session 2010. Vancouver BC, Canadá. July 24-27- 2010*. 229-234. (ISBN 978-88-7587-617-3)
98. Irene Amorós * Juan Jiménez-Jáimez* Luis Tercedor, Adriana Barana,

- Ricardo Gómez, Marta González de la Fuente et al. (* means contributed equally). Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 Long QT syndrome. *Heart Rythm* 2011;8:463-470.
99. Juan Jimenez-Jaimez, Miguel Alvarez-Lopez, Luis Tercedor Sanchez, Pablo Santiago, Maria Algarra, Rocio Peñas, et al. Novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation due to subclinical Brugada syndrome. *Cardiogenetics* 2012; 2:e1;1-5
100. Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart*. 1920;7:353-70
101. Shimizu W, Noda T, Takaki H, Kurita T, Nagaya N, Satomi K, et al. Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:633– 642.
102. Crotti L, Spazzolini C, Schwartz PJ, Shimizu W, Denjoy I, Schulze-Bahr E, et al. The common long-QT syndrome mutation KCNQ1/A341V causes unusually severe clinical manifestations in patients with different ethnic backgrounds: toward a mutation-specific risk stratification. *Circulation* 2007;116:2366-75.
103. Moss AJ, Shimizu W, Wilde AA, Towbin JA, Zareba W, Robinson JL, et al. Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene. *Circulation* 2007;115:2481-9.

ANEXO I

Comunicación breve

Estudio genético en el síndrome de QT largo en nuestro medio

Juan Jiménez-Jáimez^{a,*}, Luis Tercedor-Sánchez^a, Miguel Álvarez-López^a, Esther Martínez-Espín^b, Ricardo Sebastián Galdeano^a, Isabel Almansa-Valencia^c, José A. Lorente^d y Rafael Melgares-Moreno^a

^aUnidad de Arritmias, Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

^bLORGEN GP, SL, Granada, España

^cServicio de Cardiología, Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, España

^dDepartamento de Medicina Legal y Toxicología, Universidad de Granada, GENYO - Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica y Oncología, Granada, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 22 de enero de 2010

Aceptado el 25 de febrero de 2010

On-line el 3 de diciembre de 2010

Palabras clave:

Síndrome de QT largo

Muerte súbita

Mutación genética

Keywords:

Long QT syndrome

Sudden death

Genetic mutation

RESUMEN

El síndrome de QT largo congénito tiene su causa principal en mutaciones de los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*. Nos proponemos analizar la prevalencia de mutaciones en estos genes en nuestra serie de pacientes con síndrome de QT largo y fibrilación ventricular idiopática. Se incluyó a 9 pacientes con síndrome de QT largo y 4 con fibrilación ventricular idiopática. Se estudió a los familiares de primer grado de los probandos con genotipo positivo. Encontramos mutaciones *missense* en 7 pacientes con síndrome de QT largo y en 2 con fibrilación ventricular idiopática. El 71,4% de las mutaciones fueron en *KCNH2* y el 28,6% en *SCN5A*. No se halló ninguna mutación en *KCNQ1*. Sólo dos mutaciones estaban previamente descritas. En 6 familiares de los 19 estudiados se encontró una mutación. En conclusión, en nuestra experiencia inicial el estudio genético tuvo una alta sensibilidad para el diagnóstico de síndrome de QT largo. El gen más frecuentemente mutado fue *KCNH2*.

© 2010 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Genetic Testing of Patients With Long QT Syndrome

ABSTRACT

Congenital long QT syndrome is mainly caused by mutations in the *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* genes. The aim of this study was to investigate the prevalence of mutations in these three genes in patients with long QT syndrome or idiopathic ventricular fibrillation seen at our center. The study included nine patients with long QT syndrome and four with idiopathic ventricular fibrillation. The first-degree relatives of genotype-positive probands were also investigated. Missense mutations were found in seven patients with long QT syndrome and two with idiopathic ventricular fibrillation. Overall, 71.4% of mutations were in *KCNH2* and 28.6% were in *SCN5A*. No mutations in *KCNQ1* were found. Only two mutations had been previously observed. Mutations were also found in six of the 19 relatives studied. In conclusion, our initial experience shows that genetic testing had a high sensitivity for diagnosing long QT syndrome. Mutations were found most frequently in the *KCNH2* gene.

Full English text available from: www.revvespcardiol.org

© 2010 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de QT largo (SQTL) es una canalopatía cardiaca que puede causar muerte súbita por arritmias ventriculares. Se han descrito cientos de mutaciones en doce genes de canales de sodio y potasio principalmente^{1,2}. Aproximadamente el 75% de las mutaciones descritas en el SQTL se encuentran en tres genes: *KCNQ1* (canal de potasio), *KCNH2* (canal de potasio) y *SCN5A* (canal de sodio)¹. Un 25-30% de los pacientes con SQTL permanecen sin diagnóstico genético a pesar de la secuenciación completa de todos los genes descritos³.

El SQTL tiene una penetrancia de un 25-90%, por lo que existe la posibilidad de padecer la enfermedad con un electrocardiograma

normal. En caso de parada cardiaca, estos pacientes pueden catalogarse como fibrilación ventricular idiopática (FVI). Aunque la etiología de este síndrome no sólo implica a las canalopatías, recientemente se ha señalado la posible utilidad del estudio de los genes implicados en el SQTL⁴.

El objetivo principal de este trabajo es describir las características básicas del genotipo en nuestra serie de pacientes con SQTL y la utilidad de este análisis genético en los casos con FVI.

MÉTODOS

Se incluyó a 9 pacientes con criterios diagnósticos de SQTL (media de edad, 22,6 ± 21,6 años; el 66,7% mujeres) y 4 con FVI (26 ± 22,1 años; el 50% mujeres) estudiados en nuestra unidad de arritmias. El estudio incluyó historia familiar, analítica, ecocardiograma y Holter. En los 4 pacientes con FVI e intervalo QTc corregido (QTc) normal, además se realizó estudio electrofisiológico, coronariografía y test de

* Autor para correspondencia. Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Avda. de las Fuerzas Armadas, 2. 18014 Granada, España.

Correo electrónico: jimenez.jaimez@gmail.com (J. Jiménez-Jáimez).

provocación con flecaínida y adrenalina. Realizamos estudio genético en 19 familiares de los probandos con genotipo anormal. Todos los pacientes o tutores firmaron un consentimiento informado.

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, se secuenciaron los genes en una muestra de 5 ml de sangre periférica. Para considerar patológico un hallazgo, se exigió una mutación *missense* y que dicha alteración no estuviese presente en el grupo control.

RESULTADOS

Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 1. Los resultados del estudio clínico y genético se muestran en la tabla 2. De los 9 pacientes con SQTL, 7 (77,7%) presentaban mutaciones: el 71,4% de éstas en *KCNH2* y el 28,6% en *SCN5A*. No encontramos ninguna mutación en *KCNQ1*. Únicamente dos mutaciones estaban ya descritas como causa de SQTL^{2,5}. Dos enfermos (50%) con FVI presentaron mutaciones, uno en *KCNH2* y otro en *SCN5A*, que tampoco estaban previamente descritas.

Gen *KCNH2*

Este es el gen con más frecuencia de mutaciones. La media de edad fue 17,3 ± 16 años y el intervalo QTc medio, 511 ms. Encontramos ocho mutaciones (tabla 2), sólo dos de ellas descritas previamente como causa de SQTL (G1882S y G1714R)^{2,5}. Ambas están localizadas entre la región P (poro) y el dominio transmembrana 5, una región fundamental como filtro de selectividad de potasio⁶.

Gen *SCN5A*

El 28,6% de los casos de SQTL genéticamente positivos presentó mutaciones *missense* no descritas previamente en este gen. Una paciente con FVI presentó una mutación para la que no hay evidencia de implicación causal directa en el SQTL. Sin embargo, en la evolución clínica hay datos que respaldan el diagnóstico de SQTL tipo 3; por un lado, ha tenido descargas del desfibrilador automático implantable, con registro de episodios de *torsade de pointes*, y por otro, ha presentado episodios de fibrilación auricular paroxística con respuesta a flecaínida.

Tabla 1
Características clínicas de los pacientes de QT largo y fibrilación ventricular idiopática incluidos en el estudio

	Sexo	Edad al primer síntoma	Historia de síncope	Edad (años) al diagnóstico	Síntoma que motiva el diagnóstico	Diagnóstico fenotípico	PCR o descarga DAI	Desencadenantes
Caso 1	M	11	Sí	49	PCR	SQTL	Sí	Ruidos
Caso 2	M	60	No	67	PCR	SQTL	Sí	Emociones
Caso 3	M	14	Sí	23	PCR	SQTL	Sí	Emociones
Caso 4	V	17	No	24	PCR	FVI	Sí	Natación
Caso 5	M	10	Sí	11	PCR	FVI	Sí	Despertar
Caso 6	V	9	Sí	11	Síncope	SQTL	No	Emociones
Caso 7	M	53	Sí	58	PCR	FVI	Sí	Desconocido
Caso 8	M	0	No	1 día	PCR	SQTL	Sí	Descanso
Caso 9	M	19	Sí	20	Síncope	SQTL	No	Descanso
Caso 10	V	2	Sí	10	Síncope	SQTL	No	Desconocido
Caso 11	M	12	Sí	18	PCR	SQTL	Sí	Emociones
Caso 12	V	10	Sí	11	Síncope	FVI	Sí	Desconocido
Caso 13	V	No	No	5	Asintomático	SQTL	No	No

DAI: desfibrilador automático implantable; FVI: fibrilación ventricular idiopática; M: mujer; PCR: parada cardiorrespiratoria; SQTL: síndrome de QT largo; V: varón.

Valor diagnóstico y pronóstico del estudio genético en nuestro medio. Utilidad en la fibrilación ventricular idiopática

Basalmente había 5 pacientes sin cardiopatía e intervalo QTc normal. El test farmacológico con adrenalina fue normal en 4 de ellos y diagnóstico de SQTL en 1 caso que, además, luego tuvo test genético positivo. En 2 de los 4 pacientes con FVI e intervalo QTc basal y tras fármacos dentro de la normalidad, el estudio genético mostró mutaciones *missense*.

El registro de eventos sufridos por los enfermos con bloqueadores beta y en función del canal afecto se muestra en la figura 1. Tres enfermos con mutación en *KCNH2* presentaron episodios: 2 casos taquicardia ventricular polimórfica tipo *torsade de pointes* y 1 síncope, frente a 2 con mutación en *SCN5A*: 1 síncope y 1 descarga apropiada de desfibrilador automático implantable.

Estudio genético en familiares asintomáticos

Se ha estudiado a 19 familiares directos de los enfermos con mutaciones, y se encontró la mutación del caso índice en 6 (31,5%), con fenotipo negativo en 2 de ellos (portadores silentes).

En los 2 casos con mutaciones ya descritas, el estudio genético fue negativo en los 7 familiares estudiados; todos ellos tenían un QTc normal, lo que nos ha permitido descartar la enfermedad.

DISCUSIÓN

No hay datos en nuestro medio acerca de las características genéticas del SQTL en series de pacientes, y se han publicado únicamente mutaciones aisladas⁷. Nuestro trabajo es una experiencia preliminar e inicial en nuestro país, y describe el perfil genotípico de nuestra pequeña muestra de pacientes con SQTL y FVI. Es necesaria una colaboración multicéntrica para obtener grupos más amplios y conclusiones extrapolables a la población general. Estudios previos demuestran que en un 65-70% de los casos se detecta alteración genética, y el gen más frecuentemente mutado es *KCNQ1*^{1,8}. Nosotros hemos encontrado una frecuencia de mutaciones algo superior (77,7%), y en nuestra serie *KCNH2* es el gen más frecuentemente afectado. Estos resultados no se pueden generalizar debido al pequeño tamaño muestral.

