



Universidad de Murcia
Departamento de Medicina Interna

Estudio del gen del canal de sodio
(SCN5A) en una población de pacientes
con diagnóstico de síndrome de Brugada

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Murcia
Esperanza García-Molina Sáez
Murcia. Junio 2011

AGRADECIMIENTOS

A Isabel Tovar y Pedro Martínez quienes me brindaron la primera oportunidad en Servicio de Análisis Clínicos de la Arrixaca. Por haberme apoyado y aconsejado en mi trabajo.

A Juan Ramón Gimeno, Juanra, todo un líder mediático, que me ofreció la oportunidad de comenzar con un proyecto que ahora cumple su meta. Por ser tan ambicioso en su trabajo y un ejemplo de dedicación.

A Paco Ruiz-Espejo, Σ, por haber sido partícipe en mis inicios y por hacerme sentir bienvenida. Por su apoyo tanto en los buenos como en los malos momentos y sus consejos siempre cautos.

A Arcadio García-Alberola, quien me ha prestado su ayuda y experiencia confiando siempre en el trabajo realizado.

A Javier Lacunza (colega de Tesis), M^a José Oliva y María López, por tener siempre buenas palabras y estar siempre dispuestos a ayudar. Por las tardes pasadas trabajando en nuestra ONG.

A Patri, Susana, Ana C. y el recién llegado Iván, por escucharme y aconsejarme, por nuestros desayunos en los montaditos. A Ana en especial por compartir los duros momentos del final de la tesis. A todos los Resis que han pasado por el laboratorio y me han echado una mano.

A mis amigas, Marta, Fani, Bea, Viki, Sonia, Cristina, Fátima, Sandra...por todos los momentos vividos y los que nos quedan por compartir.

A María, por ser amiga, cuñada y compañera de trabajo, gracias por todo.

A mis suegros, porque ya forman parte de mi familia y nos ayudan en lo bueno y en lo malo.

A mis hermanos, Elena, Celia y José Luís, cada uno me aporta algo distinto y me ayudan siempre en todo lo que está en sus manos. Por haceros cargo de mi situación...por saber que estaréis ahí.

A mis padres, qué decir de mis padres...defenderían esta tesis doctoral por mí si pudieran. Gracias por ser siempre un apoyo y una guía en la vida tan importante para mí. Espero que os sepa agradecer todo lo que me habéis dado.

A José, mi marido, que es mi conciencia y alegría...mi luz de todos los días. Por el sacrificio que también te ha supuesto a ti el llegar a este punto en nuestras vidas. Gracias por acompañarme y por enseñarme el amor incondicional.

A mi niño pequeño, José, porque he tenido que prescindir de su dulce compañía para sacar adelante esta tesis. Porque me alegra el sólo pensar estar a tu lado y porque daría mi vida por ti.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su apoyo, amistad y cariño a lo largo de mi vida, algunas siguen conmigo y otras las llevo en el corazón...a todos y cada uno de vosotros, gracias.

A mis padres y hermanos

A mis dos Joses

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	V
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1. Canales de sodio dependientes de voltaje	3
<i>1.1. Estructura y funcionamiento</i>	3
<i>1.2. Potencial de acción cardíaco</i>	7
<i>1.3. Análisis biofísico</i>	10
2. Canalopatías	13
<i>2.1. Enfermedades hereditarias de los canales iónicos</i>	13
<i>2.2. Otros desórdenes arritmogénicos heredados y de la conducción cardíaca</i>	14
<i>2.3. Fisiopatología de la disfunción del canal de sodio cardíaco</i>	17
3. Síndrome de Brugada	19
<i>3.1. Diagnóstico</i>	19
<i>3.2. Diferencias de género en el Síndrome de Brugada. Factores moduladores y dependencia con la temperatura</i>	21
<i>3.3. Herramientas diagnósticas</i>	25
<i>3.4. Pronóstico de los pacientes de Síndrome de Brugada y tratamiento</i>	26
4. Genética molecular en el Síndrome de Brugada	26
<i>4.1. Papel de la genética en la práctica clínica</i>	26

<i>4.2. Canal de sodio cardíaco, gen SCN5A y otros genes relacionados</i>	29
<i>4.3. Relación genotipo-fenotipo</i>	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
CAPÍTULO II	
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Pacientes y controles sanos	43
2. Extracción de ADN	44
3. Amplificación y purificación del ADN	46
4. Cribado de muestras mediante dHPLC	50
5. Secuenciación automática directa	53
6. Purificación de la reacción de secuenciación	54
7. Alteraciones en la secuencia	55
8. Estudio de grandes reordenamientos en el gen SCN5A	56
9. Estudio de microsatélites	58
10. Análisis bioinformático de las variantes nuevas. Estudios in silico	61
<i>10.1. Identificación de posiciones conservadas</i>	61
<i>10.2. Propiedades de los aminoácidos</i>	61
<i>10.3. Estudio de variantes de cambio de sentido</i>	62
<i>10.4. Estudio de variantes intrónicas</i>	62
11. Análisis estadísticos	62

CAPÍTULO III

RESULTADOS	63
1. Características clínicas de los pacientes	65
2. Secuenciación directa del gen SCN5A	68
3. Estudio bioinformática	72
3.1. Alineamiento entre especies e isoformas	72
3.2. Mutaciones de cambio de sentido	76
3.2.1. Propiedades de los aminoácidos	76
3.2.2. Programas de predicción de patogenicidad	77
3.3. Mutación de parada prematura	78
3.4. Variantes intrónicas	78
3.5. Polimorfismos hallados. Frecuencia alélica	82
4. Técnica de dHPLC. Método de cribado	85
4.1. Comparación de la técnica de dHPLC vs secuenciación	87
5. Grandes reordenamientos génicos del gen SCN5A	88
6. Relación genotipo-fenotipo	88
6.1. Comparativa clínica, factores moduladores e historia familiar de portadores frente a no portadores	88
6.2. Estudio familiar	91
6.3. Estudio de microsatélites en 3 familias portadoras de la mutación G1743R	104
6.4. Estudio del polimorfismo frecuente H558R	106
6.5. Predicción de patogenicidad de las nuevas variantes encontradas	108
6.6. Sensibilidad y especificidad del test farmacológico	109

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN	111
1. Características clínicas de los pacientes	113
<i>1.1. Características clínicas de los pacientes dependiendo del sexo y edad</i>	115
2. Secuenciación directa del gen SCN5A	116
3. Estudios in silico	118
4. Método de cribado. Técnica de dHPLC	118
5. Grandes reordenamientos génicos del gen SCN5A	119
6. Relación genotipo-fenotipo	119
CONCLUSIONES	127
ANEXOS	131
ANEXO I. Consentimiento informado y hoja informativa	133
ANEXO II. Diagrama de flujo de la inclusión de pacientes en nuestra cohorte	134
ANEXO III. Diagrama de flujo del procesamiento de muestras	135
ANEXO IV. Sondas utilizadas para la técnica de MLPA	136
ANEXO V. Árboles genealógicos de las familias portadoras de mutación	137
REFERENCIAS	147

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
bp	Pares de bases
C-t	Extremo carboxilo terminal
ChIPS	Proteínas que interactúan con el canal de sodio
DCC	Defecto de la Conducción Cardíaca
dHPLC	Cromatografía Líquida desnaturalizante de Alto Rendimiento
ECG	Electrocardiograma
EEP	Estimulación eléctrica Programada
EEF	Estudio electrofisiológico
FV	Fibrilación Ventricular
FVI	Fibrilación Ventricular Idiomática
HERG	Human Ether- α -go-go Related Gene
MAVD	Miocardiopatía Arritmogénica del Ventrículo Derecho
MLPA	Multiplex Ligation Probe Amplification
MS	Muerte súbita
Na _v Chs	Canales de sodio dependientes de voltaje
N-t	Extremo amino terminal
PA	Potencial de acción
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RE	Retículo endoplásmico
SB	Síndrome de Brugada
SMSI	Síndrome de Muerte Súbita Inexplicable
SQTL	Síndrome de QT Largo

TV	Taquicardia Ventricular
TVP	Taquicardia Ventricular Polimórfica
VD	Ventrículo Derecho

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de gating del canal de sodio	4
Figura 2. Estructura de las subunidades de canales iónicos dependientes de voltaje	5
Figura 3. Estructura de la hélice S4	6
Figura 4. Árbol filogenético de las isoformas de los canales de sodio	7
Figura 5. Canales iónicos y potencial de acción cardíaco	9
Figura 6. Electrocardiograma	9
Figura 7. Desórdenes arritmogénicos y genes causales	16
Figura 8. Potencial de acción y corrientes iónicas participantes	18
Figura 9. ECG caso índice H568	20
Figura 10. Gen SCN5A	29
Figura 11. Interacciones proteína-proteína con el conjunto de canales iónicos	35
Figura 12. Sistema de extracción Maxwell	45
Figura 13. Medida de concentración y pureza del ADN	46
Figura 14. Purificación Exosap-It	50
Figura 15. dHPLC	50
Figura 16. Columna medio hidrofóbico	51
Figura 17. Renaturalización lenta	52
Figura 18. Analizador ABI3130	53
Figura 19. Termociclador Veriti y MLPA	58
Figura 20. Localización de marcadores microsatélites	60
Figura 21. Análisis del microsatélite D3S3527	61
Figura 22. Pacientes con ECG tipo I	66
Figura 23. Localización de mutaciones	69
Figura 24. Alineamiento entre especies	72
Figura 25. Alineamiento entre isoformas	74

Figura 26. Resultados ESEFinder	79
Figura 27. Resultados Netgene	80
Figura 28. Resultados NNS	81
Figura 29. Perfiles de elución dHPLC	86
Figura 30. Representación gráfica H390 por el MLPA	88
Figura 31. Árbol genealógico y electroferograma H568	91
Figura 32. Árbol genealógico y electroferograma H95	92
Figura 33. Árbol genealógico y electroferograma H578	94
Figura 34. Árbol genealógico y electroferograma H596	96
Figura 35. Árbol genealógico y electroferograma H97	97
Figura 36. Árbol genealógico y electroferograma H684	99
Figura 37. Árbol genealógico y electroferograma H598	100
Figura 38. Árbol genealógico y electroferograma H72	101
Figura 39. Árbol genealógico y electroferograma H222	103
Figura 40. Segregación de los microsatélites	105
Figura 41. Frecuencia alélica del polimorfismo común H558R	107

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales canalopatías	13
Tabla 2. Genes asociados al síndrome de Brugada	31
Tabla 3. Corrientes iónicas del potencial de acción cardíaco	34
Tabla 4. Cebadores	48
Tabla 5. Reacción de PCR	49
Tabla 6. Reacción de secuenciación	54
Tabla 7. Marcadores microsatélites	59
Tabla 8. PCR de microsatélites	59
Tabla 9. Características clínicas de los pacientes	66
Tabla 10. Comparativa clínica entre hombres y mujeres	68
Tabla 11. Mutaciones detectadas	71
Tabla 12. Características de los portadores de mutación	71
Tabla 13. Grado de conservación entre especies e isoformas	75
Tabla 14. Propiedades de los aminoácidos	76
Tabla 15. Predicción de patogenicidad Pmut	77
Tabla 16. Predicción de patogenicidad Polyphen2	77
Tabla 17. Variantes intrónicas	78
Tabla 18. Polimorfismos hallados	82
Tabla 19. Frecuencia alélica de los polimorfismos hallados	84
Tabla 20. Temperatura óptima de elución para el dHPLC	85
Tabla 21. Sensibilidad especificidad dHPLC-Secuenciación	87
Tabla 22. Características clínicas portadores vs no portadores	90
Tabla 23. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H568	91
Tabla 24. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H95	93
Tabla 25. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H578	95

Tabla 26. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H596	97
Tabla 27. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H97	98
Tabla 28. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H684	99
Tabla 29. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H598	100
Tabla 30. Estudio genotipo-fenotipo de la familia 72	102
Tabla 31. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H222	103
Tabla 32. Detalle estudio de tres familias portadoras G1743R	104
Tabla 33. Estudio del polimorfismo frecuente H558R	106
Tabla 34. Predicción de patogenicidad de mutaciones nuevas	108
Tabla 35. Test de provocación en el estudio familiar	109

Introducción

1. CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

1.1 Estructura y funcionamiento

Los canales iónicos son las enzimas que fisiológicamente difieren más, puesto que no llevan a cabo ninguna transformación bioquímica. Pertenecen a una gran familia de más de 400 proteínas, representando del 1% al 2% de nuestra dotación génica (Gargus 2003). Tienen dos propiedades fundamentales, conductancia y el proceso de transición entre estados conformacionales, denominado “gating”. La conductancia es el mecanismo mediante el que un ión atraviesa de manera selectiva la membrana celular (Alfonso Vega 2001; Grant 2001; Gargus 2003). Los canales iónicos tienen al menos tres estados conformacionales: cerrado, activo e inactivo.

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_vCh_s) juegan un papel crucial en la propagación del potencial de acción (PA) en células excitables, como en los miocitos, neuronas y células endocrinas (Catterall 2000; Alfonso Vega 2001; George, Jr. 2005). Estos canales son importantes dianas para anestésicos locales, anticonvulsivos y también de agentes antiarrítmicos (George, Jr. 2005).

En los últimos años se ha avanzado en gran medida en el conocimiento de la estructura y función de los canales iónicos y el desarrollo de arritmias cardíacas y muerte súbita (MS) debido al estudio de las mutaciones en los genes implicados (Rudy & Silva 2006).

Los Na_vCh_s son proteínas integrales de membrana que pertenecen a una superfamilia de canales iónicos que se accionan de forma dependiente al potencial de membrana (Figura 1) (George, Jr. 2005). Estos canales forman un complejo multimérico compuesto por una subunidad grande α , de aproximadamente 260 KDa, por cuatro pequeñas subunidades β (β_1 – β_4) de 33-36 KDa (Catterall 2000; George, Jr. 2005), pertenecientes a la superfamilia de IgG (Isom LL. 2001) y que contribuyen a la formación del canal y algunas proteínas reguladoras (Nerbonne & Kass 2005).

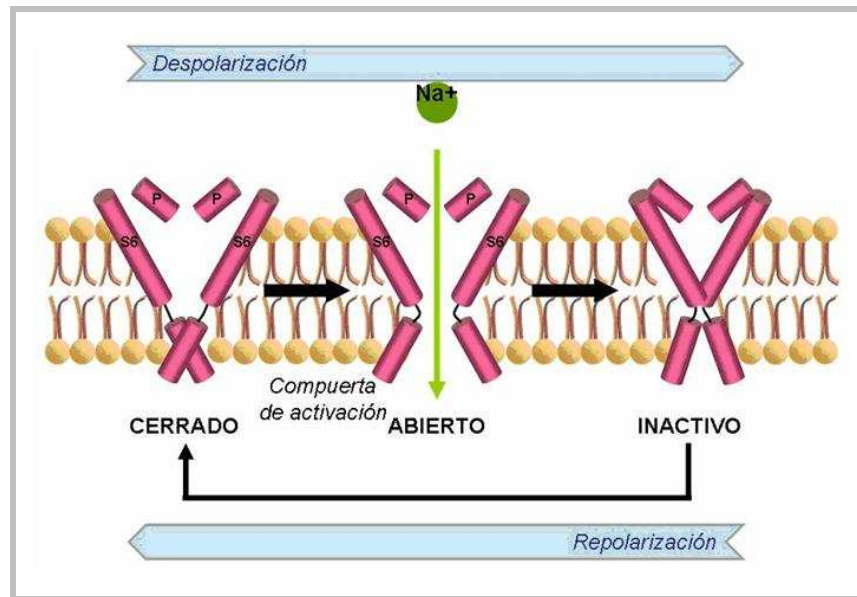


Figura 1. Representación del mecanismo de gating del canal de sodio. Se muestra la hélice S6 formadora del poro de cada uno de los estados conformacionales abierto, cerrado e inactivo (imágenes cedidas Dra. Carmen Valenzuela).

El poro está constituido enteramente por la subunidad α , que confiere las propiedades de selectividad iónica, apertura e inactivación rápida. Las subunidades auxiliares β juegan un papel fundamental en la cinética del canal y en el “gating” dependiente de voltaje. Las subunidades auxiliares son muy parecidas en estructura, tienen un dominio extracelular glicosilado y un único segmento transmembrana (Catterall 2000) (Figura 2).

La estructura tridimensional completa del canal de sodio no está disponible actualmente pero sí se tiene información estructural acerca del sitio de inactivación (“inactivation gate”), localizado en el “loop” de unión entre los dominios III-IV. El análisis de Resonancia Magnética Nuclear predice que el motivo IMF (Ile-Phe-Met) interacciona y bloquea el poro (Yu & Catterall 2003).

Nueve genes codifican las distintas isoformas de la subunidad α ($\text{Na}_{v1.1}$ - $\text{Na}_{v1.9}$) cada uno de los cuales se expresará dependiendo del tejido del que hablemos. El gen del canal de sodio se denomina como SCN_A, donde S significa sodio, CN del inglés “channel” y A la subunidad α , siendo SCN1A el que se expresa en cerebro, SCN4A en músculo esquelético, SCN5A en corazón, etc (Yu & Catterall 2003; George, Jr. 2005).

La subunidad α está dispuesta en cuatro dominios homólogos (DI-DIV), con seis segmentos transmembrana (S1-S6) cada uno. En cada uno de los dominios la hélice S4 funciona como sensor de voltaje, que contiene cada tres posiciones un aminoácido cargado positivamente (Yu & Catterall 2003; George, Jr. 2005)(Figura 2 y 3).