De las nueve mutaciones *missense* encontradas, únicamente dos estaban previamente descritas como causa de SQTL. En los familiares asintomáticos de dichos pacientes fue posible descartar

Tabla 2
Espectro mutacional del síndrome de QT largo en nuestra serie de pacientes

	QTc	Test farmacológico (epinefrina/flecainida)	Diagnóstico fenotípico	Score diagnóstico	Tratamiento	Estudio genético	Diagnóstico final
Caso 1	555	No	SQTL	8	DAI	KCNH2+ (1910 A > G Glu > Gly)	SQTL2
Caso 2	478	No	SQTL	4	DAI	SCN5A+ (3985 G > R Gly > Ser)	SQTL3
Caso 3	442	+	SQTL	4	DAI	SCN5A+ (1673 A > R His > Arg)	SQTL
Caso 4	367	-	FVI	1	DAI	Negativo	FVI
Caso 5	405	-	FVI	2	DAI	KCNH2+ (541 C > Y Arg > Tpf) (577 G > R Al > Thr) (62 G > R Gly > Asp)	SQTL2
Caso 6	631	No	SQTL	8	DAI	KCNH2+ (1714 G > R Gly > Ser)	SQTL2
Caso 7	413	-	FVI	2	DAI	SCN5A+ (1673 A > R His > Arg)	FVI
Caso 8	720	No	SQTL	7,5	DAI	Negativo	SQTL
Caso 9	577	No	SQTL	4	BB	Negativo	SQTL
Caso 10	-	No	SQTL	4	DAI	KCNH2+ (343G > R Val > Met)	SQTL2
Caso 11	488	+	SQTL	5	DAI	KCNH2+ (1882 G > S Gly > Arg)	SQTL2
Caso 12	400	-	FVI	1	DAI	Negativo	FVI
Caso 13	476	No	SQTL	3,5	No	KCNH2+ (del 3079-3124)	SQTL2

A: adenina en homocigosis; Al: alanina; Arg: arginina; Asp: ácido aspártico; BB: bloqueadores beta; C: citosina en homocigosis; DAI: desfibrilador automático implantable; FVI: fibrilación ventricular idiopática; G: guanina en homocigosis; Gly: glicina; Glu: ácido glutámico; His: histidina; Met: metionina; R: guanina/adenina en heterocigosis; S: guanina/citosina en heterocigosis; Ser: serina; SQTL: síndrome de QT largo; Thr: treonina; Tpf: triptófano; Val: valina.

la enfermedad, pero para establecer de manera incontestable la patogenicidad del resto de las mutaciones, sería preciso un estudio de las propiedades biofísicas del canal iónico afectado con esa mutación. Sin embargo, ciertos datos, como la zona del canal afecto, el cambio aminoácido resultante y la ausencia de esta proteína en los controles, orientan sobre la patogenicidad de la mutación⁹.

En nuestra serie, el 22,2% de los enfermos con SQTL y el 50% de los casos de FVI permanecieron con genotipo negativo. Ello subraya la necesidad de extender el análisis genético en los casos negativos al resto de los genes descritos, así como la importancia de explorar nuevos genes candidatos para explicar la causa del SQTL^{10,11}.

La proporción de eventos arrítmicos tras tratamiento con bloqueadores beta, mayor en los SQTL3, es elevada; la razón fundamental es el sesgo de selección por tratarse de población en alto riesgo reclutada en ámbito hospitalario, con 8 de los 13 casos reanimados tras una parada cardiaca.

Dos de los 4 pacientes con FVI presentaron mutaciones. Aunque no podemos saber el impacto patogénico de estas mutaciones, uno de los casos presentó tres mutaciones en la región N-terminal de *KCNH2*, con alta probabilidad de alterar la corriente de potasio a través del canal. Nuestro trabajo sugiere que el test genético tiene utilidad diagnóstica en los pacientes supervivientes a una

fibrilación ventricular en los que no se llegue al diagnóstico tras un protocolo de estudio completo, incluso tras test farmacológicos negativos.

El 31,5% de los familiares estudiados eran portadores de la mutación y el 33% de éstos, portadores silentes. Aunque todavía es incompleto el conocimiento acerca del pronóstico de los portadores silentes, es obligado prevenirlos sobre el uso de fármacos que prolonguen el intervalo QT y valorar la iniciación de tratamiento con bloqueadores beta.

En conclusión, en nuestra experiencia inicial, el estudio genético tuvo una alta sensibilidad en nuestra serie de pacientes con SQTL y su resultado difiere del previamente descrito porque el subtipo 2 es el más prevalente. Nuestro trabajo sugiere que el análisis genético de estos tres genes puede ser una prueba útil en la FVI. Estas hipótesis deben ser contrastadas en estudios con mayor tamaño muestral.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. Clínica y genética en el síndrome de QT largo. Rev Esp Cardiol. 2007;60:739-52.
- Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. Heart Rhythm. 2005;2:507-17.
- Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome clinical impact. Circulation. 1999;99:529-33.
- Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Registry (CASPER). Circulation. 2009;120:278-85.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. Circulation. 2000;102:1178-85.
- Doyle DA, Moraes Cabral J, Puetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science. 1998;280:69-77.
- Gimeno JR, Lacunza J, García-Alberola A, Cerdán MC, Oliva MJ, García-Molina E, et al. Penetrance and risk profile in inherited cardiac diseases studied in a dedicated screening clinic. Am J Cardiol. 2009;104:406-10.

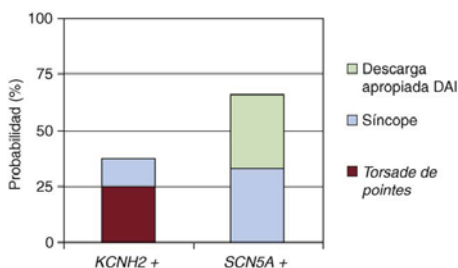


Figura 1. Probabilidad de sufrir un evento (síncopa, descarga apropiada del desfibrilador automático implantable [DAI] o torsade de pointes) tras tratamiento con bloqueador beta ($p > 0,05$).

8. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA*. 2005;294:3027-8.
9. Millat G, Chevalier P, Restier-Miron L, Da Costa A, Bouvagnet P, Kugener B, et al. Spectrum of pathogenic mutations and associated polymorphisms in a cohort of 44 unrelated patients with long QT syndrome. *Clin Genet*. 2006;70:214-27.
10. Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, et al. Scn4b-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2007;116:134-42.
11. Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, et al. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*. 2006;114:2104-12.

ANEXO II

Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome

Irene Amorós, BPharm,* Juan Jiménez-Jáimez, MD,[†] Luis Tercedor, MD,[†] Adriana Barana, BSci,* Ricardo Gómez, BPharm, PhD,* Marta González de la Fuente, BPharm,* Pablo Dolz-Gaitón, BSci,* Miguel Álvarez, MD,[†] Esther Martínez-Espín, PhD,[‡] José A. Lorente, MD, PhD,[§] Rafael Melgares, MD, PhD,[†] Juan Tamargo, MD, PhD, FESC,* Eva Delpón, BPharm, PhD,* Ricardo Caballero, BPharm, PhD*

*Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, [†]Arrhythmias Unit, Cardiology Department, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, [‡]Lorgen GP, SL, BIC, and [§]Forensics and Legal Medicine Department and Genyo, Centro Pfizer, Universidad de Granada, Granada, Spain.

BACKGROUND Long QT syndrome (LQTS) is characterized by a prolonged QT interval that can lead to severe ventricular arrhythmias (torsades de pointes) and sudden death. Congenital LQTS type 2 (LQT2) is due to loss-of-function mutations in the KCNH2 gene encoding Kv11.1 channels responsible for the rapid component of the delayed rectifier current.

OBJECTIVE The purpose of this study was to determine the functional properties of the LQT2-associated mutation p.E637G found in a Spanish family.

METHODS Wild-type (WT) and p.E637G Kv11.1 channels were transiently transfected in Chinese hamster ovary cells, and currents were recorded using the patch-clamp technique.

RESULTS The p.E637G channels lost inward rectification and K⁺ selectivity, generating small but measurable slowly activating, noninactivating currents. These important alterations were corrected neither by cotransfection with WT channels nor by incubation at low temperatures or with pharmacological chaperones. As a consequence of its effects on channel gating, the mutation significantly reduced the outward repolarizing current during the action potential (AP), resulting in a marked lengthening of the duration of a simulated human ventricular AP.

Introduction

Long QT syndrome (LQTS) is characterized by a prolonged QT interval that can be associated with syncope and sudden death due to torsades de pointes, ventricular tachycardia, and fibrillation.¹ Congenital LQTS type 2 (LQT2) is due to

The first two authors contributed equally to this study. This study was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2008-04903), Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (Red HERACLES RD06/0009 and PI080665), Fundación LILLY, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC-13), and Spanish Society of Cardiology grants. **Address reprint requests and correspondence:** Ricardo Gómez, BPharm, PhD, Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain. E-mail address: ricardo.gomez@med.ucm.es.

CONCLUSION We have identified and characterized an LQT2-associated mutation that through removal of C-type inactivation and reduction of K⁺ selectivity causes the QT prolongation observed in the patients carrying the mutation. Moreover, the results obtained demonstrate the importance of the glutamic acid at position 637 for the inactivation process and K⁺ selectivity of Kv11.1 channels.

KEYWORDS Long QT syndrome; Kv11.1 channels; Missense mutation; Patch-clamp; HERG

ABBREVIATIONS AP = action potential; CHO = Chinese hamster ovary cells; E_{rev} = reversal potential; I_{E637G} = current generated by p.E637G Kv11.1 channels; I_{Kr} = rapid component of the delayed rectifier K⁺ current; I_{Kv11.1} = current generated by Kv11.1 channels; I_{WT} = current generated by WT Kv11.1 channels; I_{WT/E637G} = current generated by cells cotransfected with WT and p.E637G Kv11.1 channels; I-V = current-voltage; k = slope of the activation/inactivation curve; LQTS = long QT syndrome; SEM = standard error of the mean; τ_{act} = time constant of activation; τ_f = fast time constant of deactivation; τ_s = slow time constant of deactivation; V_h = midpoint of the activation/inactivation curve; WT = wild-type

(Heart Rhythm 2011;8:463–470) © 2011 Heart Rhythm Society. All rights reserved.

loss-of-function mutations in the KCNH2 gene (HERG).¹ KCNH2 encodes the pore-forming subunit of the channels (Kv11.1) that generate the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current (I_{Kr}), which is critical for action potential (AP) repolarization.² Approximately 450 LQT2-associated mutations are known so far, and most of them are missense mutations.² The studies demonstrated that these mutations mostly affect protein folding, promote retention in the endoplasmic reticulum, or disrupt trafficking to the surface membrane.² Other mutations alter the gating of the channels by several mechanisms, including enhancing inactivation, acceleration of the deactivation rate, or shifting in the voltage dependence of channel inactivation.^{2–4} We have identified a LQT2-associated missense mutation in a Span-

ish family, which results in the substitution of glutamic acid to the uncharged amino acid glycine at position 637 (p.E637G). Change of this residue to charged amino acids such as lysine (p.E637K) or aspartic acid (p.E637D) has been previously associated with LQT2,^{5,6} although only the functional properties of p.E637K were studied.⁵ The p.E637K channels did not generate measurable currents in *Xenopus* oocytes, however, when p.E637K and wild-type (WT) channels were coexpressed, the currents generated displayed lower amplitude and small changes in the voltage dependence of activation, inactivation, and K⁺ selectivity compared with WT currents.

This study aims to determine the effects of the substitution of a negatively charged residue (E) located in the outer pore region by a neutral amino acid (G) on HERG channel properties and to identify the mechanism by which p.E637G mutation of Kv11.1 channels can lead to QT prolongation.

Methods

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained for the genetic screening test. Genomic DNA was isolated from white blood cell by conventional methods. Polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism analyses were used to screen for mutations in KCNQ1, KCNH2, and SCN5A. Human cardiac KCNH2 was kindly gifted by Dr. C. Bezina (University of Amsterdam, The Netherlands).⁷ The p.E637G mutation was introduced using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as described elsewhere.^{8,9} WT and p.E637G channels were transiently transfected in Chinese hamster ovary (CHO) cells, and currents were recorded using the whole-cell patch-clamp configuration.⁸⁻¹⁰ For simulating the shapes of ventricular APs, we employed the Grandi-Bers model of a human ventricular AP.¹¹ Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Paired or unpaired *t*-test or one-way analysis of variance followed by the Newman-Keuls test were used to assess statistical significance where appropriate. A value of $P < .05$ was considered statistically significant. A detailed Methods section is available online.

Results

Case description

A woman diagnosed with epilepsy at age 11 was referred to the Arrhythmias Unit for evaluation because of a ventricular fibrillation episode. She had been followed up in the Epilepsy Unit with poor response to antiepileptic drugs. Indeed, she often had syncope in response to auditory stimuli such as the sound of the telephone. Magnetic resonance imaging of the head and electroencephalography showed no abnormal findings. At the age of 43, triggered by the buzzing of an alarm clock, she suddenly lost consciousness with no reaction to external stimuli. When the emergencies services arrived, she was in ventricular fibrillation, which required

external defibrillation with 200 J. The basal electrocardiogram of the proband showed a marked QT prolongation (Bazzett-corrected QT interval [QTc] of 560 ms), suggesting an LQT2 (Figure 1A). Her two daughters (aged 25 and 23) also presented with prolonged QTc (Figures 1B, 1C), although they are neurologically and cardiologically asymptomatic at this time.

Genetic analysis

Direct DNA sequence analysis from the proband identified a mutation at nucleotide 1910 of KCNH2 consisting of an adenine-to-guanine substitution. This mutation leads to an amino acid substitution from glutamic acid to glycine at position 637 of the Kv11.1 channel (Figure 2B) and was not observed in the DNA samples of more than 200 control subjects. Sequence analysis of all the other exons of KCNH2 did not reveal any other mutation, and screening for mutations in KCNQ1 and SCN5A was negative. Her two daughters presented the same mutation in KCNH2 (Figure 2A), and both of them were diagnosed with LQTS based on the Schwartz score (>4 points).¹ The proband and her daughters also carried a polymorphism (g.1956T \rightarrow C) in KCNH2, which does not cause substitution in the encoded amino acid (Tyr652). Her sister, brother, and parents, who did not have a prolonged QTc, did not present the mutation (Figure 2A). The penetrance of LQTS among the mutation carriers was 100%.

Functional characterization of p.E637G channels

To determine the mechanism by which mutation of p.E637G of Kv11.1 channels can lead to LQTS, we compared currents recorded in CHO cells expressing homotetrameric WT (I_{WT}) and p.E637G (I_{E637G}) or heterotetrameric WT/p.E637G ($I_{WT/E637G}$) channels. Currents were recorded using standardized protocols by applying 5-s pulses from -80 mV to voltages between -80 and $+60$ mV in 10-mV increments. As shown in Figure 3A, WT Kv11.1 channels generated a slowly activating current ($\tau_{act} = 951 \pm 85$ ms at 0 mV, $n = 21$) whose amplitude progressively increased with pulses up to 0 mV and then progressively decreased at potentials >0 mV owing to the fast C-type inactivation,¹² resulting in the bell-shaped I-V curve typical of Kv11.1 channels (Figure 3B). The p.E637G channels generated a current with significantly lower amplitude at potentials between -40 and $+40$ mV (Figures 3A and 3B). I_{E637G} amplitude at 0 mV was very small, which did not allow a reliable measurement of the activation kinetics. Therefore, it was measured at $+40$ mV, yielding a τ_{act} value of 734 ± 136 ms ($n = 8$). Interestingly, I_{E637G} did not display inward rectification (Figures 3A and B), and thus the I-V curve did not exhibit a bell-shaped morphology. When p.E637G and WT Kv11.1 channels were coexpressed, the current generated did not exhibit inward rectification either; however, it was larger than I_{E637G} at potentials $\geq +20$ ($P < .05$, $n = 6$; Figure 3B).

Tail currents were recorded on repolarization to -60 mV for 5 s. A biexponential function was fitted to the tail current

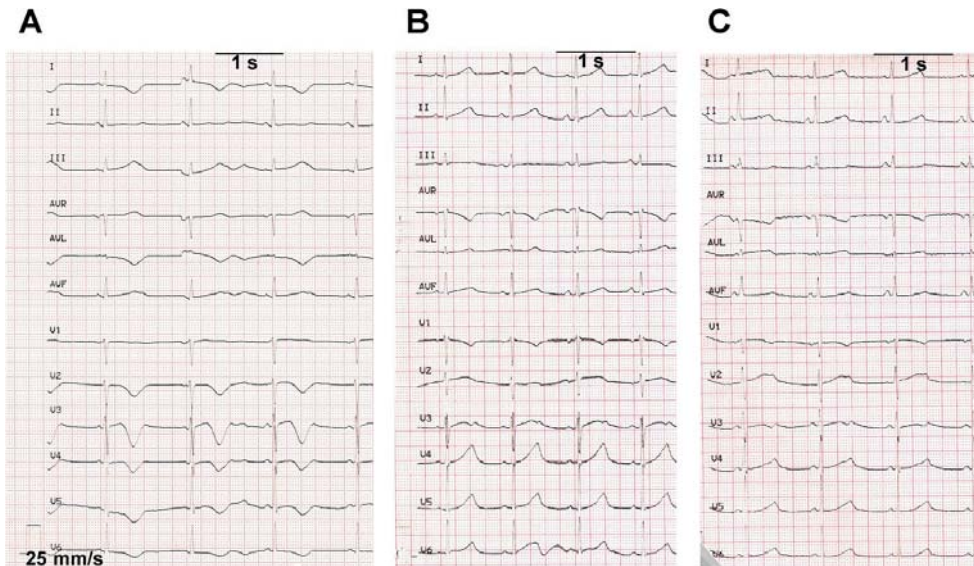


Figure 1 Twelve-lead electrocardiogram of the proband (A) and her two daughters (B and C) showing a marked QT prolongation (A: 560 ms; B: 490 ms; C: 550 ms).

traces recorded after pulses to +60 mV, yielding τ_T and τ_S values of 221 ± 27 and $1,340 \pm 178$ ms for WT Kv11.1 channels. The p.E637G mutation did not modify tail current kinetics (Table 1). However, unlike WT, deactivating tail currents of p.E637G and WT/p.E637G Kv11.1 channels were inward over the range of voltages tested (Figure 3A), which suggested an alteration in K^+ selectivity. To examine whether the p.E637G mutation affected ion selectivity of the channel, we determined the reversal potential (E_{rev}) in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G Kv11.1 channels (Figure 4A, 4B, Table 1). The E_{rev} values were much more positive for p.E637G and WT/p.E637G than for WT channels ($P < .001$ vs. WT), suggesting that p.E637G and WT/p.E637G channels were less selective for K^+ ions than for WT channels.

Mean activation curves and the fit of a Boltzmann function to the data for WT, p.E637G, and WT/p.E637G channels are depicted in Figure 4C. As mentioned, the tail currents generated by p.E637G and WT/p.E637G channels were inward after pulses to potentials between -30 and +60 mV (Figure 4C). Normalized activation curves demonstrated that the mutation alone or when coexpressed with WT shifted the midpoint toward more positive potentials and decreased the slope of the curve ($P < .05$; Figure 4D, Table 1).

The loss of inward rectification strongly suggested that the p.E637G mutation disrupted the inactivation process of the channel. To confirm this hypothesis, we looked for changes in the steady-state inactivation (availability) of

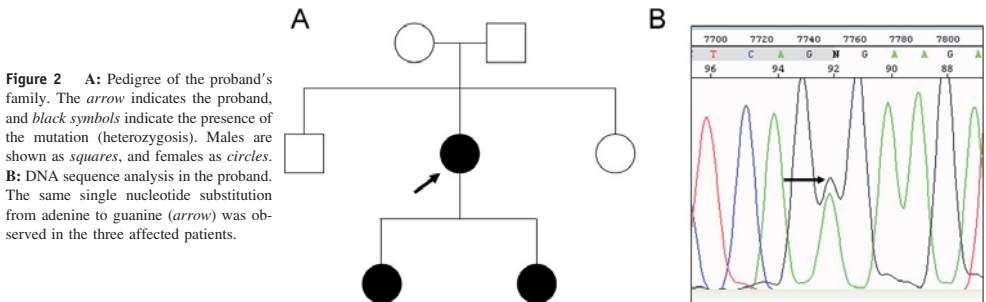


Figure 2 A: Pedigree of the proband's family. The arrow indicates the proband, and black symbols indicate the presence of the mutation (heterozygosis). Males are shown as squares, and females as circles. B: DNA sequence analysis in the proband. The same single nucleotide substitution from adenine to guanine (arrow) was observed in the three affected patients.

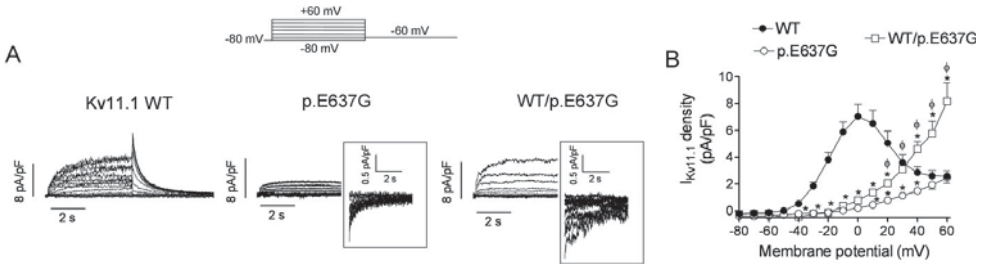


Figure 3 Traces obtained by applying the protocol shown at the top (A) and current density-voltage relationships (B) for currents recorded in cells transfected with WT, p.E637G, and WT/p.E637G Kv11.1 channels. Each point represents the mean \pm SEM of six or more experiments. * $P < .05$ vs. WT; $^{\phi}P < .05$ vs. p.E637G.

the channels using standardized protocols described elsewhere (online Figure 1).¹⁰ Figure 4E shows normalized, corrected for closing inactivation curves for WT, p.E637G, and WT/p.E637G channels together with the Boltzmann fits to the data. The V_h and k for WT channels were -62.3 ± 5.9 mV and 28.1 ± 1.3 , respectively (Table 1). As expected, inactivation of both p.E637G and WT/p.E637G channels was greatly reduced compared with WT channels, in such a way that at +20 mV, $93.1\% \pm 0.7\%$ of the WT channels were inactivated, while only $20.5\% \pm 5.5\%$ and $34.4\% \pm 7.8\%$ of p.E637G and WT/p.E637G channels, respectively, were inactivated at this potential ($P < .05$ vs. WT; Figure 4E). Since dofetilide preferentially interacts with Kv11.1 channels in the inactivated state, we tested whether the p.E637G mutation also affects Kv11.1 channel affinity for this drug. Blockade induced by $1 \mu\text{M}$ dofetilide in p.E637G and WT/p.E637G was significantly smaller than in WT channels (Figure 4F).

Effects of the incubation of cells expressing p.E637G channels with pharmacological chaperones

Some reports have demonstrated that trafficking of Kv11.1 channel mutants can be restored by reducing the incubation temperature during cell culture¹³ or by incubation with compounds (4-phenylbutyrate or glycerol) or

drugs (dofetilide, terfenadine or its metabolite fexofenadine) that act as protein-stabilizing agents by improving channel trafficking (pharmacological chaperones).¹⁴ Reducing the incubation temperature during cell culture to 27°C or incubation of the p.E637G transfected cells with $1 \mu\text{M}$ terfenadine or $1 \mu\text{M}$ dofetilide for 24 hours did not modify current properties compared with that recorded under control conditions (not shown). Conversely, when p.E637G transfected cells were incubated with $1 \mu\text{M}$ fexofenadine (Figure 5A) or 5 mM 4-phenylbutyrate (Figure 5B), the current generated was larger but with the same time- and voltage-dependent features as those generated by nonincubated cells ($n = 8$ in each group). Furthermore, the E_{rev} of I_{E637G} recorded in cells incubated with fexofenadine or 4-phenylbutyrate was similar to that obtained in nonincubated cells (Figure 5C, Table 1). I_{WT} recorded in cells incubated with fexofenadine or 4-phenylbutyrate were identical to those generated by nonincubated cells (Figure 5B).