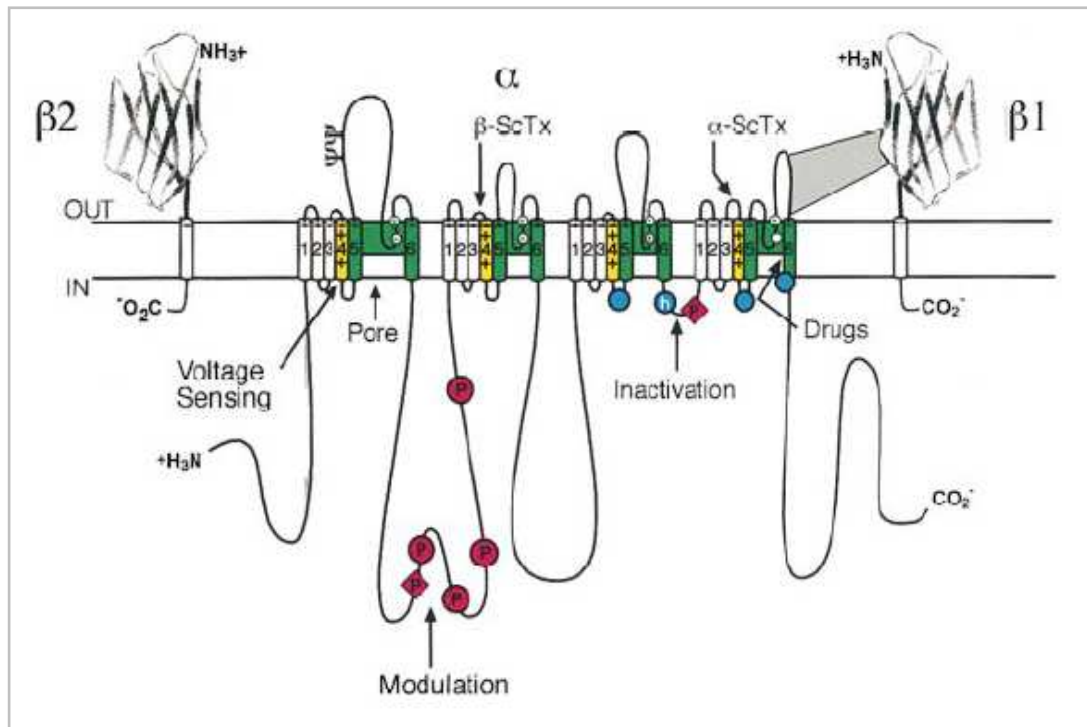


Figura 2. La estructura primaria de las subunidades de canales iónicos voltaje-dependientes. Los cilindros representan segmentos en la estructura de hélice α . Las líneas en negrita representan las cadenas polipeptídicas de cada subunidad con una longitud proporcional al canal de sodio presente en cerebro. Los dominios extracelulares de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ se asemejan a estructuras tipo inmunoglobulina. Los ψ representan posibles sitios de amino-glicosilación; P en círculos/rombos rojos son sitios de fosforilación por PKA (círculos) y PKC (rombos); en verde se representan los segmentos formadores de poro. Con círculos blancos los locus EEDD (externo) y DEKA (interno) que forman el filtro selectivo del canal y el sitio de unión a tetrodotoxina. En amarillo se representan los segmentos S4 que funcionan como sensores de voltaje. H en los círculos azules representa partículas de inactivación en el loop de inactivación, los círculos azules son sitios implicados en la formación del receptor para la compuerta de inactivación. Por último se detallan distintos sitios de unión a toxinas (Yu & Catterall 2003).

Tras la despolarización, el movimiento de las hélices S4 y su consecuente rotación provoca un cambio conformacional que abre el poro.

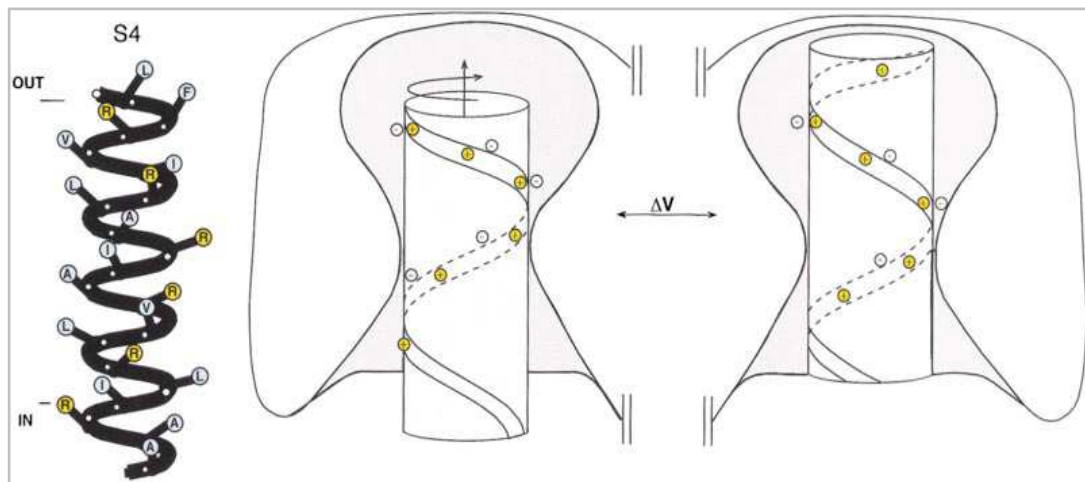


Figura 3. Estructura de la hélice S4, se destaca cada tres posiciones un aminoácido cargado positivamente Arginina (R)-Lisina (L). Catterall 2000

Los Na_vCH_s son sensibles a las neurotoxinas tetrodotoxina y saxitoxina, dicha propiedad fue utilizada para demostrar la localización del sitio receptor y el filtro selectivo. El “loop” que une las hélices S5–S6 forma el filtro selectivo iónico (Locus DEKA y EEDD). El motivo EEDD altamente conservado en los canales de sodio activados por voltaje en los mamíferos, se ha sugerido que regula la inactivación lenta de los Na_vCH_s (Catterall 2000; Xiong *et al.* 2006).

Los canales de sodio fueron los primeros miembros de la superfamilia de los canales iónicos en ser descubiertos (Yu & Catterall 2003). La superfamilia incluye también los canales de potasio, de calcio, canales-Trp y canales activados por nucleótidos cíclicos.

Las propiedades biofísicas, farmacológicas, la organización génica y los sitios de reconocimiento de “splicing” en los canales de sodio de invertebrados son muy similares a las de los mamíferos, con lo que se deduce que el canal de sodio inicial fue establecido antes de que en la evolución se separasen los vertebrados e invertebrados (Yu & Catterall 2003).

Las nueve isoformas existentes de los Na_vCH_s se agrupan en dos “clusters”, por un lado $\text{Na}_v 1.1$, $\text{Na}_v 1.2$, $\text{Na}_v 1.3$, $\text{Na}_v 1.7$ (localizados en el cromosoma 2) y por otro $\text{Na}_v 1.5$, $\text{Na}_v 1.8$ y $\text{Na}_v 1.9$ (localizados en el cromosoma 3p21-24) (Figura 4). Entre ambos grupos existe una similitud del 75% en la secuencia de aminoácidos (aa), pero tienen cambios

que les confieren distinta resistencia a la tetrodotoxina (Yu & Catterall 2003). El resto de canales, $Na_{v1.6}$ y $Na_{v1.4}$, se localizan en los cromosomas 15 y 11 respectivamente.

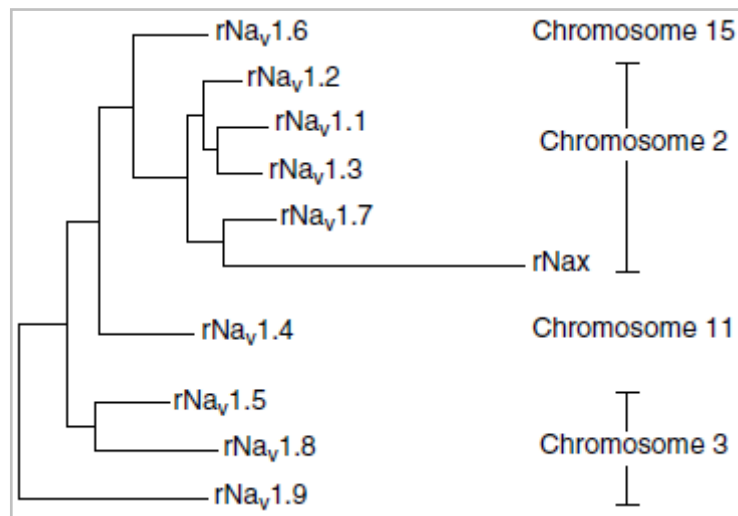


Figura 4. Árbol filogenético de las nueve isoformas de los Na_vCh (Yu & Catterall 2003).

1.2 Potencial de acción cardíaco

Como se menciona con anterioridad, los canales iónicos poseen dos características principales, el mecanismo de “gating” y la selectividad iónica. Sin embargo, el paso iónico a través de la membrana por sí solo no genera ninguna consecuencia fisiológica, las corrientes transmembrana y como consecuencia la variación del potencial de membrana sí juegan un papel importante en la transmisión de señales en las rutas de señalización bioquímica (Gargus 2003). Los canales iónicos interactúan durante la generación del PA con los cambios en las concentraciones iónicas y cambios en el voltaje transmembrana.

La disfunción de los canales dependientes de voltaje que toman parte en la excitación del tejido cardíaco provoca una alteración de los potenciales de acción que queda patente en el trazado electrocardiográfico, como en el síndrome de Brugada (SB) o síndrome del QT largo (SQTL) (Gargus 2003; Amirali & Massumi 2007).

En el músculo cardíaco el PA genera una contracción muscular que se conduce célula a célula, creándose una onda de excitación que es la que activa y sincroniza el bombeo de sangre en el corazón. En el músculo cardíaco, a diferencia del PA en el músculo esquelético y sistema nervioso, se caracteriza por una fase de plató duradera y

una fase de repolarización que previene la creación de arritmias y regula la contracción (Rudy & Silva 2006).

La duración del PA cardíaco es de 250 ms y se compone de 5 fases (Figura 5). La **fase 0** o fase de despolarización rápida, donde se produce la apertura de los canales rápidos de sodio (I_{Na}) debida a un estímulo externo, provoca la entrada masiva de iones sodio a los miocitos. El umbral de voltaje de los canales de sodio es de aproximadamente -55mV . La activación es dependiente de voltaje, al igual que la inactivación. La activación de los canales de sodio viene controlada por la apertura de dos puertas $-m$ y $-h$, descritas por Hodgking y Huxley en 1952 (Hodking & Huxley 1952). La puerta $-m$ responde a una activación rápida y está abierta durante el proceso de despolarización, la puerta $-h$ funciona al contrario, está abierta durante la hiperpolarización y responde a una inactivación lenta (Grant 2001). Ambas deben permanecer abiertas para permitir la entrada de iones Na^+ a la célula. El mismo estímulo que provoca la activación es el que provoca la inactivación. El paso conformacional del canal de activo a inactivo no durará más de 2 ms. Durante la **fase 1** se cierran dichos canales, una corriente transitoria de K^+ , I_{to} , es responsable de la repolarización inicial. Ésta tiene dos componentes, I_{to1} que es dependiente de voltaje y se activa y desactiva rápidamente e I_{to2} que depende de la concentración de Ca^{+2} intracelular (Nerbonne & Kass 2005). Las fases 0 y 1 corresponden a las ondas R y S del electrocardiograma (ECG), mostrado en Figura 6. La **fase 2** o fase de plató corresponde al segmento ST del ECG y es el resultado del balance entre la corriente de entrada de iones Ca^{+2} y Na^+ , canales de calcio tipo L (I_{Ca}) y canales de sodio lentos dependientes de voltaje, y la corriente de salida de iones K^+ . La **fase 3** o fase de repolarización corresponde a la onda T electrocardiográfica, que coincide con la salida de iones K^+ (Amirali & Massumi 2007). La **fase 4** corresponde a la fase o período refractario en el que los miocitos se encuentran en reposo, no les llega ningún estímulo.

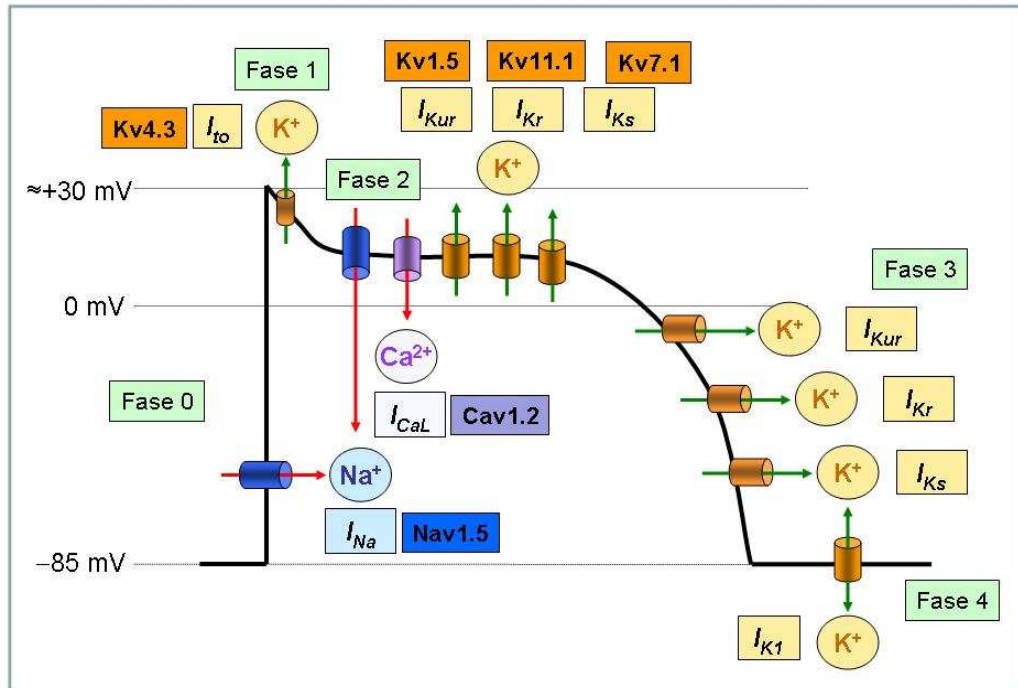


Figura 5. Canales iónicos y el potencial de acción cardíaco. Representa los canales iónicos más importantes que están implicados en cada fase del potencial de acción. Imágenes cedidas por la Dra. Carmen Valenzuela.

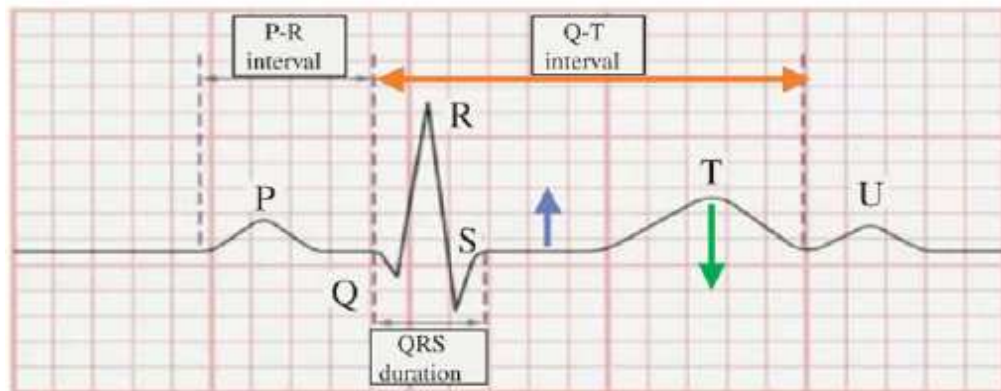


Figura 6. Representación del ECG (Rudy & Silva 2006).

1.3 Análisis biofísico

En los últimos años ha habido un gran avance en cuanto al conocimiento de la estructura de las membranas celulares y las funciones de los canales iónicos. Esto ha sido posible gracias a técnicas como “patch-clamp” (pinzamiento zonal), el uso de neurotoxinas selectivas, la secuenciación y el clonaje de genes (Celesia 2001).

La técnica de “patch-clamp” se rige por la ley de Ohm ($I=E/R$), mide las variaciones de las corrientes iónicas de un canal único o de todos los canales existentes en una célula cuando se le aplica a ésta un voltaje determinado.

Cuando se detecta una alteración en la secuencia del canal no podemos saber a priori la repercusión que tendrá, así esta técnica se utiliza para demostrar si ejerce algún efecto dicha mutación sobre la amplitud de la corriente o el sistema de apertura del canal. Una vez obtenido el gen mutado, en este caso el SCN5A, mediante mutagénesis dirigida se transfiere el ADNc (ácido desoxirribonucleico copia) del gen a células HEK293 u a ovocitos de *Xenopus laevis* (células que se utilizan normalmente en estos experimentos porque no poseen prácticamente canales de sodio intrínsecos u otros canales iónicos sarcolémicos). Tras un período de incubación se realiza el análisis biofísico (Antzelevitch *et al.* 2005b).

En los estudios de “patch-clamp” se observa que los canales mutados en SB conducen un menor flujo de Na^+ . Esto puede ser debido a varios mecanismos biofísicos y los podemos subdividir en dos grupos; los que implican una reducción de densidad de corriente y los que causan cambios en el sistema de apertura (Antzelevitch *et al.* 2005b). Dentro de la primera clasificación, la reducción de corriente es debida a menos canales funcionales de Na^+ o a corrientes más pequeñas, los mecanismos que explican la **reducción de corriente** se resumirían en tres (Veldkamp *et al.* 2000; Viswanathan *et al.* 2001):

- a. **Truncado de la proteína del canal.** Cuando se detecta una mutación de codón de parada prematura ésta provoca una disminución en la corriente de Na^+ . Cabría pensar que una mutación cerca del extremo N-terminal (N-t) afectará con mayor gravedad que otra que se encuentre en el extremo carboxilo-terminal (C-t) ya que casi todas las hélices transmembrana estarían intactas en este caso. Sin embargo ensayos clínicos demuestran lo contrario (Catterall 2000; Herfst *et al.* 2003; Bezzina *et al.* 2003; Antzelevitch *et al.* 2005b). Esto puede ser debido a

que cuando la alteración se encuentra al comienzo de la proteína, ésta puede que tenga unos niveles de transcripción menores y por lo tanto un fenotipo menos acentuado.

- b. Mutación en el poro conductor del ión.** Una alteración que se encuentre en el poro conductor es fácilmente comprensible que pueda afectar al flujo iónico.
- c. Alteraciones del tránsito.** Algunas mutaciones provocan un mal plegamiento de la proteína, quedándose ésta almacenada en el retículo endoplásmico (RE) (Baroudi *et al.* 2002; Herfst *et al.* 2003). Cuando ocurren errores en el pliegue de una proteína existe un mecanismo de control de calidad en el RE que la reconoce y degrada. Existen algunos estudios que han conseguido “rescatar” estas proteínas utilizando sustratos y bloqueantes que se unen a ellas y las estabilizan (Loo & Clarke 1997; Zhou *et al.* 1999; Morello *et al.* 2000; Ficker *et al.* 2002; Herfst *et al.* 2003). Se demostró para los canales de potasio mutados “Ether-â-go-go Related Gene” (HERG) que fueron rescatados por el bloqueante HERG 4031, astemizol y cisaprida. Igualmente los canales de sodio con la mutación M1766L, que está relacionada con el síndrome QTL3, fueron rescatados con mexiletina, fármaco bloqueante de los canales de Na⁺ (Valdivia *et al.* 2002; Herfst *et al.* 2003; Valdivia *et al.* 2004).