Physiological consequences of the p.E637G mutation

To determine the consequences of p.E637G mutation in a physiologically relevant setting, we used a human endocardial AP voltage clamp protocol (Figure 6A). In cells transfected with WT channels, current was small at the peak of the AP owing to the rapid inactivation of the channels.

Table 1 Time- and voltage-dependent properties of WT and mutant Kv11.1 channels

	Activation			Deactivation			Inactivation		
	V_h , mV	k , mV	τ_{act} , ms	τ_f , ms	τ_s , ms	V_h , mV	k , mV	E_{rev} , mV	
WT	-11.9 ± 2.1	10.2 ± 1.2	951 ± 85	221 ± 27	$1,340 \pm 178$	-62.3 ± 5.9	28.1 ± 1.3	-78.3 ± 0.7	
p.E637G	-1.9 ± 2.9^a	22.7 ± 4.6^a	734 ± 136	160 ± 35	$1,271 \pm 300$	-5.9 ± 2.4^a	4.8 ± 1.3^a	-17.8 ± 0.9^a	
WT/p.E637G	-3.1 ± 2.0^a	18.6 ± 2.9^a	$1,025 \pm 200$	238 ± 55	$1,996 \pm 453$	$-30.8 \pm 5.3^{a,b}$	10.0 ± 5.1^a	-18.4 ± 4.0^a	
p.E637G (Fexof)	-0.9 ± 1.6^a	19.7 ± 3.2^a	998 ± 120	176 ± 26	$1,262 \pm 167$	-7.1 ± 5.1^a	3.8 ± 5.4^a	-20.5 ± 1.4^a	
p.E637G (4-PB)	-2.3 ± 2.9^a	19.7 ± 4.2^a	899 ± 163	166 ± 26	$1,264 \pm 268$	-5.8 ± 4.9^a	4.7 ± 3.9^a	-18.3 ± 3.2^a	

Note: V_h and k : midpoint and slope values of the activation/inactivation curves; τ_{act} : time constant of activation, measured at 0 mV in WT and at +40 mV in the rest of the constructs; τ_f and τ_s : fast and slow time constants of deactivation of tail currents at -60 mV recorded after pulses to +60 mV.

^a $P < .05$ vs. WT.

^b $P < .05$ vs. p.E637G.

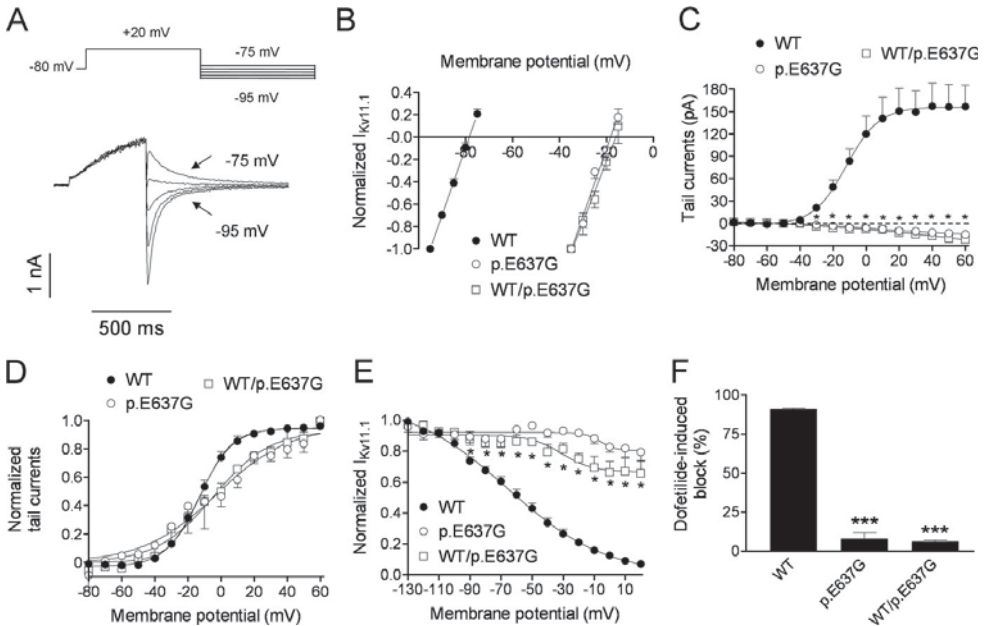


Figure 4 A: I_{WT} traces recorded by applying 500-ms pulses from -80 to $+20$ mV followed by repolarization to voltages between -95 and -75 mV in 5-mV increments. B: Normalized amplitude of tail currents recorded in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G on return to potentials between -95 and -75 mV or between -35 and -15 mV, respectively. Mean (C) and normalized (D) activation curves as calculated from peak tail-current amplitudes recorded on return to -60 mV in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G. E: Corrected for closing inactivation curves constructed by plotting the initial current at $+40$ mV recorded in cells expressing WT, p.E637G, and WT/p.E637G Kv11.1 channels. In C and E, $*P < .05$ vs. WT. F: Dofetilide ($1 \mu\text{M}$)-induced block measured as reduction of the amplitude of the tail currents recorded at -60 mV after pulses to $+60$ mV in WT, p.E637G, and WT/p.E637G channels. $***P < .001$ vs. WT. Each point/bar represents mean \pm SEM of six or more experiments.

However, as the voltage became less positive, amplitude of the outward current progressively increased, reaching a maximum before the final declining phase of the AP. Cells transfected with either p.E637G or WT/p.E637G channels generated a small current that rapidly activated, coinciding with the peak of the AP, and progressively decreased as the voltage became more negative. Due to the loss of K^+ selectivity, an inward depolarizing Na^+ current was produced during the final phase of repolarization. Therefore, the mutation significantly reduced the charge crossing the membrane estimated from the integral of the current traces compared with WT channels (Figure 6B). Furthermore, incubation of cells expressing p.E637G with fexofenadine or 4-phenylbutyrate resulted in charge values larger than in nonincubated cells that were also significantly lower than those obtained in cells expressing WT channels (Figure 6B).

Simulation of the effects of p.E637G mutation on the cardiac AP

The effects of the mutation on the AP characteristics were simulated using a theoretical model of a human ventricular myocyte. The model was run for endocardial and epicardial

cells at different frequencies ranging between 0.1 and 3 Hz. Given the heterozygous nature of the disease, in the patient most of the channels will be heterotetramers of WT and p.E637G subunits. Therefore, the model was run considering the conductance of WT channels and also the conductance reduction (70.2%) produced by WT/p.E637G channels. Furthermore, the time constants, midpoint, and slope values of the activation/inactivation curves and the E_{rev} for WT and WT/p.E637G channels were also incorporated.

As can be observed, currents obtained by incorporating these values were similar to those recorded experimentally (Figure 6C). As a consequence of the modifications in the current properties, the mutation prolonged the AP duration measured at 50% and 90% of repolarization (19.2% and 22.1%, respectively, at 1 Hz in endocardial cells; Figure 6D). The AP duration prolongation was greater in endocardial than in epicardial cells and at slow than at fast driving frequencies (inset of Figure 6D). Furthermore, neither early after-depolarizations nor alternans of the AP duration were predicted by the model when it was run at 0.1 and 3 Hz, respectively. Conversely, alternans were observed when the epicardial and endocardial models were run in control conditions (online Figure II).

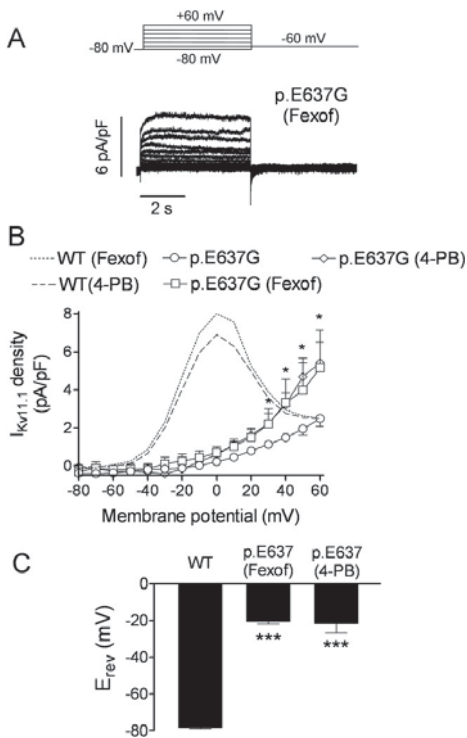


Figure 5 A: Current traces recorded by applying the protocol shown at the top in cells transfected with p.E637G Kv11.1 channels incubated with 1 μ M fexofenadine for 24 hours. B: Current density-voltage relationships for currents recorded in cells transfected with p.E637G Kv11.1 channels incubated or not with 1 μ M fexofenadine (Fexof) and 5 mM 4-phenylbutyrate (4-PB). * P < .05 vs. nonincubated cells. Dotted and dashed lines represent current density-voltage relationships for WT Kv11.1 channels incubated with fexofenadine and 4-phenylbutyrate, respectively. C: Mean E_{rev} for currents recorded in cells expressing WT or p.E637G incubated with fexofenadine and 4-phenylbutyrate. *** P < .001 vs. WT. Each point/bar represents mean \pm SEM of six or more experiments.

Discussion

In this study, we have characterized a LQT2-associated missense mutation, which implies a substitution of the glutamic acid to glycine at position 637, which is located in the outer mouth of the pore at the beginning of S6 (Figure 7B). The mutation abolished inward rectification by disrupting C-type inactivation of Kv11.1 channels and eliminated the K^+ selectivity. These alterations caused a marked decrease of the Kv11.1 current ($I_{Kv11.1}$) amplitude during the AP, which explains the QT prolongation observed in the carriers of this mutation.

p.E637 mutation alters channel gating

We have found a single base substitution (g.1910A→G) in the KCNH2 gene in a 43-year-old woman. The proband,

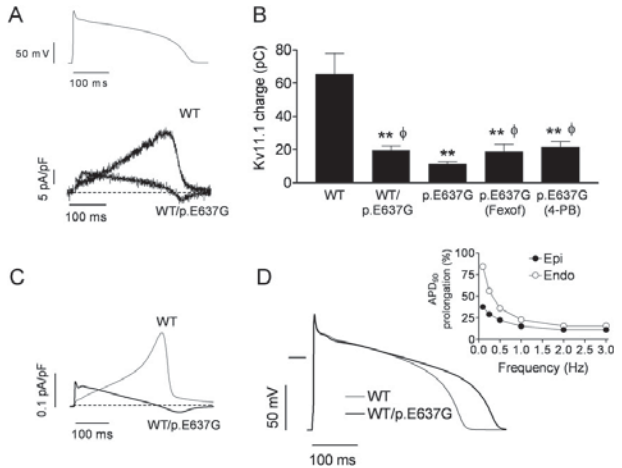
who presented a marked prolongation of the QT interval, often had syncope in response to auditory stimuli and was diagnosed with LQT2 after a ventricular fibrillation episode. Genetic screening identified the same missense mutation in her two daughters, who also presented QT prolongation, although they are asymptomatic at this time. The proband had been diagnosed with epilepsy and treated unsuccessfully with oxcarbazepine for 32 years. Later, neurological data obtained after her reevaluation were not consistent with epilepsy. Furthermore, after the treatment with β -blockers was implemented, she did not experience any other cardiac or epileptic episode. Nevertheless, since Kv11.1 channels are also expressed in the central nervous system, we cannot discard the presence of neurally mediated seizures in patients carrying this mutation. Indeed growing evidence suggests a pathogenic link between LQTS and epilepsy, particularly in LQT2 patients.^{2,15}

At physiologically relevant membrane potentials, the $I_{Kv11.1}$ amplitude recorded by applying depolarizing pulses in cells expressing p.E637G and WT/p.E637G channels was significantly smaller than that recorded in cells expressing WT channels. Importantly, coexpression of WT and mutant channels reduced current density by more than 50% compared with the expression of WT alone, suggesting that p.E637G mutation produced a dominant negative effect.