En cuanto a las alteraciones que producen **cambios en el sistema de apertura** desarrollan una menor corriente de Na⁺ durante el potencial de acción cardíaco debido a cambios que afectan al tiempo o voltaje de activación o desactivación del canal:

- a. Activación dependiente del voltaje.** Este tipo de mutaciones provocaría una activación del canal a voltajes más despolarizantes que los canales no mutados, con lo que cualquier despolarización implica una activación menor del canal y una corriente de Na⁺ neta menor (Tan *et al.* 2001).
- b. Desactivación dependiente del voltaje.** Las mutaciones que se rigen por este mecanismo biofísico se desactivan a voltajes más hiperdespolarizantes, con lo que a potenciales de reposo, en membrana habrían más canales mutados desactivados y menos disponibles para activarse, con lo que la corriente neta de Na⁺ sería menor (Veldkamp *et al.* 2000).
- c. Desactivación en estado cerrado.** Los canales mutados pasarían directamente de un estado cerrado desactivado a un estado inactivo. Este proceso de

desactivación puede explicar la mayor sensibilidad al bloqueo de los antiarrítmicos de clase I, estos fármacos pueden poner de manifiesto elevaciones del segmento ST tipo Brugada en pacientes con mutaciones en SCN5A asociadas a SQTl. Los canales mutados presentarían al mismo tiempo una corriente de sodio que no se desactiva (prolongación del QT) y una mayor desactivación del estado cerrado (Kambouris *et al.* 2000; Antzelevitch 2005).

- d. Desactivación rápida.** Los canales mutados sufren una rápida transición al estado desactivado (Tan *et al.* 2001; Antzelevitch *et al.* 2005b).
- e. Desactivación intermedia.** La desactivación intermedia es un proceso de activación y desactivación lento. Este tipo de mecanismo ha sido relacionado con el bloqueo de los canales de sodio por los antiarrítmicos tipo I (Ong *et al.* 2000). Este mecanismo fue descrito por el grupo de Veldkamp *et al.*, que identificó en pacientes portadores de la mutación 1795insD un mecanismo dual, prolongando el QT (SQTl) a frecuencias cardíacas lentas y una elevación del segmento ST derivada del ejercicio (SB) (Veldkamp *et al.* 2000).

Los experimentos electrofisiológicos son útiles en el caso de:

- a.** Registro de corrientes iónicas *in vivo* e *in vitro*.
- b.** Caracterización del mecanismo de acción de fármacos.
- c.** Determinación de efectos adversos de fármacos.
- d.** Determinación de los sitios de unión de fármacos: diseño de nuevos fármacos.
- e.** Estudios estructura-función de canales iónicos.

En conclusión, los estudios electrofisiológicos resultan esenciales para el estudio de nuevas mutaciones encontradas y para la mejor comprensión del comportamiento a nivel fisiológico de cualquier canalopatía.

2. CANALOPATÍAS

2.1. Enfermedades hereditarias de los canales iónicos

Las enfermedades hereditarias de los canales iónicos, canalopatías, representan un conjunto de patologías hereditarias relativamente novedosas. El descubrimiento en 1989 del gen causante de la fibrosis quística, que codifica una proteína llamada “reguladora de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística” (CFTR), despertó un gran interés clínico y científico hacia estas enfermedades, centrándose los estudios en el descubrimiento de los distintos componentes del PA en los tejidos excitables (Gargus 2003).

Las canalopatías afectan a multitud de tejidos pero mayoritariamente al músculo esquelético y sistema nervioso central. En la siguiente tabla vienen indicadas algunas patologías causadas por alteraciones en distintos canales iónicos (Tabla 1).

Tabla 1. Principales canalopatías asociadas a sus correspondientes canales iónicos

<i>Tipo de canal</i>	<i>Alteraciones</i>
Na ⁺	Parálisis periódica hipercaliémica (SCN4A), paramiotonía congénita (SCN4A), síndrome QT largo (SCN5A), SB (SCN5A), síndrome de muerte súbita del lactante (SCN5A), epilepsia (SCN1A, SCN9A), etc.
Ca ²⁺	Síndrome de Timothy (CACNA1C), diabetes, distrofia, aterosclerosis (CACNA1C), hipertensión, migraña (CACNA1A), etc.
Cl ⁻	Miotonía (CLCN1)
K ⁺	Ataxia (KCNA1), SQTL (KCNQ1, KCNH2), sordera, diabetes (KCNJ11), epilepsia (KCNQ2).

Una de las características clínicas de las canalopatías es la gran heterogeneidad en su presentación clínica. A la hora de evaluar una canalopatía debemos tener en cuenta varias pautas (Celesia 2001):

1. *La selectividad de un canal* viene definida por su localización. Para un mismo canal, dependiendo de su localización (corazón, músculo, cerebro, etc.) estará codificado por un gen distinto y variará tanto estructural como funcionalmente.
2. *Interdependencia entre canales*, para la correcta excitación membranal se necesita la actuación de los distintos canales iónicos.

3. *Heterogeneidad genética*, algunas funciones pueden estar reguladas por distintos genes, así diferentes mutaciones pueden provocar el mismo fenotipo.
4. *Heterogeneidad del fenotipo*, mutaciones parecidas pueden causar distintos fenotipos. Cada zona del canal realiza diferentes funciones (selectividad iónica, inactivación, etc.), por lo que la localización de la mutación determinará defecto fisiológico.

Se describen tres mecanismos mediante los que se explica el mal funcionamiento del canal:

- Ganancia de función.
- Pérdida de función.
- Dominio del efecto negativo. Las proteínas que están alteradas determinan el funcionamiento de las restantes.

2.2. Desórdenes arritmogénicos heredados y de la conducción cardíaca

Enfermedades con el mismo origen genético como SB, Fibrilación Ventricular Idiopática (FVI) inducida por estimulación vagal y defecto de la conducción cardíaca (DCC) presentan una expresión fenotípica distinta, aunque tanto el SB como DCC poseen algunas áreas de superposición, se ha dado el caso de familias con una mutación en SCN5A en las que algunos miembros presentan fenotipo de Brugada y otros de DCC (Kyndt *et al.* 2001). Además en pacientes con SB la principal diferencia entre pacientes con mutación en el canal de sodio es la presencia de alteración en la conducción (Smits *et al.* 2002; Antzelevitch *et al.* 2005b). La misma mutación puede provocar fenotipos distintos dentro de la misma familia, eso se puede deber a distintos factores moduladores, el más importante es el sexo, siendo las principales sospechosas las hormonas sexuales. Algunos estudios apuntan a que la testosterona ayuda a desarrollar la expresión clínica de Brugada (Benito *et al.* 2008b), otros concluyen que la testosterona puede modular factores electrocardiográficos (Priori *et al.* 2002; Moric *et al.* 2003; Herfst *et al.* 2003).

Desórdenes arritmogénicos como el SB o el SQT3 se consideran enfermedades eléctricas cardíacas, lo cual implica que no haya ninguna alteración del corazón tanto a

nivel funcional como estructural (Antzelevitch *et al.* 2005a; Antzelevitch 2006; Rodriguez-Calvo *et al.* 2008).

El síndrome de QTL es un desorden hereditario que se caracteriza por la predisposición a desarrollar arritmias ventriculares y prolongación del intervalo QT en el ECG. Los estudios génicos de familias con clínica de QTL apuntan a mutaciones en los canales iónicos cardíacos, principalmente los canales de sodio y potasio. Se han identificado 12 genes causantes de los distintos tipos de QTL (Antzelevitch 2007b). La mayor parte se heredan de forma autosómica dominante, aunque se han descrito formas recesivas como el Jervell y Lang-Nielsen (JNL). Este último se asocia a un fenotipo severo y a sordera congénita (Benito *et al.* 2009) (Tabla 2).

Los mecanismos mediante los cuales se generan las arritmias son distintos según el tipo de QTL (Amirali & Massumi 2007). Los pacientes de SQT3 (SCN5A) suelen desarrollar los eventos durante el sueño, sin embargo en los casos de SQT1 (KCNQ1) y SQT2 (KCNH2) ocurren en situaciones de estrés físico o emocional (Schwartz *et al.* 1995; Amirali & Massumi 2007) (Figura 7). Aún así los casos de MS son más frecuentes en pacientes con clínica de SQT3 que en los casos de SQT1 y 2 (Rodriguez-Calvo *et al.* 2008).

Algunas de las alteraciones en el gen del canal de sodio cardíaco, SCN5A, que causan “ganancia de función” cursan con SQT tipo 3, como la delección de tres aa, Δ KPQ, localizada en el “loop” de unión entre los dominios III y IV, donde se encuentra el sitio de inactivación del canal. Esta delección de tres aa provoca un alargamiento de la duración del PA debido al bloqueo de la inactivación del canal (Keating & Sanguinetti 2001). La activación de los canales mutados es normal, pero al bloquearse la puerta de inactivación produce una corriente mantenida de sodio durante la fase 2 del PA (fase de plató) lo que conduce a un alargamiento de la duración del potencial.

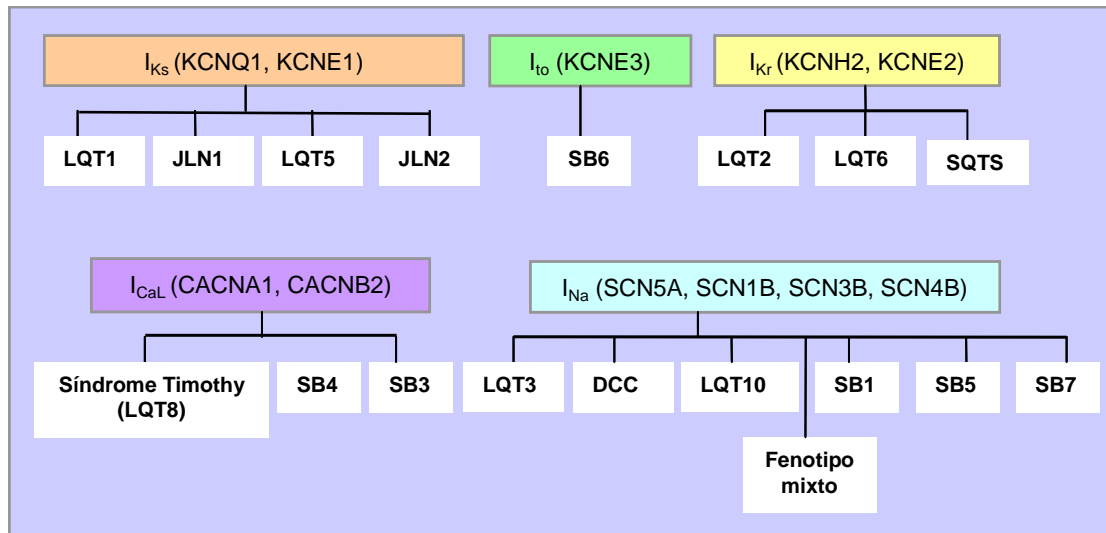


Figura 7. Desórdenes arritmogénicos y genes causales que codifican para canales iónicos y sus subunidades accesorias.

Existen algunas situaciones patológicas del miocardio en las que se puede observar un ECG que simula patrón de Brugada. En un trabajo realizado por Frustaci et al se estudió la relación entre el ECG de Brugada, la presencia de mutaciones en SCN5A y la enfermedad estructural del corazón (Frustaci *et al.* 2005). Concluyen que la disfunción del canal de sodio cardíaco debida a alguna mutación en dicho gen, podría ser la causante de que el paciente presente un ECG típico de SB y pueda derivar en una alteración estructural del corazón (no observada mediante métodos no invasivos). Proponen que el patrón ECG con elevación del segmento ST no suponga un marcador específico del síndrome, pero que una alteración eléctrica o estructural en el ventrículo derecho pueda tener una posible causa en una alteración génica del SCN5A o bien originada por una inflamación o infección (Frustaci *et al.* 2005).

Otro grupo describe una familia donde los pacientes afectados presentaban taquicardias ventriculares o auriculares (no pudo ser determinado con exactitud) irregulares, se detectaron mutaciones en el SCN5A (tanto “nonsense” como “missense”) y donde el análisis patológico del corazón mostraba cambios característicos de la miocardiopatía dilatada con alteraciones de la conducción (Bezzina *et al.* 2003).

Está por demostrar como influyen los factores ambientales, la epigenética, o defectos génicos en el SCN5A en el desarrollo de una enfermedad estructural, y como combinadas o cada una por separado contribuyen en la expresión de un fenotipo determinado.

2.3. Fisiopatología de la disfunción del canal de sodio cardíaco

El tejido del miocardio ventricular está compuesto por tres capas, el epicardio, el endocardio y las células M (capa intermedia), cada una con unas características electrofisiológicas concretas.

El PA cardíaco representa la activación e inactivación de los canales cardíacos, Na^+ y Ca^{2+} (corrientes de entrada al miocardio) y K^+ (corriente de salida del miocardio). Según la región del corazón a la que nos refiramos el perfil del PA variará en función del patrón de expresión de dichos canales (Nerbonne JM and Guo W. 2002). Dicho patrón rige la correcta propagación del potencial de acción en el corazón y el ritmo cardíaco.

Alteraciones en dichos canales modifican la repolarización cardíaca y pueden desencadenar en arritmias. Está demostrado que las subunidades β de Na_vCH_s interactúan con el citoesqueleto o la matriz extracelular (Xiao ZC 1999; Kazarinova-Noyes *et al.* 2001) y que están en contacto con proteínas reguladoras (Nerbonne & Kass 2005). Por tanto, cualquier alteración de este conjunto proteico, tanto a nivel de expresión como en su funcionalidad, podría desencadenar diversas patologías cardíacas.

Existen varias subunidades accesorias de los Na_vCH_s (β_1 - β_4), pero sólo las tres primeras se expresan en corazón (Nerbonne & Kass 2005). Se ha demostrado recientemente que mutaciones detectadas en los genes que codifican para las subunidades accesorias pueden desencadenar procesos arrítmicos (Watanabe *et al.* 2008; Hu 2009).

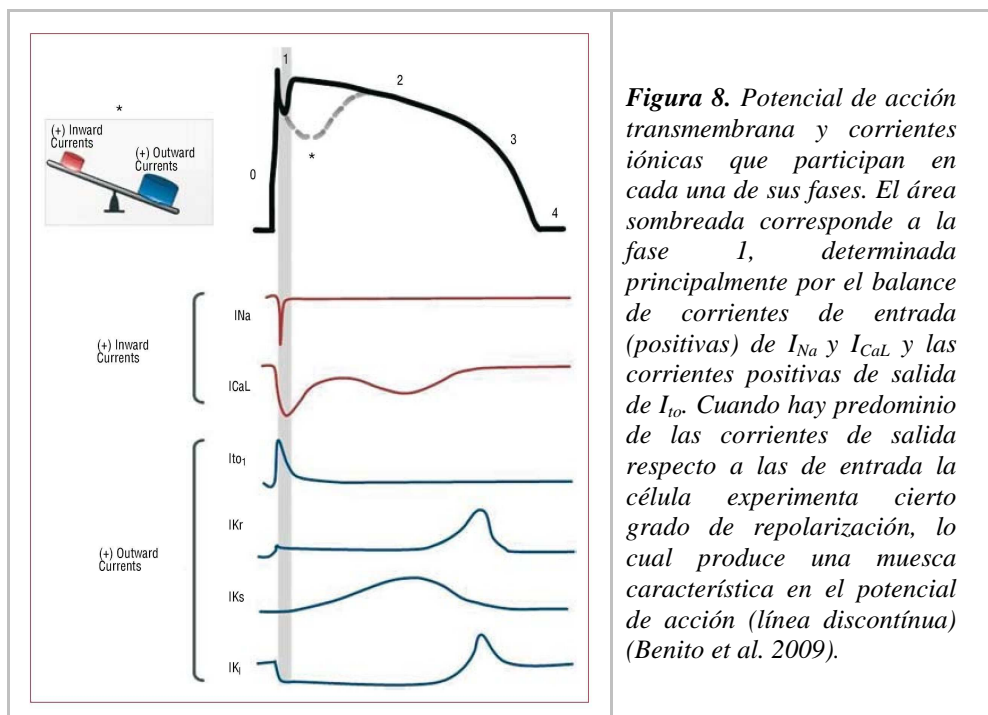
En el ventrículo, en las células de la aurícula y en las fibras de Purkinje, la fase 0 del PA (despolarización) depende de la activación de los Na_vCH_s (Fozzard 2002). En los nódulos sinoauricular y atrioventricular la fase 0 es mucho más lenta que en el ventrículo y aurícula con lo que los Na_vCH_s no deben ser importantes para la despolarización en éstas células.

En la fase 1 del PA se produce la inactivación de los Na_vCH_s y la activación de los canales de corriente transitoria rápida de K^+ (I_{tof}).

El desequilibrio de las corrientes de entrada o salida favorece el desarrollo de la muesca característica y la pérdida del lomo del PA mediados por un incremento de las corrientes de salida I_{to} . La densidad de I_{to} en el epicardio es mayor que en el endocardio,

lo cual da lugar a un gradiente transmural de voltaje que produce la elevación característica del segmento ST (Yang GX 1999). El desequilibrio de las corrientes iónicas al final de la fase 1 explica la aparición de arritmias ventriculares en el SB, provocadas por un mecanismo de reentrada en fase 2 (Benito *et al.* 2009).

Los Na_vCH_5 se activan e inactivan rápidamente durante la fase de despolarización cardíaca. La despolarización de membrana activa los canales Ca_v tipo L, entra Ca^{2+} masivamente al miocardio durante la fase 2 (fase de plató). Una disminución al final de la fase 1 en las corrientes I_{CaL} (producida por mutaciones en CACNA1c o CACNB2b) o un aumento de las corrientes de salida de potasio I_{to} (producido por una mutación en KCNE3) también explicaría el ECG típico de SB. Una vez se van desactivando los Ca_v predomina el efecto de las corrientes rectificadoras de salida de K^+ , resultando en la fase 3 del PA de repolarización cardíaca (Figura 8).



El conocimiento de la base fisiopatológica del SB explica el efecto de ciertos moduladores como el aumento de la expresión del fenotipo durante el aumento del tono vagal (la acetilcolina inhibe las I_{Ca} , sin embargo los betamiméticos las aumentan (Benito *et al.* 2009)), incluso esclarece el por qué de la diferencia de la expresión fenotípica entre géneros incluso teniendo un patrón de herencia autosómica dominante (los varones podrían tener constitutivamente mayor I_{to} que las mujeres) (Litovsky & Antzelevitch 1990; Di Diego JM *et al.* 2002; Benito *et al.* 2008b).

3. SÍNDROME DE BRUGADA

3.1. Diagnóstico

El primer artículo donde se describió el SB como nueva entidad clínica fue en 1992 donde se explicaban los casos de ocho pacientes con características clínicas similares (Brugada & Brugada 1992). Esta publicación suscitó gran interés debido a su asociación con un elevado riesgo de MS.

Este síndrome se caracteriza por una elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales derechas (V1-V3) del ECG y está asociado a la MS en pacientes sin cardiopatía estructural evidente (Brugada & Brugada 1992). Tiene una base genética estando ligado a mutaciones en el canal de Na⁺ del corazón (SCN5A) y otros genes recientemente relacionados que se mencionan más adelante.

El SB es la causa de un 4-12% de todas las MS y hasta un 20% de las MS que acontecen en corazón normal (Antzelevitch *et al.* 2005a). Los pacientes de SB permanecen en su mayoría asintomáticos, aunque se ha descrito que un 17-42% de ellos presentan síncope o MS como consecuencia de una arritmia ventricular en algún momento de su vida (Chen *et al.* 1998; Priori *et al.* 2002; Brugada *et al.* 2002; Brugada *et al.* 2003; Eckardt *et al.* 2005). Debido a que el ECG es bastante dinámico es difícil hacer una estimación precisa de la prevalencia (Brugada *et al.* 2003). Se calcula que la prevalencia del SB se sitúa en torno a 500/1.000.000 habitantes, aunque posiblemente esta cifra subestima la prevalencia real, dado que muchos pacientes pueden presentar formas silentes de la enfermedad. Se ha descrito una gran variabilidad geográfica, de forma que el SB parece ser mucho más frecuente en el sudeste asiático que en Europa occidental o Norteamérica (Rodríguez-Calvo *et al.* 2008). En Asia se conoce como el Síndrome de muerte súbita inexplicada (SMSI) (Nademanee 1997; Vatta *et al.* 2002).

El patrón electrocardiográfico puede ser desenmascarado por bloqueantes de los canales de sodio (Figura 9), estados febriles o agentes vagotónicos (Brugada *et al.* 2000a; Brugada *et al.* 2000b; Vatta *et al.* 2002; Antzelevitch & Brugada 2002; Antzelevitch 2006; Toshihisa Miyazakia 2008). Estos agentes también pueden dar lugar a formas adquiridas del SB. Se reconocen tres tipos de patrones de repolarización, los cuales pueden ser observados secuencialmente en un mismo paciente.

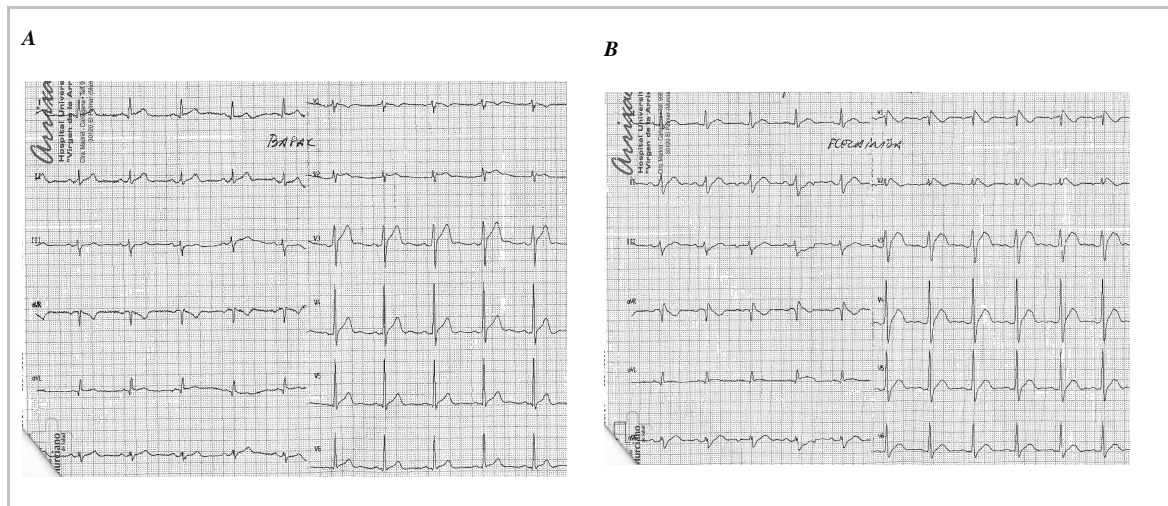


Figura 9. ECG del caso índice de la familia H568. A. ECG Basal tipo II-III. B. ECG diagnóstico tras test de provocación farmacológico con flecainida.

El ECG tipo I (cóncavo) es diagnóstico de Brugada y se caracteriza por una elevación del segmento ST ≥ 2 mm seguida de una onda T negativa. El tipo II tiene apariencia de silla de montar, con una elevación ≥ 2 mm y una onda T o positiva o bien bifásica. El ECG tipo III tiene apariencia cóncava o de silla de montar pero con una elevación < 1 mm. Los de tipo II y III no son diagnósticos de SB, éste sólo se determina cuando el paciente presenta ECG tipo I en más de una derivación, en presencia o ausencia de agentes bloqueantes de canales de sodio y junto con una o más de estas características clínicas: fibrilación ventricular (FV), taquicardia ventricular polimórfica (TVP), algún caso de MS cardíaca en un familiar menor de 45 años, ECG tipo I en algún miembro de la familia, inducibilidad de TV con estimulación eléctrica programada (EEP), síncope o respiración agónica nocturna (Brugada & Brugada 1992; Wilde *et al.* 2002; Antzelevitch *et al.* 2005a; Antzelevitch 2006).

Se ha comprobado que aproximadamente en el 20% de los casos de Brugada se desarrollan arritmias auriculares (Morita H & Kusano-Fukushima k 2002; Antzelevitch 2006). Algunos estudios realizados indican que éstas están relacionadas con la bradicardia, con lo que se explicaría la alta incidencia de la muerte de individuos con el síndrome durante la noche (Tan *et al.* 2001; Papadatos *et al.* 2002; Mizumaki *et al.* 2004). Se ha relacionado la elevación del segmento ST (regulado por el sistema nervioso autónomo) con la secreción glucosa-dependiente de insulina, siendo más acentuada la elevación del segmento ST durante el período posprandial, sobretodo después de las cenas (Mizumaki *et al.* 2007). La más común de las arritmias asociada a

estos pacientes es la TVP (Tester & Ackerman 2009), parecida a la arritmia de “Puntas torcidas” (Torsade de Pointes).

El SB ha recibido otros nombres en distintas regiones del planeta, así, se denomina Lai Tai (“muerte durante el sueño”) en Tailandia, Bangungut (“levantarse y lamentarse en sueño”) descrito por primera vez en 1917 en la literatura médica filipina y Pokkuri (“fenómeno de cese brusco e inesperado”) descrito en Japón en 1959 (Sugai 1959; Tan *et al.* 2001; Vatta *et al.* 2002). Estos nombres hacen referencia a la aparición de muerte súbita durante el sueño, que es una de las características de esta enfermedad. Es importante que no se confundan con otros casos en los que también se podría presentar una elevación del segmento ST típico de SB como ocurre en individuos que consuman dosis tóxicas de algún fármaco: antiarrítmicos, fármacos psicotrópicos, intoxicación por cocaína o alcohol entre otros (Antzelevitch 2006).

Existen otras patologías que pueden imitar el patrón electrocardiográfico de Brugada, que pueden ser hereditarias (miocardiopatía hereditaria del ventrículo derecho) o adquiridas (infarto agudo de miocardio, isquemia, embolismo pulmonar) y ECG similares en corazones normales (hipotermia, desequilibrio electrolítico, síndrome de repolarización temprana) pero no dejan de ser entidades clínicas bien diferenciadas con fisiopatología y pronóstico distinto (Yap *et al.* 2009).

El SMSI, síndrome muy prevalente en el sudeste asiático, y el SB han resultado ser tanto fenotípica como genética (ambos ligados a mutaciones en el canal de sodio cardíaco, SCN5A) y funcionalmente la misma patología (Vatta *et al.* 2002; Antzelevitch 2006).

3.2. Diferencias de género en el Síndrome de Brugada. Factores moduladores y dependencia con la temperatura

Diferencia de género en Síndrome de Brugada

A pesar de ser un síndrome que se transmite de forma autosómica dominante, se expresa con mayor frecuencia en varones, de 8 a 10 veces más (Song M *et al.* 2001; Di Diego JM *et al.* 2002). En la mayoría de series de pacientes con SB publicadas hay un predominio de pacientes varones, pero esto sólo indica casos aislados, ya que son probandos de familias y pueden no ser muestras representativas de todos los pacientes portadores de mutación. Los estudios que realmente nos podrían proporcionar una

información más fiable con respecto a la penetrancia y variabilidad del fenotipo son los estudios familiares, pero son escasos.

Otro factor a tener en cuenta es la enorme variabilidad de la expresión del fenotipo y la consecuente ausencia de un patrón de referencia para la caracterización clínica. Los pacientes pueden presentar desde un ECG típico asociado a MS y síncope, hasta ECG normal y ausencia de clínica típica del síndrome (Weiss *et al.* 2002; Francis & Antzelevitch 2005). Por todo ello es de gran importancia tener en cuenta los factores moduladores que intervienen en la expresión de la enfermedad (Di Diego JM *et al.* 2002; Beaufort-Krol *et al.* 2005; Niu *et al.* 2006).

Explicación celular de la diferencia de género

La mayor prevalencia en varones con respecto a mujeres se explica por la mayor influencia de I_{to} en el potencial de acción del ventrículo derecho (VD) en hombres frente a mujeres (Di Diego JM *et al.* 2002). La interferencia superior de I_{to} provoca la terminación de la fase 1 del PA y la pérdida de la meseta del PA provocando una reentrada en fase 2 y el desarrollo de TVP. Es importante a la hora de la expresión del patrón típico de SB el balance entre las corrientes iónicas (Benito *et al.* 2009), tanto el aumento de las corrientes de salida como la disminución de las corrientes de sodio y calcio son factores que contribuyen a la expresión de dicho patrón.

La elevación del segmento ST ocurre como consecuencia de la acentuación de la muesca del PA, que viene precedida de la pérdida de meseta del PA en el VD, donde I_{to} tiene mayor influencia. La pérdida de la meseta del potencial provoca una dispersión de la repolarización tanto transmural como en el epicardio. La dispersión transmural sería responsable de la elevación del segmento ST, mientras que la dispersión en el epicardio favorece una posible reentrada en fase 2 y el posible desarrollo de TV/FV (fibrilación ventricular) (Antzelevitch 2005). Sabemos por tanto de la importancia de I_{to} en las diferencias ligadas al sexo, pero podría depender de otros muchos factores, como el número de canales expresados o de proteínas reguladoras.

I_{to} depende principalmente de la actividad del canal $K_{v4.3}$. Se ha demostrado en ratas que la expresión de dicho canal está inhibida al final de la gestación de manera secundaria a un aumento en la concentración de estrógenos (Song M *et al.* 2001).

La isquemia

La isquemia o el infarto agudo de miocardio provocan una elevación del segmento ST similar a la producida en el SB. La activación de la corriente de potasio ATP-dependiente (I_{k-ATP}), que se activa cuando disminuye la concentración de ATP, sugiere que los pacientes con formas congénitas y posiblemente adquiridas de SB pueden tener un riesgo más elevado de MS cardíaca en un contexto de isquemia (Noda T & Shimizu W 2002).

La hipopotasemia

La hipopotasemia se cree que puede inducir FV. En la región del nordeste de Tailandia donde el déficit de potasio es endémico se ha relacionado por la alta prevalencia de SMSI (Nimannit S & Malasit P 1991). La hipopotasemia es un factor predisponente a la aparición de arritmias ventriculares sobretodo cuando se asocia a una repolarización anormal (Antzelevitch *et al.* 2005a). La hipopotasemia podría empeorar la dispersión de la repolarización en los pacientes que padecen SB o SMSI y provocar una FV continuada. Se ha demostrado que la concentración de potasio sérica disminuye por la noche debido a que normalmente se produce un desplazamiento de potasio sérico hacia el compartimento muscular (Andres R. *et al.* 1957; Antzelevitch 2005). Todos estos factores indican que una concentración baja de potasio podría ser una de las claves de la FV durante la noche en estos pacientes.

Estados febriles y temperatura corporal

Se ha demostrado tras el estudio de varios casos que las enfermedades febriles pueden desenmascarar el SB y desencadenar un episodio de FV (Morita H *et al.* 2002; Porres JM *et al.* 2002; Antzelevitch & Brugada 2002; Kum LCC *et al.* 2002; Saura D *et al.* 2002). Tras el descubrimiento de la mutación T1620M, que produce la inactivación acelerada del canal de sodio a la temperatura fisiológica pero no a la temperatura ambiental (Dumaine *et al.* 1999), se destaca con especial importancia la relación de la temperatura corporal y los climas de temperaturas elevados con la desactivación de los canales iónicos y su actuación como factor modulador. El propósito de este trabajo fue caracterizar los factores determinantes genéticos y moleculares en la relación SB-fiebre. Se genotipó el gen SCN5A de cuatro pacientes que habían presentado el ECG típico de Brugada durante episodios febriles y se encontraron dos mutaciones, en este estudio a

parte de demostrar la influencia de la temperatura sobre determinadas mutaciones y su condición heteróloga, queda plasmada la predominancia del efecto negativo (las proteínas que están alteradas determinan el funcionamiento de las restantes) de mutaciones sobre canales salvajes.

Variación circadiana

La FV y la MS en el SB se producen en reposo y durante la noche (Matsuo *et al.* 1999). El aumento de la incidencia de FV en este síndrome es similar en el SQTL tipo 3, ambos debidos a mutaciones en el canal de sodio cardíaco.

Se desconoce si existe alguna relación entre el sueño y la expresión de SCN5A. Podría ser importante la variación circadiana del equilibrio simpato-vagal, algunas hormonas y factores metabólicos. Yamaki *et al.* describen el caso de un paciente con SB al que miden a lo largo del día la concentración hormonal de testosterona y el ECG, coincidiendo durante la noche (2 a.m.), la mayor concentración sérica de la hormona sexual y el aumento de la elevación del segmento ST y anchura de la onda P (Yamaki *et al.* 2009). La insulina, por otro lado, desenmascara la elevación del segmento ST (Nogami *et al.* 2003; Nishizaki *et al.* 2003), este efecto puede contribuir a la variación circadiana (Matsuo *et al.* 1999). La insulina aumenta la corriente de salida mediante la activación de la bomba Na^+/K^+ y estimula I_{CaL} .

En un trabajo más reciente se menciona la influencia de las estaciones y el ritmo circadiano en la presentación de FV en pacientes con SB, siendo más significativa la presentación de episodios de FV durante los meses de Marzo a Junio y durante la madrugada (desde medianoche hasta las 6 de la mañana) (Takigawa *et al.* 2008).

Sistema nervioso autónomo

Se ha establecido bien la relación del sistema nervioso autónomo en las arritmias ventriculares (Podrid *et al.* 1990). El aumento del tono vagal podría ser arritmógeno en los pacientes con SB. Además, por la noche, durante el sueño, cuando habitualmente hay un aumento del tono vagal se incrementan los niveles de acetilcolina y se facilita la pérdida de la cúpula del PA, acentuándose la elevación del segmento ST (Litovsky & Antzelevitch 1990). Aunque en cuanto al sistema simpato-vagal existen resultados contradictorios respecto a si aumenta o disminuye durante la noche (Kasanuki *et al.* 1997; Krittayaphong *et al.* 2003), lo que si está claro es que afecta su equilibrio en los

pacientes con SB. El grupo de Kostopolou et al. no encontró diferencias en la variabilidad de la frecuencia cardíaca en 20 pacientes con SB entre el día y la noche, aunque sí encontraron desequilibrio simpatoadrenal en varios de los individuos, siendo más propensos los individuos con SB a sufrir síncope vasovagales (Kostopolou *et al.* 2010).

3.3. Herramientas diagnósticas

Los pacientes con SB demostrado pueden tener ECG normales en otras ocasiones, además puede no expresarse completamente en una familia. Sin embargo en pacientes asintomáticos se describe la aparición del electrocardiograma típico tras la administración de determinados fármacos (Akhtar & Goldschlager 2006) como antiarrítmicos de clase 1A y 1C, flecainida, procainamida, ajmalina, etc.

Los datos actuales apuntan a que la ajmalina es el fármaco más eficaz en el diagnóstico de SB. Estudios de pacientes con SB con mutación identificada en el gen SCN5A demuestran que la ajmalina posee una sensibilidad del 80% y una especificidad del 94,4% (Hong *et al.* 2004b) frente a los valores obtenidos en otro estudio para la flecainida, 77% y 80% respectivamente (Meregalli *et al.* 2006). Los estudios realizados de “patch clamp” muestran que la flecainida además de bloquear el canal de sodio, reduce en mayor medida las corrientes I_{to} , lo que explica su menor efectividad respecto a la ajmalina (Wolpert *et al.* 2005).

La función del sistema nervioso autónomo es muy importante, el bloqueo α -adrenérgico reduce la elevación del ST, mientras que la estimulación tiene el efecto contrario (Toshihisa Miyazakia 2008). Por otro lado, en pacientes afectados de SB la isoprenalina normaliza el patrón electrocardiográfico de brugada y previene los episodios de FV durante la EEF (Tanaka *et al.* 2001; Shimizu & Kamakura 2001).

Recientemente se ha relacionado este patrón adquirido con el consumo de determinados fármacos como antidepresivos, alcohol, drogas, litio, que podría ser debido a la susceptibilidad de determinados pacientes a sufrir anomalías electrocardiográficas como resultado de una disfunción latente del canal (Yap *et al.* 2009).