Moreover, the mutation induced severe alterations in the voltage dependence of activation (a positive shift in the midpoint and a marked change in the slope of the activation curve), a loss of channel selectivity (E_{rev} was shifted by \approx 60 mV to more positive potentials), and a disruption of C-type inactivation (the current did not display inward rectification). Thus, our results support that the activation, inactivation, and K^+ selectivity in Kv11.1 channels are functionally related¹⁶ and highlight the importance of the Glu637 residue in the control of these processes. Mutations in some amino acids of the outer mouth of the pore region of Kv11.1, comprising the extracellular portions of S5 and S6 domains and the pore loop, also modified channel voltage dependence of activation, disrupted C-type inactivation, and eliminated K^+ selectivity.^{16,17} Based on these results, it was proposed that this outer pore region, which is unique among voltage-dependent K^+ channels, is a key determinant of the special features of Kv11.1 channels.^{16,18} In this regard, it seems that the conformational flexibility of this region, as a consequence of a reduced hydrogen bonding capability, is an important contributing factor.¹⁶ Therefore, it could be possible that the introduction of a glycine at position 637 increases the hydrogen bonding capability, which in turn is detrimental to C-type inactivation. Indeed, Glu637, which is highly conserved among the Kv11.x channel family, is substituted by a glycine in other voltage-gated K^+ channels such as Kv1.5 or Kv7.1 (Figure 7A), which displays inactivation properties very different from those of Kv11.1.

Hayashi et al⁵ described the effects produced by another mutation at this position (p.E637K) and found somewhat

Figure 6 **A:** Current traces elicited by AP command signals (*top*) as voltage protocol recorded in cells expressing WT or WT/p.E637G channels. **B:** Mean charge crossing the membrane through WT or mutant Kv11.1 channels. Each bar represents the mean \pm SEM of six or more experiments. *******P* <.01 vs. WT; ϕ *P* <.05 vs. p.E637G. Current traces (**C**) and AP (**D**) simulated using the Grandi-Bers model of ventricular AP by incorporating data from WT or WT/p.E637G Kv11.1 channels. The inset in **D** shows the frequency dependence of the AP duration prolongation.



different results. They showed that expression of p.E637K in *Xenopus* oocytes did not produce detectable currents. However, coexpression of p.E637K and WT Kv11.1 channels generated inward rectifying currents with small modifications in their biophysical properties. Indeed, they described a positive shift in the voltage dependence of activation without variations in the slope of the activation curve, a negative shift in the voltage dependence of inactivation, and a 6-mV positive shift in the E_{rev} compared with WT channels. The apparent discrepancies between our results and those obtained by Hayashi et al could be attributed to the different amino acid for which the glutamic acid is substituted (Lys vs. Gly).

It has been described that defective Kv11.1 channel trafficking can cause LQT2 in most cases.^{2,19} Furthermore, some reports demonstrated that trafficking of these mutants can be restored by reducing the incubation temperature during cell culture¹³ or by incubation with unspecific chaperones (4-phenylbutyrate) and high- (terfenadine, dofetilide) or low-affinity (fexofenadine) Kv11.1 channel blockers.^{14,19} Expression of p.E637G channels was modified neither by reducing the incubation temperature during cell culture nor by incubation with terfenadine or dofetilide. The latter could be attributed to the low affinity for p.E637G channels exhibited by dofetilide, which in turn is probably due to the facts that dofetilide is an inactivated-state Kv11.1

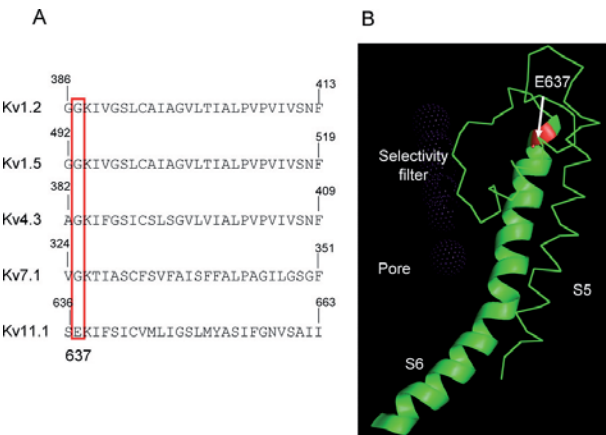


Figure 7 **A:** Amino acid sequence alignments of the S6 domain of several voltage-dependent K⁺ channels. **B:** Molecular modeling of S5 and S6 segments of Kv11.1 channels using the crystalized structure of Kv1.2 as a template showing the location of Glu637 residue (*red*).

blocker and p.E637G channels do not inactivate. Conversely, incubation with fexofenadine and 4-phenylbutyrate significantly increased current amplitude and density, without affecting the biophysical features of p.E637G channels, that is, absence of inward rectification, disruption of inactivation, and loss of K^+ selectivity.

Physiological consequences of the mutation

The alterations in the channel gating induced by the p.E637G mutation produced a marked reduction in $I_{Kv11.1}$ amplitude during an AP, leading to a delayed repolarization. Indeed, the charge crossing the membrane was reduced in mutant channels. Interestingly, when integrating all the alterations induced by the mutation in a simulated human ventricular AP, a marked lengthening of the AP duration was produced, which correlates with the QT prolongation observed in the mutation carriers. It may seem surprising that a mutation that reduces inactivation can prolong AP duration. However, it should be considered that loss of Kv11.1 channel inactivation leads to the elimination of the outward tail current produced by the fast recovery of inactivated channels upon repolarization.¹⁷ Moreover, it is possible that the positive shift of E_{rev} induced by p.E637G mutation can also contribute to the delay in the repolarization process.¹⁷ Indeed, Na^+ ions can be carried through these mutant channels, resulting in an inward current at the end of repolarization, as shown by the AP clamp experiments. The AP prolongation may result in the development of early after-depolarizations, which can lead to severe ventricular arrhythmias. However, in the model used, neither early after-depolarizations nor alternans were generated in epicardial and endocardial cells. Importantly, the prolongation induced by the mutation was greater in endocardial than in epicardial cells, especially at slow frequencies. This fact suggests that the mutation would exacerbate the transmural dispersion of repolarization, which has been identified as the principal arrhythmogenic substrate in LQTS.²⁰

Recent data have demonstrated the relevance of the location, coding type, and topology of the mutation to predict the clinical phenotype of the patient.^{21,22} Indeed, the QTc is longer and cardiac events are more frequent in patients with mutations in the transmembrane pore region (comprising S5 and S6 segments and the P-loop) than in patients with mutations in transmembrane nonpore (S1 to S4), N- or C-terminus regions, in patients with missense mutations than in patients with either frameshift/nonsense or other mutations, and in patients with mutations located in α -helical domains than among patients with mutations in β -sheet domains or other uncategorized locations.²¹ Therefore, p.E637G is a high-risk mutation considering that it is missense and is located in the α -helical domain of the S6 segment.

Conclusion

We have identified a LQT2-associated mutation that through removal of C-type inactivation and reduction of K^+ selectivity decreases outward repolarizing current during the AP, leading to a marked delay of repolarization. Moreover, the results

obtained demonstrate the importance of Glu637 in the inactivation process and ion selectivity of Kv11.1 channels.

Appendix

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.hrthm.2010.11.032.

References

- Roden DM. Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2008;358:169–176.
- Sanguinetti MC. HERG1 channelopathies. *Pflügers Arch* 2010;460:265–276.
- Zhao JT, Hill AP, Varghese A, et al. Not all hERG pore domain mutations have a severe phenotype: G584S has an inactivation gating defect with mild phenotype compared to G572S, which has a dominant negative trafficking defect and a severe phenotype. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:923–930.
- Shushi L, Kerem B, Goldmit M, et al. Clinical, genetic, and electrophysiologic characteristics of a new PAS-domain HERG mutation (M124R) causing long QT syndrome. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2005;10:334–341.
- Hayashi K, Shimizu M, Ino H, et al. Characterization of a novel missense mutation E637K in the pore-S6 loop of HERG in a patient with long QT syndrome. *Cardiovasc Res* 2002;54:67–76.
- Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 2005;294:2975–2980.
- Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A, et al. A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res* 2003;59:27–36.
- Gómez R, Caballero R, Barana A, et al. Nitric oxide increases cardiac I_{K1} by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;105:383–392.
- Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, et al. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311 decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:15631–15636.
- Caballero R, Moreno I, González T, et al. Spiromolone and its main metabolite, canrenonic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003;107:889–895.
- Grandi E, Pasqualini FS, Bers DM. A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca^{2+} transient. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:112–121.
- Spector PS, Curran ME, Anon A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I_{K1} channel. *J Gen Physiol* 1996;107:611–619.
- Paulussen A, Raes A, Matthijs G, Snyders DJ, Cohen N, Aerssens J. A novel mutation (T65P) in the PAS domain of the human potassium channel HERG results in the long QT syndrome by trafficking deficiency. *J Biol Chem* 2002;277:48610–48616.
- Rajamani S, Anderson CL, Anson BD, January CT. Pharmacological rescue of human K^+ channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation* 2002;105:2830–2835.
- Johnson JN, Hofman N, Haglund CM, Cascino GD, Wilde AA, Ackerman MJ. Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology* 2009;72:224–231.
- Liu J, Zhang M, Jiang M, Tseng GN. Structural and functional role of the extracellular S5-P linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol* 2002;120:723–737.
- Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, Thorstad K, Duff HJ. Novel gain-of-function mechanism in K^+ channel-related long-QT syndrome: altered gating and selectivity in the HERG1 N629D mutant. *Circ Res* 2000;86:507–513.
- Ju P, Pages G, Riek RP, et al. The pore domain outer helix contributes to both activation and inactivation of the HERG K^+ channel. *J Biol Chem* 2009;284:1000–1008.
- Anderson CL, Delisle BP, Anson BD, et al. Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism. *Circulation* 2006;113:365–373.
- Antzelevitch C. Ionic, molecular, and cellular bases of QT-interval prolongation and torsade de pointes. *Europace* 2007;9(Suppl 4):iv4–iv15.
- Shimizu W, Moss AJ, Wilde AA, et al. Genotype-phenotype aspects of type 2 long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2052–2062.
- Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, et al. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009;120:1752–1760.

ANEXO III

Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of genetic screening for channelopathies

Jiménez-Jáimez Juan, Tercedor-Sánchez Luis, Álvarez-López Miguel, Sebastián Galdeano Ricardo, Santiago Diaz Pablo, Melgares-Moreno Rafael

Arrhythmias Unit. Cardiology Department. Virgen de las Nieves University Hospital. Granada (Spain)

Dr Juan Jiménez Jáimez. C/ Gloria Mas 2 (Edf Oriente) P 5 3D. 18014. Granada

Ph: 667242021 e-mail: jimenez-jaimenz@gmail.com

I Summary

Cardiac arrest without evidence of rhythm or structural heart disease may be due to genetic disorders with low penetrance. Our aim was to study the usefulness of genetic screening in a small sample of patients with idiopathic ventricular fibrillation. Nine patients with apparently unexplained cardiac arrest and no evident cardiac disease were included. They underwent systematic evaluation including genetic and pharmacological testing for the long QT and Brugada Syndrome.

Three patients presented *missense* mutations, two of them in SCN5A and one in KCNH2. One patient had high-probability Brugada Syndrome-causing mutations. Other patient had three missense mutations in the N-terminal region of KCNH2 with high probability of pathogenicity for the long QT syndrome. In conclusion, genetic testing for the long QT syndrome may be a useful tool to unmask a long QT or Brugada Syndrome in apparently unexplained cardiac arrest.