3.4. Pronóstico de los pacientes de Síndrome de Brugada y tratamiento

Es muy importante la identificación, tratamiento y estratificación del riesgo en estos pacientes. Según la bibliografía existente los fármacos antiarrítmicos no son un tratamiento eficaz, en la actualidad la única opción para la prevención de eventos en estos pacientes parece ser la implantación de un desfibrilador automático implantable (DAI) (Khan *et al.* 2009).

La quinidina, un alcaloide natural considerado antiarrítmico de clase I, ayuda a aumentar el período refractario después de la repolarización en el PA y funciona como bloqueante-no específico de la I_{to} . Al bloquear las corrientes de salida, y específicamente I_{to} , que es activo durante la fase inicial del potencial de acción, podría restablecer el equilibrio entre las corrientes de entrada (reducida en pacientes con SB) y de salida y está propuesto como terapia gen-específica para el SB (Yang GX 1999). Los datos clínicos disponibles demuestran que la quinidina previene la inducibilidad arrítmica en las pruebas de EEP y sugiere su efectividad como prevención de la aparición espontánea de arritmias (Belhassen *et al.* 2004).

4. GENÉTICA MOLECULAR EN EL SÍNDROME DE BRUGADA

4.1. Papel de la genética en la práctica clínica

Desde que se describió el SB se ha estado buscando las posibles causas de la expresión de la enfermedad, en gran medida debido a que esta patología se cobra la vida de personas jóvenes. El SB tiene un factor que acentúa la dificultad diagnóstica, la gran heterogeneidad clínica, la variación del patrón electrocardiográfico en un mismo paciente. En este punto el genotipado de los pacientes puede ayudar a los cardiólogos a determinar el diagnóstico clínico en los casos límite y ayudará a la estratificación del riesgo (Kapa *et al.* 2009).

En el caso de las cardiopatías arrítmicas hereditarias más de un gen puede causar la enfermedad y son por lo general muy heterogéneas. Como en el caso de SQT1 en el que se han detectado al menos 12 genes causales, aunque sólo tres de estos genes suponen alrededor del 75% del diagnóstico genético. Aún así, en cerca del 25% de los casos de SQT1 queda sin esclarecer la causa genética de la enfermedad (Tester & Ackerman 2009).

El SB tiene un patrón de herencia autosómica dominante. El primer gen relacionado con el síndrome fue el SCN5A, que codifica la subunidad α del canal de sodio cardíaco. Se pueden identificar alteraciones en este gen en un 20% de los pacientes (Benito *et al.* 2009). Existen otros genes relacionados que se mencionan más adelante, descubiertos recientemente, aunque la prevalencia todavía es menor que en el caso del SCN5A.

Para la detección de las mutaciones el método de elección por excelencia es la secuenciación directa. Esta técnica presenta varios inconvenientes como el ser un proceso laborioso y de coste elevado. Con el objeto de soslayar dichos inconvenientes y acelerar el proceso se pueden utilizar diversos métodos de cribado previos a la secuenciación, como el SSCP/SSCA (Single Strand Conformation Polymorphism/Single Strand Conformation Analysis), DGGE (Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante) o el dHPLC (Cromatografía Líquida Desnaturalizante de Alto Rendimiento). Éstos evitarían la secuenciación masiva de las muestras, procesando sólo las que se identifiquen con algún patrón anómalo.

La MS en este síndrome se da en personas jóvenes por lo que el número de parientes del que se dispone normalmente es reducido, siendo los estudios de ligamiento complicados. Otro impedimento añadido es la baja *penetrancia* (proporción de individuos portadores de una mutación causante de una patología determinada que muestran síntomas de esa patología) (<30%) de la enfermedad (Francis & Antzelevitch 2005).

También se encuentran mutaciones en SCN5A en pacientes con diagnóstico clínico de SQT3, no obstante éstas producen una ganancia de función, al contrario que ocurre en el SB. De hecho, al menos se asocian tres enfermedades a mutaciones en el canal de sodio cardíaco que son SB, síndrome QTL3 y DCC. Además se puede presentar solapamiento fenotípico, detectándose en pacientes con diagnóstico clínico de SB prolongación del QT, DCC o fibrilación auricular (Antzelevitch, 2005a).

La *expresividad clínica* (grado de influencia del genotipo sobre la expresión del fenotipo) es variable en el síndrome (Hermida *et al.* 2000; Miyasaka *et al.* 2001). Existirían distintos grados de severidad en los fenotipos, presentando todos los pacientes la misma mutación, con lo que hace el diagnóstico más difícil.

Existen distintos tipos de alteraciones de la secuencia de ADN:

1. Las mutaciones que pueden alterar el marco de lectura: “missense”, la alteración de la base nucleotídica produce un cambio de aminoácido, “nonsense”, el cambio de aa que se produce da lugar a un codón de parada prematuro, una delección/inserción o una mutación “frameshift”.
2. Las mutaciones que pueden alterar el sitio de corte y empalme (“splice site”): cola de polipirimidina o secuencias de reconocimiento donador/aceptor.
3. Polimorfismos o SNP (del inglés “Single Nucleotide Polymorphism”). Se encuentran en la población en un porcentaje elevado en comparación con las alteraciones consideradas como mutación. A priori no afectan a la proteína. Aunque no debemos descartar el papel modulador que pueden ejercer sobre las mutaciones, incrementando o atenuando su efecto en la proteína, incluso restableciendo el tránsito como es el caso de un polimorfismo muy frecuente en población caucásica en el gen SCN5A, H558R (Ye *et al.* 2003).

En el estudio genético se considera mutación nueva una alteración encontrada no descrita en la bibliografía siempre que:

1. La mutación no esté presente en 200 alelos control de la misma etnia que los pacientes.
2. La mutación se segrega con la enfermedad.
3. Debe variar la conformación de la proteína, ejercer una variación funcional o alterar el tránsito de la proteína a membrana.
4. La alteración afecta a una región conservada.

Es por tanto interesante el estudio del valor de los polimorfismos; efecto modulador-relación causal o como marcadores, cercanos a un factor determinante genético de la enfermedad. Recientemente se ha publicado un artículo donde se estudiaron las subunidades accesorias β_1 y β_2 , encontrando en β_1 un polimorfismo, IVS3 +2996 (TTA) 8-15 (no descrito en raza caucásica), que puede ser causante del desarrollo del patrón de SB en varones adultos jóvenes (Ogawa R 2010).

Debido a la baja penetrancia, la variabilidad de la expresión clínica y el reducido número de familias numerosas, el estudio del genotipo del SCN5A en pacientes afectados de SB se encuentra todavía lejos de poder ayudarnos a la hora de dar un diagnóstico puramente genético, sin embargo sí aporta un gran valor en la práctica clínica siendo:

1. Útil para apoyar el diagnóstico clínico.
2. Diferenciación de los casos límites.
3. Identificación y pronóstico en portadores con mutaciones de alto riesgo.

4.2. Canal de sodio cardíaco, gen *SCN5A* y otros genes relacionados

La relación entre *SCN5A* y el síndrome de Brugada (**SB1**) se estableció en 1998 (Chen *et al.* 1998). En la actualidad se conocen en total 8 genes que se consideran responsables del fenotipo clínico de Brugada (Tabla 2).

Se han descrito hasta la fecha seis posibles isoformas del gen, la más larga es la *isoforma a*, codifica una proteína de 2016 aa, la *isoforma b*, correspondiente a una proteína de 2015 aa que es consecuencia de la delección de un aa, el primero del exón 18 (Q1077del), las isoformas restantes son más pequeñas y presentan delección de algún exón en comparación con la *isoforma a* (Figura 10).

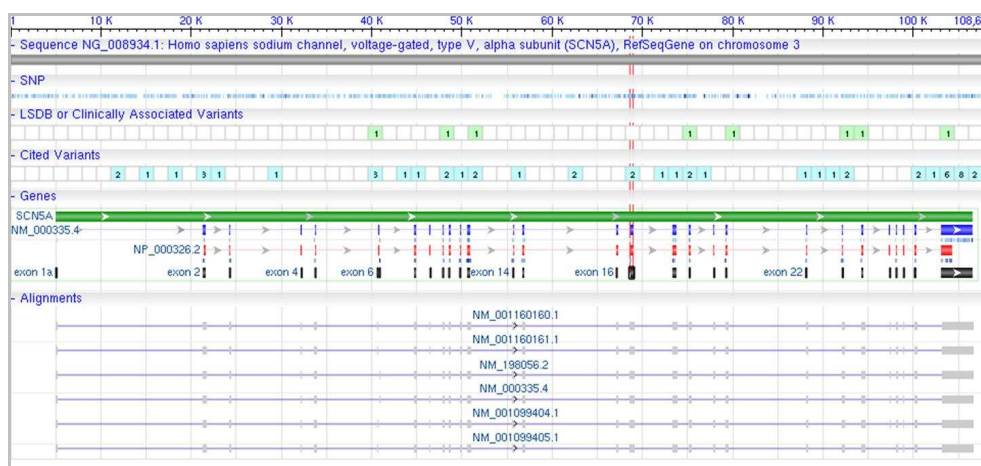


Figura 10. Gen *SCN5A*, representadas 6 de las isoformas del gen.

La subunidad α del canal de sodio formadora de poro está asociada a dos tipos funcionales de subunidades auxiliares, β_1 y β_2 fueron identificadas en primer lugar. Una tercera subunidad, β_3 , es estructuralmente similar a β_1 y la cuarta subunidad β_4 es homóloga a β_2 . Las subunidades β_3 y β_1 son en un 50% homólogas en su secuencia aminoacídica pero muestran distintos patrones de expresión según el tejido y durante el desarrollo embrionario y neonatal, lo cual indica que deben tener papeles funcionales bien diferenciados (Santana *et al.* 1998; Fahmi *et al.* 2001). Tienen un importante papel en la cinética del canal y funcionan como subunidades moduladoras (Nerbonne & Kass 2005).

La subunidad β_1 aumenta la intensidad de las corrientes de sodio cuando se coexpresa en sistemas con la subunidad α {Nuss, 1995 253 /id} e incluso aumenta la expresión de una variante defectuosa en el tránsito a membrana. La subunidad β_3 induce la cinética del “gating” de activación y desactivación del canal (Morgan *et al.* 2000). Bajo determinadas condiciones β_3 puede incrementar la expresión del canal en la membrana plasmática, lo que beneficia la retención en la membrana o el tránsito del canal a la superficie membranal (Morgan *et al.* 2000).

En un estudio reciente se demuestra la relación de los canales de calcio tipo L (Ca_L), CACNA1C y su subunidad accesoria CACNB2 para explicar un fenotipo mixto SB y síndrome de QT corto (Antzelevitch *et al.* 2007). Mutaciones en ambos genes se relacionan con **SB3** y **SB4** respectivamente. Algunos agentes bloqueantes de los canales de calcio provocan una forma adquirida de SB (Antzelevitch *et al.* 2007).

En 2002 se determinó otro locus, también en el cromosoma 3, aunque se desconocía el gen responsable (Weiss *et al.* 2002). Más tarde ese locus se identificó como el gen glicerol 3-fosfato deshidrogenada 1-like gen, GPD1L, responsable del **SB2**. La mutación A280V en este gen afecta al tránsito del canal a membrana celular (London *et al.* 2007).

Otros genes también relacionados recientemente con el SB son las subunidades β del canal de sodio codificadas por los genes SCN1B (**SB5**) (Watanabe *et al.* 2008) y SCN3B (**SB7**) (Hu 2009) y la correspondiente subunidad β del canal de corriente transitoria de potasio (Ito) codificada por KCNE3 (**SB6**) (Delpon 2008). Por último el gen HCN4 está asociado al **SB8** (Ueda K 2009).

Tabla2. Genes asociados a los distintos tipos de SB, indicando locus del gen y canal iónico que codifica

<i>Enfermedad</i>	<i>Locus</i>	<i>Gen implicado</i>	<i>Canal iónico</i>
SB1	3p21-p23	SCN5A	Sodio
SB2	3p22.3	GPD1L	Glicerol 3 fosfato deshidrogenada 1-like
SB3	12p13.3	CACAN1C	Calcio-L
SB4	10p12	CACNB2	Sub. β Calcio-L
SB5	19q13.1	SCNB1	Sub. β_1 Sodio
SB6	11q13-q14	KCNE3	Transitoria potasio
SB7	11q23.3	SCNB3	Sub. β_3 Sodio
SB8	15q24-q25	HCN4	Canal de potasio activado por nucleótido cíclico 4

Se han estudiado algunas de estas mutaciones en ensayos de expresión, habiendo mostrado una pérdida de función debido a varios mecanismos (1) fallo en la expresión del canal, (2) cambio de la dependencia voltaje-tiempo de la corriente de activación, inactivación o reactivación de sodio, (3) entrada del canal de sodio en un estado intermedio de inactivación del que se recupera lentamente o por último (4) inactivación acelerada del canal. La aceleración de la inactivación del canal se ve acentuada a temperaturas más altas de la fisiológica, sugiriendo que los pacientes con SB tienen mayor riesgo durante estados febriles, como se menciona con anterioridad (Antzelevitch 2006).

En un estudio reciente se describe en una familia que presentaba patrón ECG de SB una mutación que **delecionaba los segmentos 2 y 3 del dominio IV** que causaba una pérdida de función. Esto es provocado por una inserción de 4 bp (TG GG) al final del exón 27, que implica la pérdida de 96 bp entre ambos exones (Hong *et al.* 2005).

Según la zona geográfica y la raza de los individuos sujetos a estudio, se ha visto gran variabilidad tanto en estudios de prevalencia de la patología como de prevalencia de distintas mutaciones en la población (Rodríguez-Calvo *et al.* 2008). Esto queda reflejado en un trabajo realizado por Bezzina *et al.* donde demuestran la presencia de un **haplotipo** en la zona del **promotor**, característico de la raza asiática y ausente en las razas blanca y negra, consistente en 6 polimorfismos que modulan la variabilidad en la

conducción y que podría ser la causa de la alta incidencia de la enfermedad en la población asiática (Bezzina *et al.* 2006).

Se conoce poco sobre el extremo **C-terminal**, formado por los últimos 244 aminoácidos, las mutaciones asociadas a esta región intracelular pueden jugar un papel importante en la inactivación del canal y la estabilización del estado inactivo (Cormier *et al.* 2002). En el extremo C-terminal se han encontrado tres variantes en el corte y empalme del ARN-m resultando en canales truncados y no funcionales. Estas variantes se encontraron en mayor proporción que la isoforma más larga en corazones que habían sufrido fallo cardíaco. Su descubrimiento puede ayudar a explicar la pérdida de canales de sodio y puede contribuir al riesgo de padecer arritmias en un contexto de fallo cardíaco (Shang *et al.* 2007).

Debemos tener en cuenta que existen otros muchos factores a la hora de la determinación de la severidad de la influencia de determinados polimorfismos o mutaciones dependiendo de la **isoforma** del SCN5A de que se trate (Tan *et al.* 2005; Tan *et al.* 2006). En un estudio realizado por Makielski en 2003 se demuestra que las dos isoformas principales de SCN5A, isoforma a e isoforma b (que corresponde a la variante Q1077del) se presentan independientemente del sexo, edad y etnia, en un 35% y un 65% respectivamente de la población. Al ser más frecuente la isoforma más corta es un posible indicio de su mayor estabilidad o simplemente su preferencia en el momento del “splicing”. Se estudió el polimorfismo H558R, tan frecuente en la población ($\approx 30\%$) y se observó que en los sistemas HEK293 en los que se expresan conjuntamente el polimorfismo y la variante intrónica Q1077del la corriente de Na^+ disminuía considerablemente en comparación a cuando se expresa con la variante intrónica más larga.

Se han descrito alrededor de 300 mutaciones en el canal de sodio cardíaco repartidas a lo largo de la proteína (Kapplinger *et al.* 2010). Se puede consultar en una base de datos disponible en la web (<http://www.fsm.it/cardmoc>). Dos terceras partes de las mutaciones encontradas en el compendio de Kapplinger son de tipo “missense”, la tercera parte restante incluyen mutaciones del tipo “frameshift” (38 mutaciones), “nonsense” (32 mutaciones), “splicesite” (21 mutaciones), inserciones y deleciones (9 mutaciones).

No se conoce hasta la fecha ningún “cluster” de mutaciones en la proteína, estando repartidas a lo largo del canal, aunque en el último estudio multicéntrico publicado localiza al 71% de ellas en la región transmembrana (Kapplinger *et al.* 2010).

El hecho de que no se encuentren mutaciones en el canal de sodio no descarta otras posibilidades como la presencia de alguna alteración en la región promotora, sitios de “splicing” alternativo en zonas intrónicas no estudiadas (criptic splicing mutations) o grandes reordenamientos génicos, ya sean duplicaciones o deleciones, pero ninguno de estos casos se incluye en estudios rutinarios del gen (Antzelevitch 2007a).

4.3. Relación genotipo-fenotipo

Para realizar un análisis exhaustivo de la relación genotipo-fenotipo debemos tener en cuenta todos y cada uno de los factores que determinan la clínica, y una vez ya caracterizados, los genes implicados.

En el SB podemos considerar, en cuanto a los factores a nivel molecular; las corrientes iónicas, las distintas subunidades moduladoras, junto con la expresión y la modificación del canal iónico.

Las variaciones en las corrientes iónicas quedan reflejadas en el ECG del paciente, su ritmo cardíaco y posibles alteraciones de la conducción. La base fisiopatológica que se ha propuesto para explicar el SB consiste en un reequilibrio entre las corrientes que intervienen en la fase 1 del PA. En esta fase se acentúa la muesca del PA debida a I_{to} , que es la que puede inferir en la reentrada en fase 2 y la posible generación de arritmias ventriculares. Por tanto, una reducción de las corrientes iónicas despolarizantes, I_{Na} e I_{Ca-L} , o bien un incremento en la corriente iónica de repolarización precoz, I_{to} , puede dar lugar a la expresión del fenotipo típico de SB.

En la tabla 3 se detallan las corrientes que intervienen en las fases de despolarización rápida y meseta del PA cardíaco, y los genes correspondientes.

Tabla 3. Corrientes iónicas intervinientes en el PA cardíaco.

<i>Corriente</i>	<i>Gen</i>	<i>Cromosoma</i>
I_{Na}	SCN5A	3p21
Subunidad	β1(SCN1B)	19p13,1-q13.2
Subunidad	β2(SCN2B)	11p23
Subunidad	β3(SCN3B)	11q23.3
Subunidad	β4(SCN4B)	11q23.3
I_{Ca-L}	CACNL1A1	12pter-p13.2
Subunidad	β1(CACNB1)	17q21-q22
Subunidad	β2(CACNB2)	10q12
Subunidad	α2β(CACNA2D1)	7q21-22
I_{to}	Kv4.3(KCND3)	1p13.2
Subunidad	kChip2(KCNIP2)	10q24

En principio una mutación en cualquiera de los genes descritos en la tabla podría ser causa en mayor o menor medida del fenotipo de SB.

Todos los canales iónicos se caracterizan estructuralmente por una subunidad formadora de poro, α , y una o varias subunidades accesorias, β . Éstas ayudan a la modulación del canal e intervienen activamente en su cinética. La presencia de las subunidades moduladoras puede ser necesaria para el enlace, movimiento y expresión del canal en membrana (Roden *et al.* 2002).

La expresión del canal de sodio cardíaco (hH1) en la membrana viene dirigida por diversas proteínas intracelulares (Zimmer *et al.* 2002) (Figura 11). Cabría esperar que mutaciones en estas proteínas, como el dominio PDZ de la sintropina, afectasen a la hora de dirigir el canal a zonas específicas de membrana.

Es posible la modificación del canal mediante interacciones proteína-proteína. Un estudio, realizado por el grupo de Tan *et al.*, demostró que tras la unión a calmodulina (CaM) variaron las propiedades de la compuerta del canal (Tan *et al.* 2002) incrementándose la inactivación lenta, demostrándose por tanto la dependencia del canal de sodio a la concentración de Ca^{2+} intracelular.

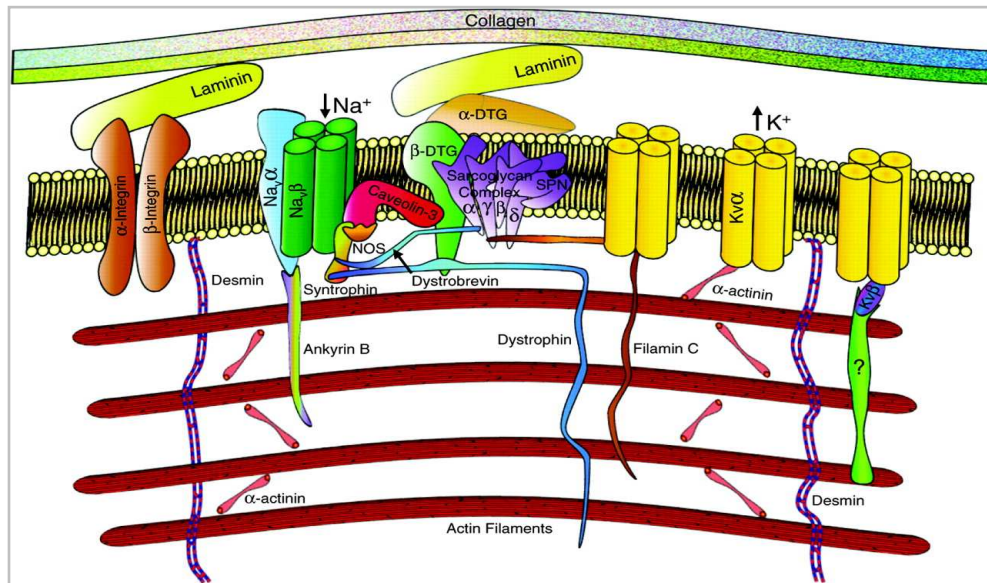


Figura 11. Interacciones proteína-proteína involucradas en la regulación de la expresión, distribución y funcionamiento de los canales iónicos cardíacos. Las subunidades α y β de los canales Na_v interactúan con el citoesqueleto de actina a través del complejo sintropina-distrofina y la anquirina B y con la matriz extracelular a través del complejo sarcoglicano. Las interacciones del canal K_v (subunidades α y β) con el citoesqueleto de actina están mediadas por proteínas de unión a actina (filamina) y la α -actina a través del dominio PDZ (Nerbonne & Kass 2005).

También puede afectar a la expresión y al proceso de apertura y cierre del canal modificaciones que se lleven a cabo mientras éste se encuentre en el RE, como la des/glicosilación y la des/fosforilación (Zhang *et al.* 1999).

La aplicación de técnicas de análisis de alta resolución del genoma puede ayudar a la detección de fenotipos más esporádicos, como los obtenidos de reordenamientos génicos resultantes de una variación de novo en el número de copias (Kumar 2008). El tamaño de los fragmentos de DNA que pueden ser delecionados o duplicados resultando en la expresión de una determinada enfermedad varía desde un único exón (unos cientos de bases o incluso menos) hasta cromosomas enteros (Sellner & Taylor 2004).

Pequeñas inserciones o deleciones son fácilmente detectables mediante PCR y secuenciación directa; en el caso de grandes deleciones (del orden de megabases ($\text{Mb}=10^6$)) se identifican mediante técnicas citogenéticas (FISH (Hibridación por Fluorescencia *in situ*)), sin embargo las inserciones y deleciones de tamaño medio (de un gen o parte del mismo) pasan desapercibidas por ambas técnicas. Muchas de los

casos en los que el paciente presentaba clínica pero no se dilucidaba la causa genética pueden ser debidos precisamente a esta dificultad (Sellner & Taylor 2004). El MLPA es un nuevo método descrito en 2002 por J. Schouten que permite la búsqueda de deleciones o duplicaciones.

En cuanto a los parámetros clínicos que pueden determinar un fenotipo más severo podemos mencionar los síntomas de presentación, edad a la que se suele presentar el primer síntoma, la morfología del ECG y el test de provocación farmacológica con bloqueantes específicos del canal.

Todos estos factores pueden ser contribuyentes al desarrollo de la clínica de Brugada, dependiendo de en qué modo se vea afectado el canal el paciente expresará fenotipos más severos o con mayor riesgo.

Hipótesis Y Objetivos

En el presente trabajo nos planteamos las siguientes *hipótesis*:

El estudio por secuenciación directa del gen del canal del sodio (SCN5A) permitirá conocer la causa de la enfermedad en un porcentaje importante de pacientes en nuestra población (estimado en un 20%).

Es posible que grandes reordenamientos en el gen del canal de sodio sean causa del síndrome. Por medio de la técnica MLPA será posible detectar alteraciones genéticas en pacientes con estudio por secuenciación del SCN5A normal.

Determinados cambios en la secuencia de aminoácidos se asocian a un perfil fenotípico y pronóstico específicos.

El dHPLC es una técnica de cribado útil con una sensibilidad y especificidad adecuadas comparada con la secuenciación directa del gen SCN5A. El dHPLC permitiría reducir significativamente los costes y el tiempo del estudio.

Objetivos:

1. Estudiar la prevalencia de las alteraciones genéticas en el canal de SCN5A en una población con diagnóstico clínico de Síndrome/patrón de Brugada.
 - a. Secuenciación directa del gen SCN5A.
 - b. Estudio reordenamientos con técnica MLPA.
2. Estudiar la relación entre el genotipo y fenotipo de las mutaciones encontradas en el gen SCN5A.
3. Comparar el valor de una técnica de cribado (dHPLC) con la secuenciación directa en el estudio del gen SCN5A.

Material Y Métodos

1. PACIENTES Y CONTROLES SANOS

La mayor parte de los pacientes incluidos en este trabajo vinieron referidos de una consulta familiar de cardiopatías hereditarias, dirigida por el Dr. Juan Ramón Gimeno y en el que participan varios cardiólogos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Constituida desde 2002 ejerce para la prevención de la muerte súbita y tratamiento de cardiopatías de origen congénito. Diecisiete probandos vinieron referidos del Hospital General de Alicante y un paciente del Complejo Universitario de la Coruña, todos ellos incluidos bajo los mismos criterios clínicos.

Para el reclutamiento de los pacientes de SB se realizó el diagnóstico según los criterios recogidos en el consenso de expertos del año 2002, que estableció las características electrocardiográficas basales y tras las pruebas de provocación con fármacos (Wilde *et al.* 2002). Se ofreció la posibilidad de estudio clínico completo a los familiares de primer grado de los afectados, con una media de 5 sujetos por probando.

Se llevó a cabo la recogida de datos clínicos de todos los probandos y la realización de una serie de pruebas diagnósticas; ECG, ecocardiograma, Holter, prueba de provocación farmacológica, estudio electrofisiológico en casos seleccionados según criterio clínico y una extracción de sangre.

Una vez completo el árbol genealógico se contactó con todos los familiares de primer grado de los probandos, y se realizó la historia clínica y las pruebas diagnósticas tipificadas.

Dado que los pacientes con SB presentan de forma característica cambios dinámicos en el ECG, pudiendo aparecer en algún momento patrones totalmente normales de repolarización, se recomienda la administración de fármacos antiarrítmicos de clase I para desenmascarar el ECG característico. Por lo que si el paciente presentaba ECG del tipo II y III, se recomendó el test farmacológico (Wilde *et al.* 2002).

Los test farmacológicos se han realizado utilizando flecainida (2 mg/kg, max. 150 mg en 10 minutos) y procainamida (10 mg/kg; 100 mg/min). La procainamida es el fármaco con menor sensibilidad para desenmascarar el ECG, pero es el más seguro de los dos fármacos.

Los pacientes y familiares recibieron información detallada de su patología. Para la participación en el estudio genético se requería la firma en un consentimiento informado (Anexo I).

Se incluyeron en el estudio una serie de 100 pacientes control (de raza caucásica, 33% varones) reclutados en nuestro laboratorio, sin antecedentes de muerte súbita en la familia, para valorar las nuevas variantes génicas encontradas.

En el Anexo II se muestra un algoritmo de la inclusión de los pacientes y el procesamiento general de las muestras.

2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se extrajo el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico de todos los casos índices mediante el sistema automático de Promega (Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit. Figura 12) a partir de 400µL de sangre periférica, extraída en tubo con anticoagulante EDTA. La técnica se basa en la actuación de unas partículas paramagnéticas que funcionan como una fase sólida móvil que optimiza la captación, lavado y elución de la muestra. En el Anexo III se muestra el flujo de trabajo que se realiza con las muestras desde la extracción de sangre hasta la predicción de patogenicidad de una variante nueva.

Para realizar la extracción de ADN se centrifugaron los tubos 5´ a 3500 rpm y se extrajo la capa de leucocitos (capa blanca) para conseguir mayor concentración y pureza del material génico extraído. Las muestras de ADN se llevaron a una concentración de 20 ng/µL y el resto se congeló a -20°C incluyéndose en la ADNteca de la Unidad de Cardiopatías Hereditarias.



Figura 12. A. Maxwell 16 System. B. Guía de utilización del Maxwell 16. C Esquema detalle de la extracción de ADN.

Con menor frecuencia se utilizó el kit de extracción de Roche “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Ref.11796828001). El kit parte de 200 μ L de sangre periférica y se le añadió 200 μ L de tampón de lisis y 40 μ L de proteinasa K reconstituida; se mezcló e incubó 10’ a 70° C. A continuación se añadió 100 μ L de isopropanol y mezclamos bien. Metimos la columna en un eppendorf y depositamos la muestra en el centro del filtro. Centrifugamos 1’ 8000 x g. Se descartó el eluido y el tubo colector. Pusimos la columna en un nuevo eppendorf y se le añadió 500 μ L de tampón de inhibición. Centrifugamos otro minuto a 8000 x g.

Se midió la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría utilizando el equipo de Thermo Scientific, Nanodrop 1000 (Figura 13). Las medidas se realizaron a una absorbancia (A) de 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos, para la concentración y la obtenida de la relación entre A_{260}/A_{280} nm para determinar la calidad del ADN extraído, considerándose un ratio entre 1,5-1,8 como aceptable.

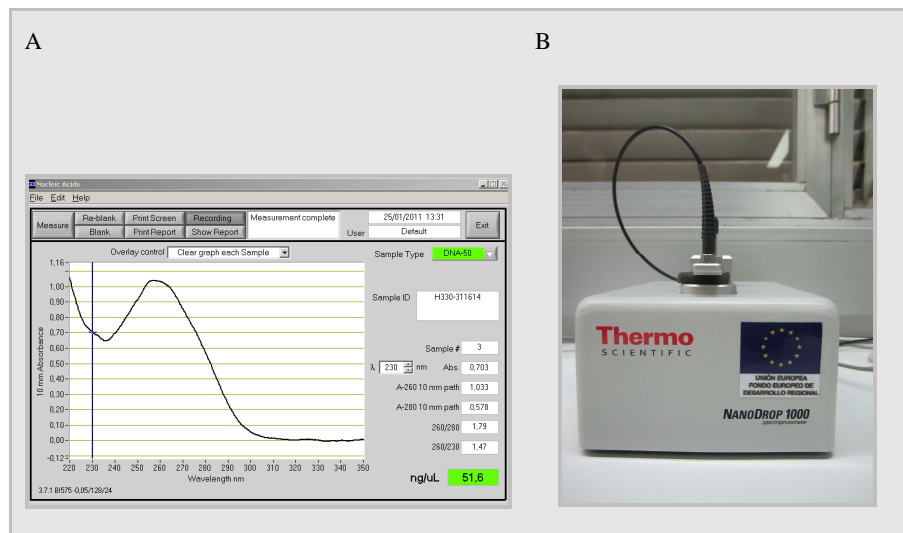


Figura 13. A. Curva de absorbancia de una muestra de ADN. B. Nanodrop1000 (Termo).

3. AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO

Se amplificaron cada uno de los 28 exones del gen SCN5A (NM_198056.2, OMIM *600163) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados se obtuvieron de la publicación de Syrris P. et al de 2001, y algunos de ellos se modificaron (marcados en la tabla 4 con “*”) para la optimización de la PCR utilizando el software disponible en la web “Primer3plus” (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Syrris *et al.* 2001). Se utilizó como secuencia de referencia la isoforma a, la más larga del gen SCN5A.

Los cebadores utilizados para las amplificaciones vienen detallados en la tabla 4, la temperatura de melting media (T^a m) recomendada por el fabricante y el tamaño de los amplicones resultantes.

Se agruparon todos cebadores en 3 temperaturas de hibridación (60 °C, 63 °C y 65 °C) para agilizar el proceso. Se realizaron pruebas con programas de PCR “touchdown” y multiplex, aunque finalmente no se utilizaron estos programas de amplificación en la optimización del proceso al suponer un mayor número de agrupaciones de cebadores. Se utilizaron los modelos de termociclador: 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700 y modelo Veriti de la misma casa.

El kit enzimático escogido para las amplificaciones fue Amplitaq Gold with GeneAmp de Applied Biosystems y más tarde se escogió el kit de Promega Go Taq Hot Start polymerase con el que se obtuvo mejor rendimiento. La enzima de Promega necesita un tiempo de activación menor que otras de las que están disponibles en el mercado, además reduce la formación de productos inespecíficos y la formación de dímeros de cebadores.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μL , 5 μmoles de cada dNTP (desoxinucleótido trifosfato: ATP, GTP, CTP, TTP), 50 μmoles Cl_2Mg , 10 μmoles de cada cebador (sentido y antisentido), 0,125 μL Taq, 50ng ADN (Tabla 5). Primeramente se realizó una fase de reactivación de la polimerasa a 94 °C durante 2', seguido de un programa de 35-40 ciclos que incluye tres temperaturas: 94 °C 1' (desnaturalización de hebra molde), 60 °C-65 °C (T^a anillamiento varía en función del cebador) 45'', 72 °C 1' (tiempo de extensión); por último una fase de extensión final 72 °C 10' y 4 °C indefinidamente.

Tabla 4. Cebadores utilizados para las amplificaciones. T^m de hibridación recomendada (T^m) y tamaño del amplicón.

Exón	T^m	Cebador	Tamaño amplicón (bp)
2*	65	F 5'-GGTCTGCCCACCCTGCTCTCT-3' R 5'-CCTCTTCCCCCTCTGCTCCATT-3'	463
3	61	F 5'-AGTCCAAGGGCTCTGAGCCAA-3' R 5'-GGTACTCAGCAGGTATTAAGTCAA-3'	228
4	65	F 5'-GGTAGCACTGGCCTGGCAGTGAT-3' R 5'-CCTGGACACAAGCCCCCTTC-3'	292
5*	59	F 5'-TCAGGCCTCCCTAAGAAACC-3' R 5'-GGCATAGCACAGCATAGCAA-3'	203
6	60	F 5'-CCTTTCCTCTCTGACTGTGTG-3' R 5'-GGTATTCTGGTGACAGGCACATTC-3'	287
7*	60	F 5'-CGTGCTTGTCTTGCCTTC-3' R 5'-CCAGCTGCAGAGCAAGTTCG-3'	281
8*	59	F 5'-AGGGGCAGAGAAGAAGGAAG-3' R 5'-CAGTTGAGAAAAACACCAGGAGA-3'	248
9	65	F 5'-GGGAGACAAGTCCAGCCCAGCAA-3' R 5'-AGCCACACTTGCTGTCCCTTG-3'	262
10*	59	F 5'-GAACCCCTGGCACAACCTAGA-3' R 5'-CCACAGGCACCAGCTTTAAC-3'	386
11*	60	F 5'-TGATAGGGAAAACCAAGTCACTG-3' R 5'-TGCTAGGCCCTGTACAGTC-3'	360
12*	60	F 5'-CACATGTCATGGTCGTGTCC-3' R 5'-GGTCTGGTCTCCCAAATGA-3'	464
13*	60	F 5'-AGGTCCAGCAGGACAGGAG-3' R 5'-TCTTTATCCCAGCCTGACCC-3'	280
14*	61	F 5'-GGAAGGTATTCCAGTTACATATGA-3' R 5'-GCAGCTGGCACAGCCTTCATGGGT-3'	387
15	61	F 5'-CTTTCCATCCCAAACAATTCCT-3' R 5'-ACTGCATGGGGGATGGTGGGGG-3'	247
16*	61	F 5'-GTCCCCTCCTTCTCCTCCT-3' R 5'-ATCTACCCAGCTACCCACC-3'	434
17	65	F 5'-GGGACTGGATGGCTTGGCATGGT-3' R 5'-CATGTATAAGGCACCTACATATACAG-3'	544
18*	58	F 5'-CATGGGCAGGGTCTGAAAC-3' R 5'-CTGGCTTCAGGGACAAAGG-3'	282
19	65	F 5'-GAGGCCAAAGGCTGCTACTCAG-3' R 5'-CCTGTCCCCTCTGGGTGGAAC-3'	245
20	63	F 5'-ACAGGCCCTGAGGTGGCCTGA-3' R 5'-TGAACCTGACTTTCCAGCTGGAGA-3'	288
21	65	F 5'-TCCAGGCTTCATGTCCACCTTGTCT-3' R 5'-TCTCCCGCACCGGAATGGGT-3'	270
22	65	F 5'-AGTGGGGAGCTGTTCCATCCT-3' R 5'-GGACCGCCTTCCACTCC-3'	216
23*	60	F 5'-GGTCTTGAAAAGGCATGTG-3' R 5'-CCATTGGAGGAAGGAAGTC-3'	386
24	61	F 5'-CTCAAGCGAGGTACAGAATTAATGA-3' R 5'-ATCAGTGTCTGCATCTGAAAGCCC-3'	202
25	61	F 5'-GCCTGTCTGATCTCCCTGTG-3' R 5'-CAACAGGGAAGGTGAGATGG-3'	279
26	65	F 5'-CCATGCTGGGCCTCTGAGAAC-3' R 5'-CACATGGCCAGCCATCAGAGCC-3'	248
27*	61	F 5'-CCCTGCTGAGCACTTCCATTTG-3' R 5'-TACAAGTCAGCTGGACGGAGAAGC-3'	338
28.1	61	F 5'-ACCAGTAGCCACAGTCTCTGTTG-3' R 5'-CCAACAGCATGTGTGCCTTTC-3'	335
28.2	65	F 5'-AAGTGGGAGGCTGGCATCGAC-3' R 5'-GCGTGGCCACGGAGGAGAGCAC-3'	302
28.3	65	F 5'-GAGCCCAGCCGTGGGCATCCT-3' R 5'-CTGCCCATGGTGAGTGGGGAC-3'	310
28.4	61	F 5'-CCAACCAGATAAGCCTCATCAACA-3' R 5'-TCCTTTCCTCAGCAGGCGG-3'	309
28.5	60	F 5'-TGCTGCAACGCTCTTTGAAGCAT-3' R 5'-AGGACACACTGAAAAGCAGCCTTT-3'	347

* Cebadores diseñados con el software primer3 plus.