II Background

Cardiac arrest without evidence of structural heart disease is a condition usually caused by subclinical cardiomyopathies and primary electrical disorders. When all the conventional tests are unable to reach a diagnosis we call it idiopathic ventricular fibrillation (figure 1).¹⁻² These tests include an echocardiography demonstrating left ventricular ejection fraction > 50 %, normal coronary arteries in angiography, resting electrocardiogram with QTc < 440 milliseconds in men and < 460 milliseconds in women and without persistent ST-segment elevation in V1 and V2 (Brugada signs), no structural heart disease in cardiac magnetic resonance and negative procainamide and epinephrine tests.²⁻³ Despite the use of these pharmacological studies that can recognise underlying channelopathies such as Brugada or Long QT syndrome, the

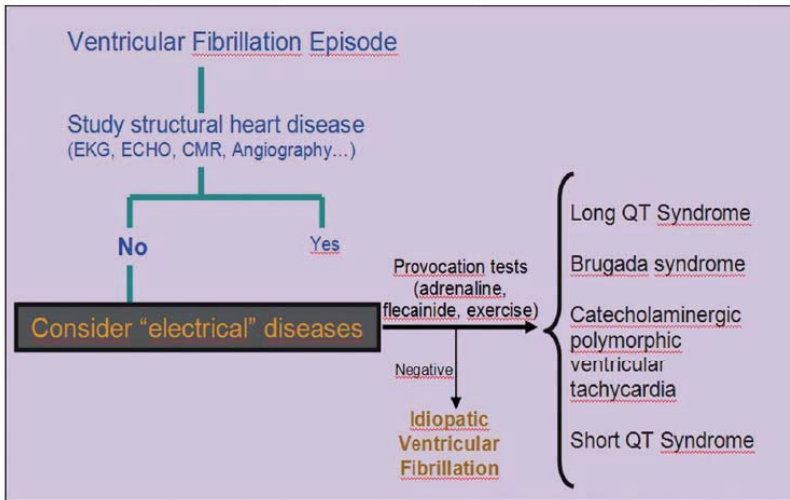


Figure 1: Diagnostic flow diagram illustrating the progressive testing strategy. Note all conventional tests that must result negative to conclude the diagnosis of Idiopathic Ventricular Fibrillation.

etiology of sudden cardiac arrest still remains unexplained in a high proportion of patients (33,3 % 44 % in both studies of Kranh et al) ²⁻³.

If we rule out other possible causes for it (ionic disorders, subclinical cardiomyopathies...), electrical disorders must be considered. The most feasible explanation for the lack of sensitivity of pharmacological tests in cardiac channelopathies is what is called "repolarization reserve". This concept, first introduced by Roden, ⁴ consists of a strong safety of ventricular repolarization in normal hearts due to the co-existence of multiple and different potassium channels. So, in a normal situation, despite the blockade of one single type of channels, this does not lead to QT prolongation and ventricular arrhythmias. To sum up, loss of function mutation in one important potassium channel can lead to a torsade de pointes tachycardia with normal QTc interval y surface electrocardiogram

Few works have demonstrated an important contribution of targeted genetic screening for channelopathies to the yield of the diagnosis in sudden cardiac arrest when all conventional tests, including pharmacological tests, are negative. Our aim was to study the prevalence of *missense* mutations for Brugada and Long QT Syndrome in patients who have suffered a cardiac arrest episode with no evidence of structural or electrical cardiac disease in conventional tests

III Material and Methods

Nine patients with Sudden Cardiac Arrest were included and underwent standard testing to rule out underlying heart disease (Figure 1). This included continuous ECG

Table 1: Baseline characteristics of our population study

N=9	Age	Sex	QTc	Symptoms before cardiac arrest
Case 1	24	Male	366	No
Case 2	58	Female	360	Syncope
Case 3	10	Male	400	Palpitations
Case 4	11	Female	390	No
Case 5	52	Female	412	No
Case 6	43	Male	420	Syncope
Case 7	47	Female	430	No
Case 8	35	Male	400	No
Case 9	53	Female	406	No
Total	37 ± 18,1 (10-58)	55% Females	398,2 ± 23,2 (360-430)	66,6 % No

telemetry, transthoracic echocardiography, and coronary angiography, exercise testing, cardiac magnetic resonance imaging, and intravenous adrenaline and procainamide challenge. Adrenaline and procainamide infusions were performed through a peripheral intravenous line with continuous ECG monitoring.

Targeted genetic testing was performed in patients after systematic clinical testing. Genetic testing was performed on the following genes: KCNQ1, KCNH2, SCN5A for Long QT syndrome and SCN5A for Brugada Syndrome.

We designed a trasversal study to evaluate prevalence of mutations and results were analysed using descriptive statistics such as mean, median, mode and proportion.

IV Results

Table 1 shows baseline characteristics of the nine patients included.

Three patients presented mutations, two of them in SCN5A and one in KCNH2. One of the SCN5A mutations was a high-probability Brugada Syndrome-causing mutation (case 9). The patient with KCNH2 mutations had three *missense* mutations in the N-terminal region of KCNH2 with high probability of pathogenicity for the long QT syndrome (case 4). The other positive-genotype patient presented one mutation in SCN5A, but with low probability of pathogenicity for both diseases (case 2). Graphic shown in figure 2 illustrates the proportion of final diagnosis reached due to genetic test.

Case 4

This 11 year old girl presented with idiopathic ventricular fibrillation episode. QTc interval in surface electrocardiogram was 390 miliseconds and epinephrine test was negative.

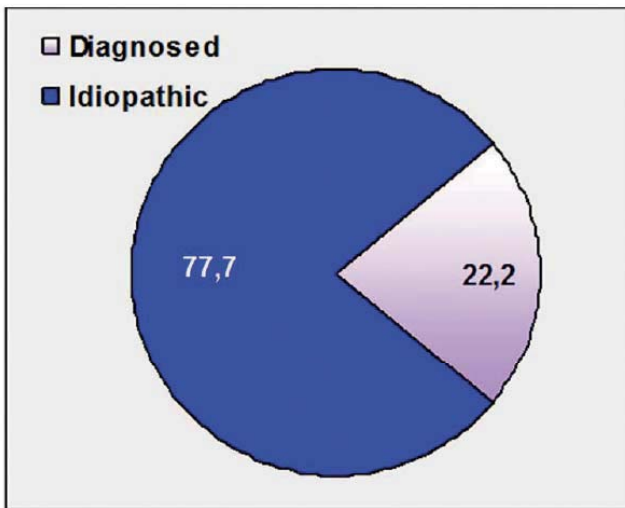


Figure 2: Final diagnosis was obtained in two out of nine patients

Three *missense* mutations were found in the N-terminal region of KCNH2.

Case 9

All conventional tests were studied in this 58 year old patient with negative result, including flecainide test (figure 3A). She presented a frame-shift mutation g98747-98748insT (D1816fs) located in the fourth domain of alpha subunit of sodium channel (SCN5A). Similar mutations have been described previously related to Long QT Syndrome type 3 and Brugada Syndrome. Interestingly, final diagnosis between Long QT and Brugada Syndrome was not possible until direct relatives were studied (figure 4). Two sisters, one son and two nieces presented the same mutation, and some of them showed a pathological electrocardiogram after flecainide infusion suggesting Brugada Syndrome (Figure 3B and 3C). All of them were asymptomatic except one (marked with *), who presented atrial fibrillation, but with negative flecainide test.

Before having studied direct relatives it was impossible for us to make a final diagnosis, because SCN5A is involved in both diseases: Long QT 3 Syndrome and Brugada Syndrome.

V Conclusion

We have described the prevalence of Long QT and Brugada Syndrome mutations in a small sample of patients with idiopathic ventricular fibrillation. Our data suggest the great value that genetic test may achieve when managing patients with cardiac channelopathies. Moreover, we have observed a markedly variable **clinical expres-**

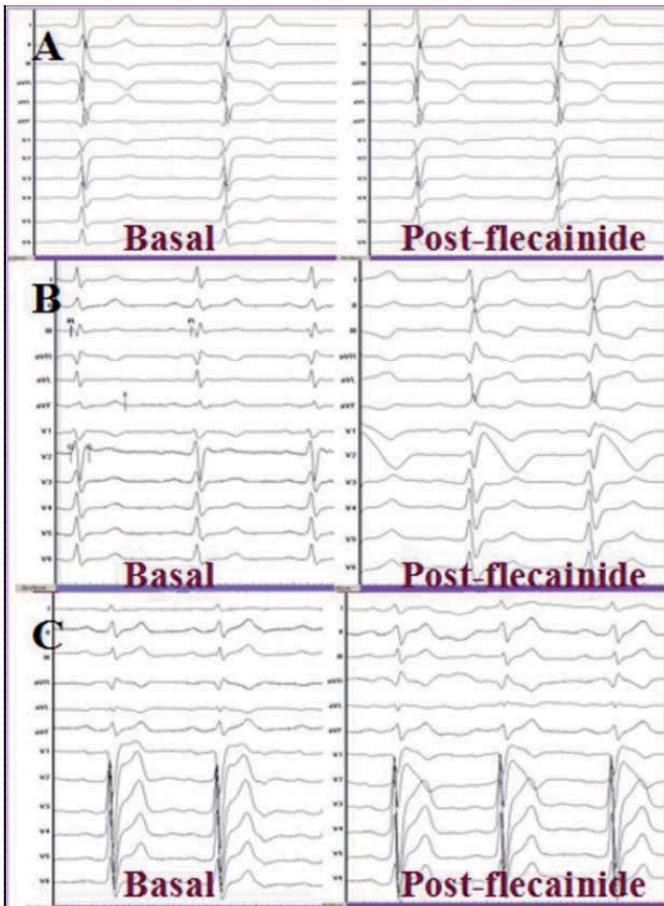


Figure 3: Basal (left) and post-flecainide electrocardiogram (right) in proband (A), her sister (B) and her son (C). Note the pathological basal electrocardiogram in her son, that presented the same mutation but was asymptomatic.

sivity in patients affected by the same mutation for Brugada Syndrome with a very wide spectrum of clinical manifestations. This means that it is essential to study direct relatives because penetrance usually is incomplete and they can show the clue for a correct diagnosis

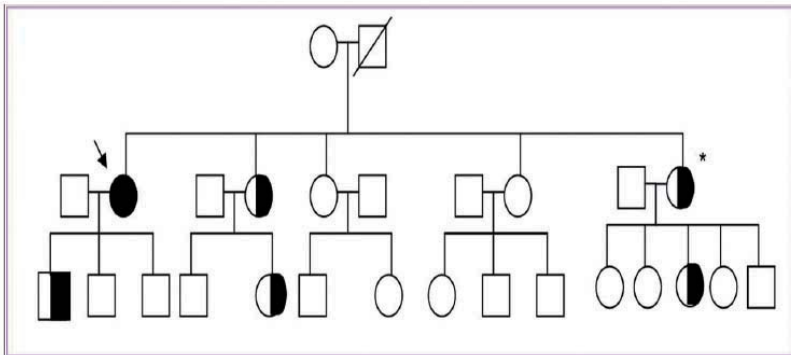


Figure 4: Pedigree: means the proband, and are relatives with the same mutation

References

1. Behr E, Wood DA, Wright M, Syrris P, Sheppard MN, Casey A, Davies MJ, McKenna W. Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet*. 2003;362:1457–1459.
2. Krahn AD, Gollob M, Yee R, Gula LJ, Skanes AC, Walker BD, Klein GJ. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of adrenaline and procainamide infusion. *Circulation*. 2005;112:2228–2234.
3. Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, Birnie DH, Simpson CS, Champagne J, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation*. 2009;120:278-85.
4. Roden DM. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Intern Med* 2006;259:59–69.