Tabla 5. Reacción en cadena de la polimerasa

PCR	V (μL)
H ₂ O	10,375
Buffer (10X)	5,0
Cl ₂ Mg (25mM)	2,5
dNTP's (2mM)	2,5
Primer F + R (10mM)	1+1
Taq (0.5U/μL)	0,125
DNA (20ng/μL)	2,5
Vol. Total	25

Se verificó la correcta amplificación de los fragmentos mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X (Tris 89mM - ácido bórico 89 mM – EDTA (2mM) a pH 8,4 de Bio-Rad (161-0770)) utilizando para el revelado GelRed (0,1 μL GelRed/1 μL gel) (GelRed Nucleic Acid Gel Satín, 10000X in Water. Catalog number: 41003. Biotium), una solución de tinción fluorescente de ácido nucleico que sustituye al bromuro de etidio, muy tóxico, utilizado habitualmente en los laboratorios de biología molecular para la tinción del ADN de doble cadena. Se cargaron aproximadamente 3 μL de producto amplificado junto con 1 μL de tampón de carga (0,25% (W/V) azul de bromofenol, 0,25% (W/V) cianol xileno, 30% (V/V) de glicerol en agua). El tamaño de las muestras se comparó con un marcador de tamaño de peso molecular (pGEM DNA Markers de Promega). Se utilizó para el revelado el trasiluminador Alpha Innotech y la cámara PowerShot A640 AiAF de Canon.

A continuación se purificaron los amplicones mediante un método enzimático, con el kit Exosap-It (usb. Affimetrix. Figura 14). Este kit incluye dos enzimas, la exonucleasa I, que elimina las cadenas simples de ADN residuales que se puedan formar en la PCR o restos de cebadores y una fosfatasa alcalina que elimina los restos de dNTP's. Se mezclan 5 μL del producto de reacción de PCR con 2 μL de Exosap-It, se incuba 15' a 37 °C y seguidamente 15' a 80 °C para su inactivación.

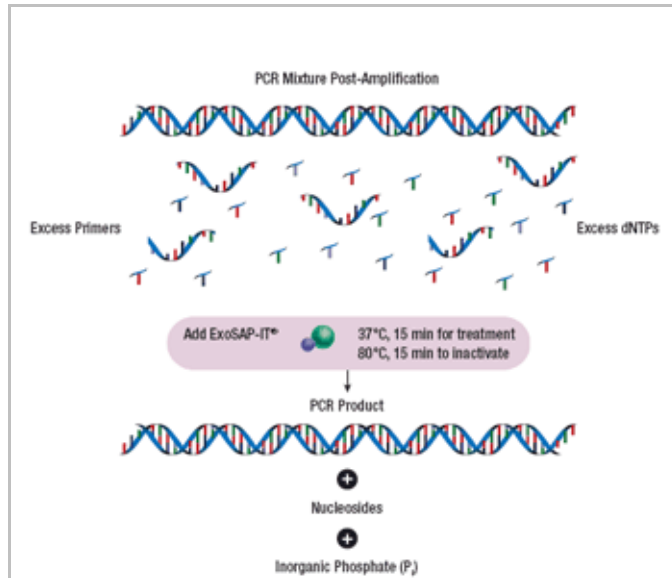


Figura14. Reacción enzimática para la purificación del producto de PCR

4. CRIBADO DE MUESTRAS MEDIANTE DHPLC

La técnica escogida para el cribado de las muestras fue la Cromatografía Líquida Desnaturalizante de alto rendimiento (dHPLC). Se realizó con el modelo de Varian Helix (Figura 15). Proporciona una reproducibilidad de perfiles de aproximadamente del 95% y posee alta sensibilidad (95%) para la detección de polimorfismos (“single nucleotide polymorphism” SNP’s) y mutaciones (O’Donovan *et al.* 1998).



Figura 15. Sistema de dHPLC. Varian Helix.

Es una técnica relativamente novedosa que utiliza un par iónico para la separación de fragmentos de ADN (Figura 16). El TEAA (trietilamonio) funciona como molécula puente entre el ADN y la fase estacionaria (eléctricamente neutra e hidrofóbica). La fase estacionaria tiene carga positiva y se une a las moléculas de ADN, con carga negativa debida a los grupos fosfato, haciéndola hidrofóbica. El número de moléculas de TEAA unido es proporcional a la longitud del fragmento de ADN, y determinará el grado de retención en la fase estacionaria. Las muestras fluyen en un circuito líquido compuesto por dos soluciones (“Buffer A” y “Buffer B”) con distintas concentraciones de acetonitrilo, lo que forma un gradiente. Las interacciones entre la molécula de ADN y la fase estacionaria se rompe a medida que aumenta el gradiente de acetonitrilo. Los fragmentos más cortos se liberan antes debido a su menor contenido de moléculas de TEAA.

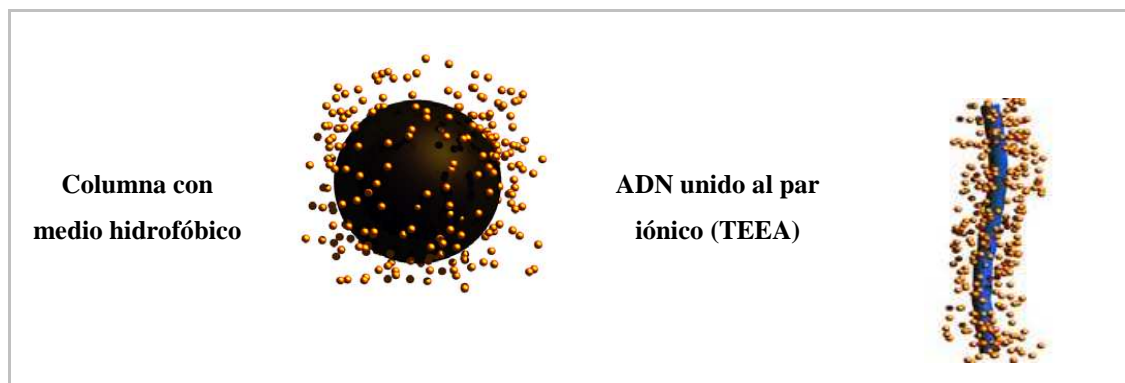


Figura 16. Columna con medio hidrofóbico y ADN unido a su par iónico (TEEA) que es lo que la hace hidrofóbica.

Los amplicones obtenidos mediante PCR, tras un proceso de desnaturalización y rehibridación lenta, forman 2 homodúplex (amplicón salvaje) o 2 homodúplex y 2 heterodúplex (amplicón con alteración en la secuencia). A una misma temperatura de análisis, las dos cadenas de heterodúplex se separan con mayor rapidez que los homodúplex, obteniéndose un cromatograma distinto, perfiles de elución, para los amplicones salvajes y amplicones con alguna alteración en su secuencia (Figura 17).

La muestra se desnaturalizó a 95 °C y durante 45 minutos se enfría hasta 25-30 °C (rehibridación lenta) para la formación de homodúplex y heterodúplex en el caso de secuencias con alguna alteración. Estos amplicones no requirieron de purificación previa antes de analizarse en el dHPLC.

La optimización de la temperatura de elución de un fragmento requiere un control de un polimorfismo o mutación en dicho fragmento para confirmar la presentación de distintos perfiles según la presencia de alteración en la secuencia. Se optimizó cada amplicón a una temperatura de elución ajustada en función de la predicha por el “Stanford Genomic Technology Center” (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>). La temperatura predicha depende de la composición de nucleótidos de su secuencia. La resolución depende de la posición de la mutación, la longitud del fragmento y el medio en el que se encuentre la secuencia. Generalmente la temperatura de análisis debe ser muy cercana a la T^a de “melting”. Se confirmó que la T^a escogida es la correcta analizando repetidamente la muestra a la T^a de prueba y 1 o 2 grados superior e inferior hasta que el pico del producto se desplace hacia tiempos de retención menores. Se compararon perfiles de muestras control previamente secuenciadas con las nuevas muestras. Los perfiles iguales al control secuenciado se consideraron “salvajes” y los perfiles “anómalos” se secuenciaron para determinar la existencia de alguna alteración en la secuencia.

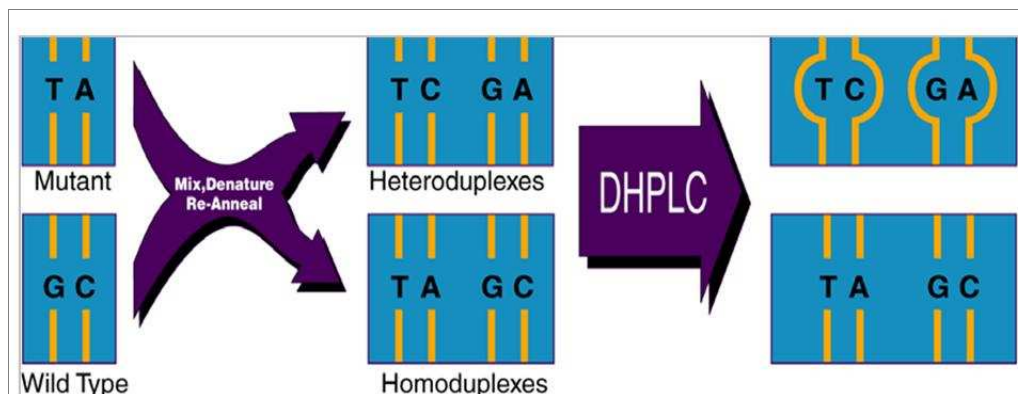


Figura 17. Desnaturalización y renaturalización lenta de amplicón con variante en la secuencia con la consiguiente formación de homoduplex y heteroduplex que se muestran en el cromatograma.

Para conseguir una alta capacidad de detección de heterocigotos y reproducibilidad requiere un tamaño de fragmentos entre 150 y 400 pb. Los productos de PCR de mayor longitud forman un mayor número de hélices al azar en el medio líquido, siendo recomendable para la optimización que el amplicón estudiado posea el menor número de dominios posibles, entendiéndose por dominios, regiones de la secuencia con una distinta temperatura de elución.

5. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DIRECTA

Se utilizó la secuenciación automática como técnica para detectar alteraciones en la secuencia del canal de sodio cardíaco. Se empleó el Kit BigDye Terminador (BDt) v1.1 de Applied Biosystems, una adaptación de la reacción enzimática dideoxi de Sanger (1977). Las secuencias fueron analizadas inicialmente por electroforesis capilar en el equipo ABI310, completándose el estudio en su mayor parte con el analizador de cuatro capilares ABI3130 (Applied Biosystems) (Figura 18).

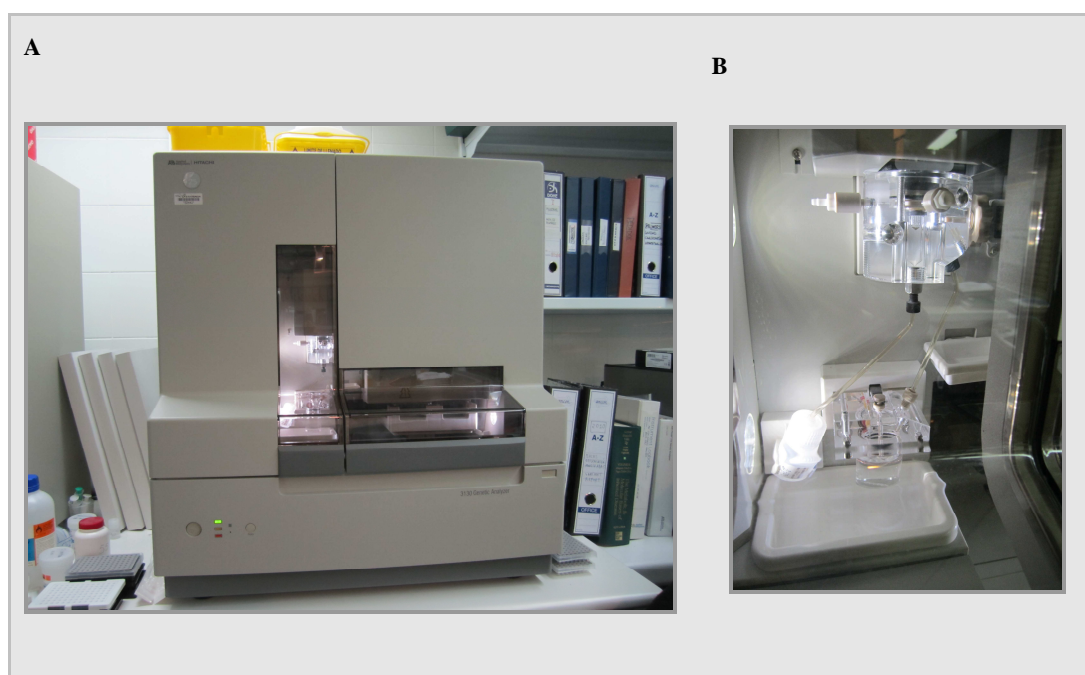


Figura 18. A. Analizador ABI 3130. B. Detalle del circuito del polímero.

El programa del termociclador que se utilizó para la reacción de secuenciación consta de una desnaturalización a 96 °C 1', seguido de un programa de 25 ciclos de tres temperaturas, 96 °C 10'', 50 °C 5'' y 4' a 60 °C terminando a 4 °C indefinidamente. Se trabajó con un volumen final de 5 µL; 1,75 µL "Buffer enhancer sequencing" (10X), 1,5 µL agua miliQ, 0,25 µL de BDt v1.1, 0,5 µL cebador ("Forward" o "Reverse" 3,2 µM) y por último 1 µL del producto de PCR (Tabla 6).

Tabla 6. *Reacción de secuenciación*

<u>Reacción de secuenciación</u>	V (µL)
H ₂ O	1,5
Buffer enhancer sequencing	1,75
Primer F ó R (3,2 mM)	0,5
Big Dye	0,25
Producto PCR	1,0
Vol. total	5

Se realizó la reacción de secuenciación, tras la purificación del amplicón, utilizando los mismos cebadores que para la PCR pero a una concentración de 3,2µM. Para confirmar los posibles cambios en la secuencia se hace una secuenciación bidireccional. El análisis de las secuencias se realiza con los softwares suministrados por la casa Applied Biosystems, “Foundation Data Collection v. 3.0”, “Sequencing Analysis v. 5.2”, “Seqscape v. 2.5” y “Variant Reporter v 1.0”.

6. PURIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los restos de dNTP’s sobrantes y posibles impurezas con las columnas de centrifugación centrisep (Princeton separations). Más tarde se utilizaron las columnas de EdgeBio (Performa DTR (Dye Terminator Removal) Gel Filtration Cartridges, cuyo protocolo se detalla a continuación. Ambos Kits se basan en la descripción de Sambrook et al. (1989) de filtración de ADN en gel para separar fragmentos de más de 16 pares de bases (pb) de restos de dideoxinucleótidos marcados, dNTP’s y otras sales o compuestos de bajo peso molecular (elimina hasta el 98% de sales presentes).

Se centrifugaron las columnas a 3000 rpm durante 2 minutos. Se retiró el agua restante y se colocó la columna en un vial de 1,5 ml nuevo. Se añadieron a los 5 µL de la reacción de secuenciación 10 µL de agua miliQ, el volumen final (15 µL) lo depositamos en el centro de la columna. Se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos. Se añadieron 10 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) que desnaturaliza la doble hebra del ADN, seguidamente se traspasaron las muestras purificadas a una placa de 96 pocillos (MicroAmp™. Optical 96-Well Reaction Plate. AppliedBiosystems) adaptada para el secuenciador.

Ocasionalmente se utilizó la purificación en placa de columnas de EdgeBio (96 pocillos). Se centrifugaron las placas a 850 g durante 3'. Al mismo tiempo se llevó el volumen de reacción de secuenciación hasta 20µL. Una vez descartado el filtrado de las columnas se aplicó el volumen de reacción a cada uno de los 96 pocillos de la placa y se volvió a centrifugar a 850 g 3'. Se añadieron 10 µL de formamida Hi-Di a cada pocillo. La placa de secuenciación se introdujo directamente en el secuenciador ABI3130 para la electroforesis capilar.