ANEXO IV

Novel *SCN5A* mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation due to subclinical Brugada syndrome

Juan Jiménez-Jáimez,
Miguel Álvarez-López,
Luis Tercedor-Sánchez, Pablo Santiago,
María Algarra, Rocio Peñas,
Francisca Valverde,
Rafael Melgares-Moreno

Cardiology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

Abstract

Idiopathic ventricular fibrillation can be caused by subclinical channelopathies such as Brugada syndrome. Our objective is to study the clinical behaviour of a new *SCN5A* mutation found in a woman with idiopathic ventricular fibrillation. A 53-year-old woman presented with multiple episodes of ventricular fibrillation, a structurally normal heart and normal baseline electrocardiogram. Genetic testing included *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2* and *KCNJ2* and identified a mutation in *SCN5A* (D1816fs/g98747-98748insT). We studied 15 immediate family members by means of electrocardiogram, echocardiogram, flecainide challenge test and genetic study. Eight subjects had the mutation. The flecainide challenge test was positive for Brugada syndrome in two subjects in the case group and none in the control group. The PR and QRS intervals on the baseline electrocardiogram were longer in the case group. The left atrial volume indexed to body surface was higher in the case group, likely due to the fact that two patients with the mutation had atrial fibrillation and none had it in the control group. The D1816fs/g98747-98748insT mutation in *SCN5A* may be associated with idiopathic ventricular fibrillation and Brugada syndrome with a broad phenotypic spectrum and incomplete penetrance. Genetic testing may be useful to identify the etiology of idiopathic ventricular fibrillation in patients with a negative thorough clinical evaluation.

Introduction

Ventricular fibrillation (VF) is a lethal arrhythmia that leads to a dramatic reduction in cardiac output and causes cardiac arrest and sudden death in several minutes if cardiopulmonary resuscitation manoeuvres are not

begun quickly. It usually occurs as a result of structural heart conditions such as ischaemic heart disease and cardiomyopathy.^{1,2} After ruling out structural abnormalities, the most prevalent cause of VF are genetic channelopathies, including long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome (BS) and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.^{3,5} If all diagnostic tests are negative, it is classified as idiopathic ventricular fibrillation (IVF). This condition is uncommon because diagnostic studies have an increasingly wide scope and provide a confirmed diagnosis in most cases.⁶

Subclinical channelopathies are one possible cause of IVF. Primary cardiac ion-channel diseases can be difficult to diagnose because of their limited phenotypic expression in surface electrocardiograms (ECG) and in drug challenge tests due to their incomplete genetic penetrance.⁷ In these cases, genetic studies are of growing importance.⁶ The increasing availability of genetic studies has led to a larger number of subclinical channelopathy diagnoses that initially present as IVF.⁸ However, genetic findings must be interpreted correctly, since most mutations detected have not been described and many are not clinically relevant.⁹

We conducted an exhaustive clinical study of a novel mutation in *SCN5A* (D1816fs/g98747-98748insT) in a Spanish family in which the index case presented as IVF. We have not found previous descriptions of this variant and there are no functional studies in a cellular context. Previous studies have involved mutations in nearby locations on the protein both in LQTS and also in BS,^{10,11} but there is no evidence of this mutation causing cardiac ion-channel diseases or IVF.

Diagnostic possibilities include LQTS type 3 or BS, or no pathogenic implications in the case of this mutation. Our main objective was to study the clinical pathogenicity and association of this mutation with possible subclinical channelopathy in the form of LQTS type 3 or BS.

Materials and Methods

Description of the index case

A 53-year-old woman without personal or family history of interest presented an episode of VF that was successfully treated. The initial study involved an ECG (Figure 1), echocardiogram, cardiovascular magnetic resonance and coronary angiography. The QTc interval calculated by Bazett's formula¹² was 412 milliseconds and there were no signs suggesting Brugada pattern in right precordial leads. The left ventricular ejection fraction was 60%, with no evidence of hypertrophy or chamber dilatation. Coronary arteries showed no significant atherosclerotic lesions.

Correspondence: Juan Jiménez Jáimez, Cardiology Department, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Avda. de las Fuerzas Armadas 2, 18014. Granada, Spain.
Tel. +34.667.242.021.
E-mail: jimenez-jaimez@gmail.com

Key words: idiopathic ventricular fibrillation, cardiac arrest, gene mutation, Brugada syndrome.

Contributions: all the authors participated actively in this work. JJJ collected all the data and wrote the manuscript.

Conflicts of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Received for publication: 26 October 2011.

Revision received: 29 November 2011.

Accepted for publication: 14 December 2011.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

© Copyright J. Jiménez-Jáimez et al., 2012
Licensee PAGEPress, Italy
Cardiogenetics 2012; 2:e1
doi:10.4081/cardiogenetics.2012.e1

A drug challenge test was performed with an initial bolus of 0.10 µg/kg epinephrine, followed by continuous infusion at 0.10 µg/kg/min. for 10 min., performing a twelve-lead ECG. The test was negative for LQTS according to current criteria.¹³ After a washout period, we performed a flecainide challenge test giving 2 mg/kg in a continuous infusion for 10 min,¹⁴ with a baseline ECG and further recordings every 2 min. This was negative for BS.

An electrophysiological study was performed in view of recurrent episodes of VF triggered by ventricular extrasystoles on the upper-left axis and short accompanying interval (Figure 2A), which was resistant to continuous infusion of beta blockers, amiodarone, procainamide and isoprenaline. Along the mid-apical septum of the right ventricle, Purkinje potentials were recorded at a level of the distal insertion of the right branch. These potentials preceded the onset of the QRS of the VF-inducing ventricular extrasystole by 45 ms, and the VF was self-limiting on one occasion. Radiofrequency applications eliminated the ventricular extrasystoles and VF episodes (Figure 2B). On day 7, a single-chamber automatic defibrillator was implanted, and during 18 months of follow-up, the device had not recorded any ventricular arrhythmias and the ECG remains normal.

In view of all these data, the final diagnosis was IVF. Considering how useful genetic testing has been in previous studies for LQTS and BS in patients with IVF,^{6,8} we performed genetic sequencing of the genes *KCNQ1*, *KCNH2*,

SCN5A, *KCNE1*, *KCNE2* and *KCNJ2*. Analysis included the entire genes. In *SCN5A* we identified a heterozygous insertion-type mutation (D1816fs/g98747-98748insT) in exon 28, affecting the C-terminal domain (Figure 3). There were no mutations in the rest of the genes.

Study population

16 subjects were included (15 immediate family members and the index case). The family tree is shown in Figure 4. A detailed history was taken on all subjects, with emphasis on past syncope. The study protocol for these subjects consisted of an ECG, echocardiography, flecainide challenge test and genetic study focused on the *SCN5A* mutation found in the proband. All subjects signed an informed consent in order to be included in the study. All the procedures performed were approved by the Ethics Committee at our hospital.

One of the immediate family members was excluded from the electrocardiographic, echocardiographic and drug challenge tests since she had Tetralogy of Fallot, having undergone surgery in childhood for this condition, which altered the baseline values of these studies.

Electrocardiogram

The surface ECGs at 25 and 50 mm/s were evaluated by two cardiologists specialising in electrophysiology. The PR, QRS and QTc intervals were analysed using Bazze't's formula.¹² The presence of type 1 Brugada pattern was defined as persistent ST segment elevation in right precordial leads with typical morphology. The presence of atrial fibrillation on ECG was confirmed with a second ECG three months later.

Measurement of echocardiographic parameters

Echocardiographic studies were performed with the Acuson X300 System (Siemens®). All

measurements were taken following the guidelines of the American Society of Echocardiography.¹⁵

The left ventricular ejection fraction was calculated using the modified Simpson method. The left atrial anteroposterior diameter was measured on the parasternal long axis at ventricular end-systole. The left atrial lateral diameter was measured in the apical four-chamber view, also at ventricular end-systole. The left atrial volume was calculated by biplane measurements in the apical two- and four-chamber views at ventricular end-systole. The

endocardial border of the left atrium was traced, excluding pulmonary veins and the left atrial appendage. The left atrial volume was later calculated using the modified Simpson method, indexing it to body surface area.

Data were obtained on peak velocity of early and late diastolic mitral filling (E and A waves respectively).

Flecainide challenge test

For the drug challenge test we administered flecainide intravenously peripherally, and performed continuous electrocardio-

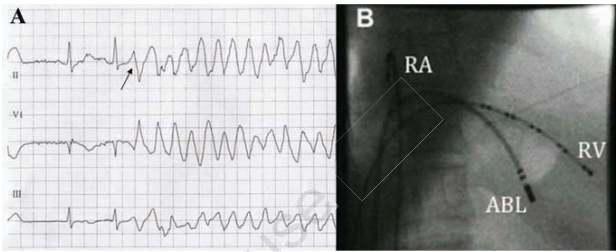


Figure 2. A) Electrocardiogram recording on admission, with ventricular fibrillation episode triggered by ventricular extrasystoles (arrow). B) Fluoroscopy-guided radiofrequency ablation of the ventricular focus triggering the VF episodes. RA, right atrium; RV, right ventricle; ABL, ablation catheter.

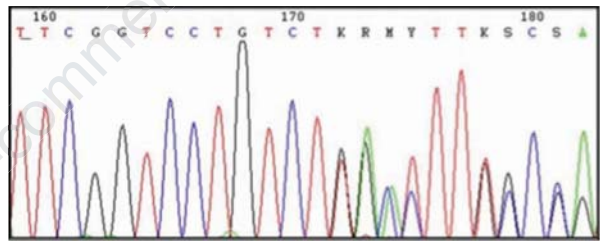


Figure 3. Heterozygous insertion mutation D1816fs/g98747-98748insT in exon 28 of *SCN5A*.

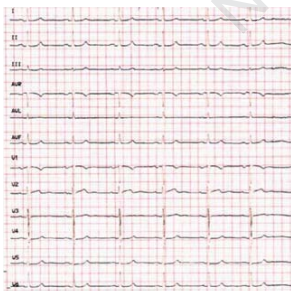


Figure 1. Baseline electrocardiogram of the index case showing sinus rhythm at 55 beats per min, normal PR, QRS and QTc intervals and absence of Brugada pattern findings.

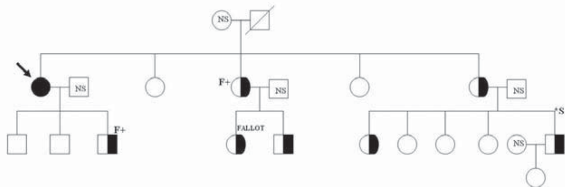


Figure 4. Family tree. The proband is shown as a black circle (arrow). Asymptomatic carriers of the mutation (cases) are shown as black circles and squares (circles=female; squares=male). Family members who did not have the mutation (controls) are shown as white circles and squares. "S" marks the case with syncope. F+ shows family members with a positive flecainide test. "Fallot" marks the case excluded from the electrocardiogram and imaging study because of Tetralogy of Fallot. NS, Not studied.

graphic monitoring. Two mg/kg flecainide was infused as a continuous infusion for 10 min., performing a baseline ECG and repeating a recording every 2 min. The right precordial leads were located in the usual position (fourth intercostal space) and also one intercostal space higher up. ST segment behaviour was monitored from V1-V3, looking for any signs of BS. The test was classified as positive, negative or indeterminate according to previously published standards. It was considered positive if an ST elevation >1 mm was observed in right precordial leads with Brugada pattern typical morphology.¹⁴

Genetic study

We took a blood sample for direct sequencing and DNA analysis of immediate family members in order to identify the presence of the *SCN5A* mutation that had been found in the index case (Figure 3).

Statistical analysis

The study subjects (n=16) were divided into two groups for statistical comparison. One group consisted of patients with the *SCN5A* mutation (case group, n=8) and the other group was composed of immediate family members without the *SCN5A* mutation (control group, n=8). A statistical comparison was performed in all cases using the aforementioned electrocardiographic, echocardiographic and drug challenge test data as dependent variables.

Nonparametric tests were used to calculate the *P*: the Mann Whitney U test to compare the mean and standard deviation and Fisher's exact test and the Chi-square test to compare proportions. A *P* value <0.05 was considered as statistically significant. To study concordance between the two observers in the analysis of electrocardiographic parameters we used a nonparametric correlation test (Spearman's Rho coefficient). All calculations were performed with SPSS 17.0 (Chicago, USA).

The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology.¹⁶

Results

Eight immediate family members had the mutation in *SCN5A* found in the index case and eight did not (Figure 4). There were no statistically significant differences between groups in terms of age or sex. One subject in the group with the *SCN5A* mutation had suffered an episode of VF (the proband) and another subject had had an exertional syncope episode of uncertain origin ten years before the study and is under follow up; the rest were

asymptomatic. All subjects in the control group were asymptomatic. The result of the statistical comparison between the two groups analysing electrocardiographic, echocardiographic and flecainide test parameters is shown in Table 1.

Electrocardiogram abnormalities

There was very high correlation between the two observers' measurements of the PR and QTc intervals and high correlation in their evaluation of the QRS interval (Table 2).

No patients in the case group or control group showed the Brugada pattern on their baseline ECG. The QTc interval was similar in both groups without statistically significant differences.

The value of the PR interval in milliseconds was significantly higher in subjects with the *SCN5A* mutation, compared with the controls (196.7±27.6 vs. 150±28.9 milliseconds, respectively). The QRS interval was also statistically significantly higher in the cases compared with the controls (112.8±16.6 vs 90.8±12.4

milliseconds, respectively). Atrial fibrillation was present in two cases and in none of the controls (Table 1).

Alterations in echocardiographic parameters

The left atrial volume indexed to body surface area was significantly higher in the *SCN5A* mutation cases compared with controls, although this included the two patients that had atrial fibrillation. The mean volume indexed to body surface area in the cases was 40.92±8.9 mL/m² and in controls it was 32.4±5.8 mL/m². The volume was bigger in the two subjects who presented atrial fibrillation compared with the others. These two cases had the *SCN5A* mutation and one of them was the index case that had had an episode of VF.

The left atrial anteroposterior diameter measured on the parasternal long axis was greater in the cases than in the controls. However, the difference in lateral diameter was not of statistical significance.

The other echocardiographic parameters did

Table 1. Statistical comparison between the two groups analysing electrocardiographic, echocardiographic and flecainide test parameters.

Variable	<i>SCN5A</i> + (D1816fs/g98747-98748insT) (n=8)	<i>SCN5A</i> - (n=8)	<i>P</i>
Clinical parameters			
Age (years)	38±15	31±19	NS
Men/Women	3/5	2/6	NS
Syncope	1 (12.5%)	0 (0%)	NS
VF	1 (12.5%)	0 (0%)	NS
ECG parameters			
Spontaneous Brugada pattern (%)	0 (0%)	0 (0%)	NS
PR interval (ms)	196.7±27	150±29	0.01
QRS interval (ms)	112.8±16	90.8±12	0.04
QTc interval (ms)	393±25	399±22	NS
Atrial fibrillation (%)	2 (25%)	0 (0%)	NS
Echocardiographic parameters			
LA anteroposterior diameter (mm)	41.6±3.8	32.3±4.7	<0.05
LA lateral diameter (mm)	43.1±6.5	39.8±5	NS
Peak E wave velocity (cm/s)	75±11	84±9	NS
Peak A wave velocity (cm/s)	50±20	61±19	NS
Left ventricular EF (%)	63%	61%	NS
Indexed LA volume (mL/m ²)	40.9±8.9	32.4±5.8	<0.05
Positive drug test for BS (%)	2 (25%)	0 (0%)	NS

LA, Left atrium; EF, Ejection fraction; BS, Brugada syndrome; VF, Ventricular fibrillation; NS, Not significant.

Table 2. Concordance between the two observers for electrocardiogram measurements expressed by Spearman's Rho correlation coefficient (0: no concordance, 1: full concordance).

	Observer 1	Observer 2	Spearman's Rho coefficient
PR interval (ms)	Cases	196.7±25	0.947
	Controls	155±22	
QRS interval (ms)	Cases	116.5±23	0.744
	Controls	94.2±14	
QTc interval (ms)	Cases	390.2±26	0.912
	Controls	403±20	

not differ between the groups, including left ventricular systolic function and diastolic transmitral flow velocities.

Flecainide drug test

Two cases with *SCN5A* mutation developed the typical Brugada pattern following intravenous infusion of flecainide. They were both asymptomatic and one of them had a QRS interval in the upper limit of the normal range in the baseline ECG (Figure 5). However, the index case, which showed a more aggressive clinical phenotype with VF, did not have any electrocardiographic changes following the drug challenge.

No subjects were positive for Brugada syndrome pattern in the control group. This result was not statistically significant (Table 1).

Flecainide test sensitivity and specificity for the identification of the *SCN5A* mutation carriers was 29% and 100% respectively.

Discussion

A diagnosis of IVF means that it has been impossible to diagnose the underlying aetiology in a case of recovery from cardiac arrest. Recently, genetic studies have been found to play a part in the diagnostic protocol, detecting masked channelopathies or mutations that generate major distortions in proteins in cardiac ion channels, and which are predisposing factors for VF. Cardiac sodium channel alpha subunit mutations (Na1.5V) are a known cause for Brugada syndrome, being present in around 20 % of patients. However, having a *SCN5A* mutation has been also related to Long QT syndrome, dilated cardiomyopathy and cardiac conduction system disease. So *SCN5A* mutations can lead to ventricular fibrillation and sudden death by different mechanisms, suggesting it plays an important role in cardiac electrical stability.

In this study we have provided clinical evidence of the causality of a previously undescribed mutation in *SCN5A* in BS, which presented as IVF. We identified the nucleotide insertion mutation D1816fs/g98747-98748insT, located in exon 28, in the C-terminal region of the alpha subunit of the sodium channel, in a Spanish family affected by sudden cardiac death of unknown aetiology. This variant was not present in a sample of 200 healthy control subjects.

We have not found previous descriptions of this variant and there are no studies that analyse the behaviour of this variant in a cellular context. However, there is consensus that the first portion of the C-terminal region, which has a helical structure, plays a determinant role in stabilising the channel inactivation process, thus contributing to cardiac repo-



Figure 5. Positive flecainide challenge test for Brugada syndrome in two asymptomatic family members. The baseline electrocardiogram in B also shows a slightly widened QRS.

larisation.¹⁷ Previous studies have analysed the functional consequences of mutations in nearby regions in the protein on the physiology of cardiac action potential. Thus, Tan *et al.*¹¹ described a family with carriers of the L1821fs mutation who developed different conduction disturbances, atrial fibrillation and ventricular tachycardia. Furthermore, Cormier *et al.*¹⁰ evaluated the functional changes associated with channel mutation at position 1885, finding a tenfold associated increase in the percentage of channels that fail in the inactivation process, leading to functional gain and therefore potential QT interval prolongation.

The insertion-type mutation that we have described here changes the reading frame in a large number of nucleotides, generating a truncated protein. There is a high probability that the patient's IVF is caused by this mutation because it changes the amino acid sequence in an important region in the *SCN5A* ion channel, with a probable impact on channel physiology and action potential. A functional study in a cellular model could be helpful to support the pathogenicity of the mutation and to evaluate its functional effect. This is not always feasible, although, as our work suggests, familial cosegregation data and clinical studies are the main way to evaluate the pathogenicity of a novel mutation. In this case we used a clinical study protocol to test the Spanish family carrying the mutation in the C-terminal region of *SCN5A*. Our aims in doing

so were to identify the possible association of this mutation with subclinical channelopathy and to analyse its clinical behaviour.

The diagnoses of LQTS and the BS are mainly based on clinical, electrocardiographic and drug challenge test findings.¹⁸ Some studies have associated BS with prolonged conduction intervals in surface ECGs, especially with reference to the QRS interval.¹⁹ Drug challenge tests with epinephrine and flecainide show low sensitivity but high specificity in detecting channelopathies, and so they provide a valuable diagnostic tool in the study of this novel mutation in *SCN5A*.⁷ Echocardiography might play a role in *SCN5A* mutation carriers presenting with atrial fibrillation, particularly focusing on left atrial size and volume measurements, which have been previously studied in BS.²⁰

Our results suggest an association between this mutation and baseline and post-flecainide electrocardiographic. Although some of these results are not statistically significant there is a clear tendency towards the association between this mutation and the presence of the Brugada pattern after the flecainide infusion. These findings suggest that the D1816fs/g98747-98748insT mutation located in exon 28 of *SCN5A* is pathogenic and is responsible for the development of BS. Likewise, our work shows a tendency to the association of this mutation with atrial fibrillation, as previously reported.²¹

Broad clinical spectrum and incomplete penetrance

A wide range of phenotypic manifestations has been reported for BS, from asymptomatic patients, to syncope and ventricular fibrillation. Similarly, the electrocardiographic manifestations of spontaneous and post-flecainide Brugada pattern are not present in all cases.²² Our study confirms these findings in BS caused by the reported *SCN5A* mutation, with only one patient among the eight cases that were studied presenting VF, another with syncope and six being asymptomatic. Interestingly, none of them showed spontaneous Brugada pattern, and only two of them showed it following an intravenous flecainide infusion. Surprisingly, the index case who had suffered an episode of ventricular fibrillation did not have any alternation in her baseline or post-flecainide ECG, although she did have atrial fibrillation and left atrial enlargement. This is consistent with previous studies that suggest a negative prognostic value of atrial fibrillation and left atrial volume in BS.²⁰

Conclusions

The heterozygous insertion mutation D1816fs/g98747-98748insT present in exon 28 of the C-terminal region of *SCN5A*, is likely associated with BS and IVE. It also seems to promote the development of atrial fibrillation. Our study describes a broad phenotypic spectrum with a majority of asymptomatic patients, as well as low clinical penetrance in view of the normal baseline and post-flecainide ECG found in most patients. This underlines the need for a complete family study with baseline ECG and flecainide challenge test in patients who have IVE.

References

- Connolly SJ, Hallstrom AP, Cappato R, et al. Meta-analysis of the implantable cardioverter defibrillator secondary prevention trials: AVID, CASH and CIDS studies: Antiarrhythmic vs Implantable Defibrillator study; Cardiac Arrest Study Hamburg; Canadian Implantable Defibrillator Study. *Eur Heart J* 2000;21:2071-8.
- Behr E, Wood DA, Wright M, et al. Cardio-logical assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet* 2003;362:1457-9.
- Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, et al. Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome: International Long-QT syndrome Registry Research Group. *N Engl J Med* 1998;339:960-5.
- Priori SG, Napolitano C, Tiso N, et al. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;16:196-200.
- Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, et al. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 2002;105:1342-7.
- Krahn AD, Healey JS, Chauhan V, et al. Systematic assessment of patients with unexplained cardiac arrest: Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry (CASPER). *Circulation* 2009;28;120:278-85
- Krahn AD, Gollob M, Yee R, et al. Diagnosis of unexplained cardiac arrest: role of adrenaline and procainamide infusion. *Circulation* 2005;112:2228-34.
- Jiménez-Jáimez J, Tercedor-Sánchez L, Alvarez-López M, et al. Estudio genético en el Síndrome de QT largo en nuestro medio. *Rev Esp Cardiol* 2011;64:71-4.
- Darbar D. Is it time to develop a "pathogenicity" score to distinguish long QT syndrome causing mutations from "background" genetic noise? *Heart Rhythm* 2009;6:1304-5.
- Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, et al. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;15;277:9233-41.
- Tan HL, Hofman N, van Langen IM, et al. Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation* 2005;112:207-13.
- Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;7:353-70.
- Shimizu W, Noda T, Takaki H, et al. Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:633-42.
- Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, et al. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000;101:510-5.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440-63.
- Shewan LG, Coats AJ. Ethics in the authorship and publishing of scientific articles. *Int J Cardiol* 2010;144:1-2.
- Dhar Malhotra J, Chen C, Rivolta I, et al. Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* 2001;103:1303-10.
- Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993;88:782-4.
- Junttila MJ, Brugada P, Hong K, et al. Differences in 12-lead electrocardiogram between symptomatic and asymptomatic Brugada syndrome patients. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008;19:380-3.
- Toh N, Morita H, Nagase S, et al. Atrial electrophysiological and structural remodeling in high-risk patients with Brugada syndrome: assessment with electrophysiology and echocardiography. *Heart Rhythm* 2010;7:218-24.
- Morita H, Kusano-Fukushima K, Nagase S, et al. Atrial fibrillation and atrial vulnerability in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1437-44.
- Govindan M, Batchvarov VN, Raju H, et al. Utility of high and standard right precordial leads during ajmaline testing for the diagnosis of Brugada syndrome. *Heart* 2010;96:1904-8.