7. ALTERACIONES EN LA SECUENCIA

Una vez comprobada la presencia de una alteración en un caso índice, tanto conocida como nueva, mediante secuenciación bidireccional, se estudió al resto de familiares de los que se poseía muestra, secuenciando sólo el exón donde se detectó la variante. Cuando detectamos una alteración no conocida nos encontramos con dos casos:

1. **Alteración no conocida en región intrónica.** Tuvimos en cuenta las que se hallaban 30 pb aguas arriba y abajo de la región codificante. En este caso se utilizaron programas de análisis (indicados en la sección 8.4 de los estudios in silico de este capítulo) de las zonas de reconocimiento de la maquinaria del corte y empalme, y se comprobó una posible eliminación o aparición del sitio aceptor o donador para el proceso de corte y empalme.
2. **Alteración que se encuentra dentro de la región codificante.** Para considerarla como mutación debe estar en todos los individuos de la familia diagnosticados con SB, no debe estar presente en 200 alelos de individuos sanos sin historia de MS familiar (100 controles sanos) y se comprueba la zona a la que afecta la mutación, si es una zona conservada en la evolución entre varias especies e isoformas o se encuentra en la zona de selectividad iónica o de formación del poro conductor (zonas importantes para el funcionamiento de la proteína). A estas variantes también se les realizó el estudio in silico con los programas detallados en la sección 8.3 de este capítulo.

8. ESTUDIO DE GRANDES REORDENAMIENTOS EN EL GEN SCN5A

El MLPA (del inglés Multiplex Ligation Probe Amplification) es un nuevo método descrito en 2002 por J. Schouten que permite la búsqueda de deleciones o duplicaciones, así como cuantificación del ADN. Puede utilizarse tanto en ADN genómico como en ARNm (Gallano P. 2005). Requiere la hibridación específica de la secuencia, seguida de una amplificación de las sondas que hayan hibridado y un análisis semicuantitativo de los productos de PCR resultantes. Permite detectar los cambios en el número de copias de secuencias de más de 45 nucleótidos en una sola reacción. La detección en una muestra de dos regiones contiguas delecionadas proporcionaría un confirmatorio interno de la propia deleción. En el caso de la deleción de un único exón es necesaria la comprobación mediante otro método para la confirmación (Vaughn *et al.* 2008).

En la técnica de MLPA para el estudio de estos reordenamientos usamos el Kit SALSA MLPA KIT FOR DNA. P108 SCN5A. 2X50 (100 reacciones) de MRC Holland. Las sondas utilizadas en el kit para la detección de grandes reordenamientos génicos vienen indicadas en las tablas del Anexo IV. Se optimizó la técnica en el termociclador Veriti de Applied Biosystems (Figura 19.A) que facilita distintas opciones de programa que son necesarias en este caso. Se hicieron los cálculos siempre para una muestra de más.

Se escogió un grupo de muestras en las que no se hubiera detectado ninguna mutación causal y dos controles sanos de nuestro grupo control (C96 y C100). El protocolo para la detección de grandes reordenamientos se compone de 5 pasos (Figura 19.B).

- 1. Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas.** Primeramente se desnaturalizaron 5µL de ADN (20ng/µL) 5' a 98 °C. Se enfrió y pausó a 25 °C antes de abrir el termociclador y se añadieron 1,5 µL de SALSA probemix y 1,5 µL de MLPA buffer a cada tubo. Se mezcló e incubó 1' a 95 °C seguido de 18 horas a 60 °C (paso limitante debido a la evaporación del volumen de reacción, 8 µL). En este paso cambiamos los tubos de PCR después de la desnaturalización para evitar la evaporación de la reacción.
- 2. Reacción de Ligación.** Se redujo la temperatura hasta 54 °C y se añadieron 32 µL de la mezcla de ligación (3 µL de Ligase buffer A, 3 µL Ligase buffer B y 25

μL de agua miliQ. Se añade 1 μL de Ligase-65) y se homogenizó bien. Se incubó 15' a 54 °C seguido de 5' a 98 °C.

3. **Reacción de PCR.** Se mezclaron en tubos nuevos: 4 μL de SALSA PCR buffer, 26 μL de agua miliQ y 10 μL de la reacción de ligación anterior. En el termociclador a 60 °C mientras se prepara la mezcla de la polimerasa que contiene: 2 μL de SALSA PCR primers, 2 μL de SALSA Enzyme Dilution buffer, 5,5 μL de agua y por último se añadieron 0,5 μL de polimerasa por tubo y se mezcló bien. El programa de PCR consta de 35 ciclos de 30'' 95 °C, 30'' 60 °C y 60'' a 72 °C. Finalmente se termina con una incubación de 20' a 72 °C.
4. **Separación de los productos de amplificación mediante electroforesis.** Se mezclaban 12 μL de Formamida Hi-Di, 1 μL de producto de amplificación y 0,5 μL del marcador de tamaño utilizado, en nuestro caso LIZ500, y se desnaturalizó 5' a 95 °C.
5. **Análisis de datos.** Se copiaron los datos del analizador ABI3130, se visualizaron con el software GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems). Se abrieron como un archivo de Excel y se eliminaron los picos sobrantes que no correspondían a ningún locus control ni a ningún exón del SCN5A. Mediante una plantilla de análisis se normalizaron los datos con respecto a las áreas de los controles sanos. A continuación se comprobó la existencia de una posible duplicación o delección en el gen. Utilizamos los rangos de referencia utilizados por otros grupos de investigación e indicados por la casa comercial (MRC Holland), considerando un valor por debajo de 0,6 sospechoso de delección y por encima de 1,4 de duplicación, utilizando siempre dos controles sanos como referencia. Ambos se tendrían que confirmar posteriormente. Debemos tener en cuenta que quizás algunos polimorfismos interfieran en la hibridación de alguna sonda y pudiera generar un falso positivo.

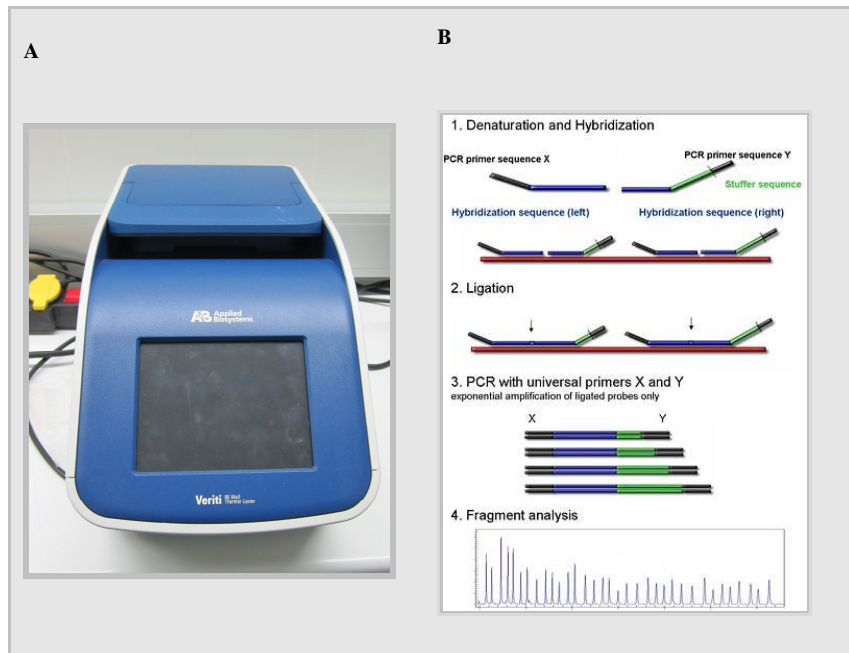


Figura 19. A. Termociclador Veriti (Applied Biosystems). B. Esquema de pasos a seguir de la técnica de MLPA.

9. ESTUDIO DE MICROSATÉLITES

El ADN microsatélite, también conocido como STR (“Short Tandem Repeats”), se define como segmentos cortos de mono, di, tri o tetranucleótidos y constituye el 2% del genoma.

El uso de microsatélites ofrece algunas ventajas como marcador genético:

1. Se transmite de manera mendeliana.
2. El número de unidades de repetición puede variar de un individuo a otro.
3. Estos marcadores se pueden utilizar para el análisis de ligamiento, pruebas de identidad, parentesco y mapeo de genes relacionados con alguna patología o características concretas.

La técnica de microsatélites se ha utilizado para el estudio de 3 familias portadoras de una misma mutación conocida para demostrar el efecto fundador y que comparten un antecesor común.

Los microsatélites utilizados fueron obtenidos del trabajo publicado por Haack et al. y están indicados en la tabla 7 (Haack *et al.* 2004). La ubicación de los microsatélites en el cromosoma 3 viene indicada en la figura 20. Los cebadores

“forward” fueron marcados con el fluoróforo 6-FAM. Se ha utilizado el kit de Qiagen “Type-it Microsatellite PCR Kit” (Cat. N° 206241). El programa de amplificación utilizado consta de varios pasos, 5´ a 95° (activación de la polimerasa de la Master Mix), 28 ciclos de 3 temperaturas: 30´´ 95°; 90´´ a 57° y 30´´ a 72°; una extensión final de 30´ a 60° y a 4° indefinidamente. Para la PCR de microsatélites utilizamos los reactivos y cantidades señalados en la tabla 8.

Tabla 7. Marcadores microsatélites para el análisis de síndrome de Brugada.

<i>Microsatélite</i>	<i>Secuencia (5´→3´)</i>
D3S1211-F	CAGGGCTTGTGGGATTAGAA
D3S1561-F	GCAGGAAGAGCAGATAAAGTC
D3S3527-F	ATCGGCCATATGTTGGTAC
D3S2373-F	AGGGACTTGGACAGGC
D3S3559-F	GCTCTACATCAGGCAACC
D3S3719-F	TCATGCAGAATCTCATGGGT
D3S1211-R	ATTTTCAGATTTTCAGGACAAGGG
D3S1561-R	AACCAGGGA ACTCTCAAGTCTG
D3S3527-R	TGTGGTCTGAGAAGATACTTGAT
D3S2373-R	ATCTGCCACCAGGAGG
D3S3559-R	AAAAATAATTGGACCTGTAAAAAC
D3S3719-R	CGCCCTGACTGGCTCTTA

Tabla 8. PCR de microsatélites.

<u>PCR de microsatélites</u>	V (µL)
H ₂ O	6,5
Master Mix	12,5
Solución Q	2,5
Primer (2µM cada cebador)	2,5
ADN (20ng/µL)	1,0
Vol. total	25

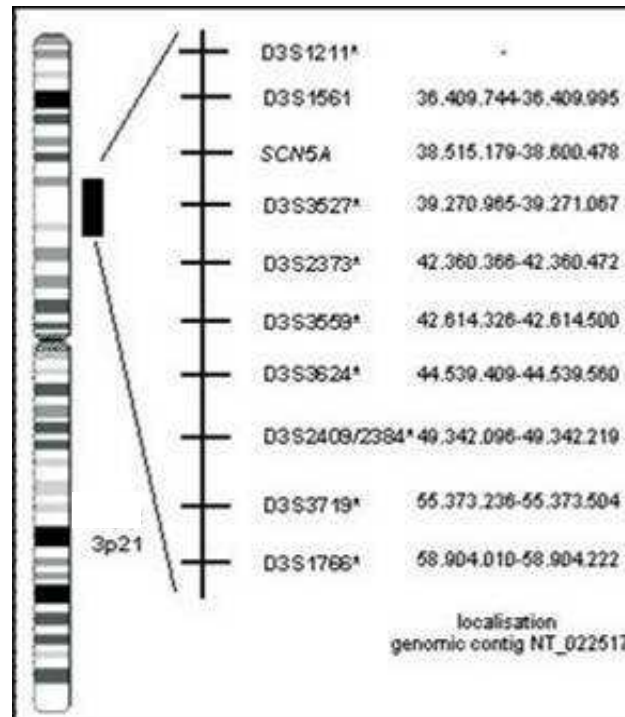
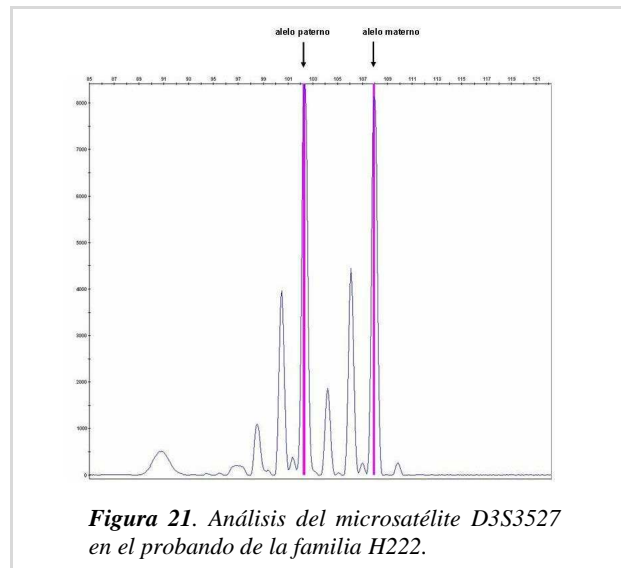


Figura 20. Localización de los marcadores microsatélites para el síndrome de Brugada.

La muestra una vez amplificada se introduce en el analizador ABI3130 para la electroforesis capilar y el posterior análisis de fragmentos. Para ello se mezcla 1 μ L de producto de amplificación con 12 μ L de formamida Hi-Di y 0,5 μ L del marcador de tamaño LIZ-500 (Gene Scan- 500 LIZ Size Standard. Part.Nº 4322682) y se calienta durante 5 minutos a 95°C.

Los datos obtenidos se analizan mediante el software Genemapper v 4.0, facilitado por Applied Biosystems. Cada microsatélite amplificado se repite un número de veces determinado en el alelo paterno y materno y se representa mediante un pico (Figura 21). Dependiendo del número de repeticiones obtendremos un pico con mayor o menor tamaño.



10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS VARIANTES NUEVAS. ESTUDIOS IN SILICO

10.1. Identificación de posiciones conservadas

Se realizó un alineamiento con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) de distintas especies de mamíferos y entre las distintas isoformas del canal de sodio dependiente de voltaje para identificar el grado de conservación de los aa en los que detectamos una variante.

Para determinar la posibilidad de que una variante fuera patógena también se tuvo en cuenta la localización en la proteína, si una variante se encuentra en una zona importante para el funcionamiento de la proteína, como zonas de selectividad iónica y región formadora del poro es más probable que la alteración sea causante de la enfermedad.

10.2. Propiedades de los aminoácidos

La forma en la que más comúnmente se clasifican los aa es según la polaridad de su cadena lateral. Distinguiríamos 3 tipos de grupo lateral: no polar, polar sin carga y polar con carga.

El índice hidropático nos proporciona una medida de la afinidad de los distintos aminoácidos a ambientes acuosos. Otro parámetro utilizado para medir a nivel bioquímico las similitudes entre aa es la distancia de Grantham, que tiene en cuenta la composición, el volumen y la polaridad.

10.3. Estudio de variantes de cambio de sentido

Actualmente se encuentran disponibles en la red multitud de programas bioinformáticos con los que predecir el efecto patógeno de una variante no descrita en la bibliografía. Cuando detectamos una mutación de cambio de sentido utilizamos dos programas de predicción:

1. **Pmut** (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/wholeHelp.htm>). Predice un valor mayor que 0.5 como patológico, variando la fiabilidad entre 0 (fiabilidad baja) y 9 (altamente fiable).
2. **Polyphen2** (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Calcula las diferencias entre la variante salvaje y la mutante asignándole un determinado valor, éste varía entre: >2 (afecta a la función y estructura de la proteína), 1,5-2 (posiblemente perjudicial) y <1,5 (benigna).

10.4. Estudio de variantes intrónicas

Los programas de identificación de sitios donadores y aceptores de “splicing” y proteínas intervinientes, que ayudan a predecir al efecto de una nueva mutación en el “splicing” asignando un valor determinado a la probabilidad de que la posición estudiada esté en un sitio aceptor o donador. Los programas utilizados son:

1. **ESEFinder**
(<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>)
2. **Netgene2 v2.4** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)
3. **Splice Site Prediction by Network (NNS)**
(http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estandar (DS) para expresar diferencias de edad y tiempo de seguimiento entre portadores y no portadores de mutación y entre varones y mujeres. Los datos mostraban una distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnov, por lo que se realizaron las pruebas T-student y Chi-cuadrado. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa estadístico SPSS para Windows (v.15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

De los 93 pacientes incluidos en este estudio 17 de ellos son procedentes del Hospital Universitario General de Alicante. Se desconocen las variables demográficas e historia clínica de dichos pacientes por lo que sólo se han incluido en el análisis de resultados respecto al diagnóstico genético. Las variables clínicas de los 76 pacientes que restan vienen indicadas en la tabla 9.

La media de edad fue de $41,8 \pm 13,7$ años. Cuarenta y tres pacientes (56,6%) presentaron un ECG espontáneo tipo I y 4 lo presentaron relacionado con un episodio febril (Figura 22), 2 presentaron un ECG basal tipo II, 1 tipo III y 1 paciente tipo II-III. Treinta y nueve pacientes eran asintomáticos (51,3%) y llevaban una vida normal. Veintidos de los pacientes (28,9%) tuvieron por lo menos 1 episodio sincopal (en 9 de ellos se consideró relacionado con Brugada) y 9 (11,8%) de probable origen cardiogénico-arrítmico (rango 1-15 episodios, la mediana es de 4,3 síncope por individuo). Ninguno de los holters de los 31 realizados demostró arritmias ventriculares. El estudio electrofisiológico (EEF) se realizó en 26 pacientes (34,2%) de los cuales en 5 casos (19,2%), resultó anormal.

Cinco de los casos índices (5,3%) tenían antecedentes familiares de muerte súbita. De 51 casos a los que se les realizó el test farmacológico (con flecainida o procainamida) en 46 (90,2%) de ellos fue positivo (en 29 de los cuales fue motivo de diagnóstico) y en 2 casos la prueba no fue concluyente, aunque previamente si presentaron ECG tipo I.

Nueve de los pacientes (11,8%) llevan implantado un desfibrilador automático implantable (DAI). En un período de seguimiento de $26,7$ meses $\pm 24,7$ recibieron una descarga 2 de ellos.

En cuanto a la población pediátrica, dos de nuestros casos índices tenían menos de 16 años (2,6%). Los dos tuvieron presíncope y un episodio convulsivo respectivamente, ambos relacionados con un estado febril, recomendándose en el primer caso la administración de quinidina para retrasar la implantación de un DAI.

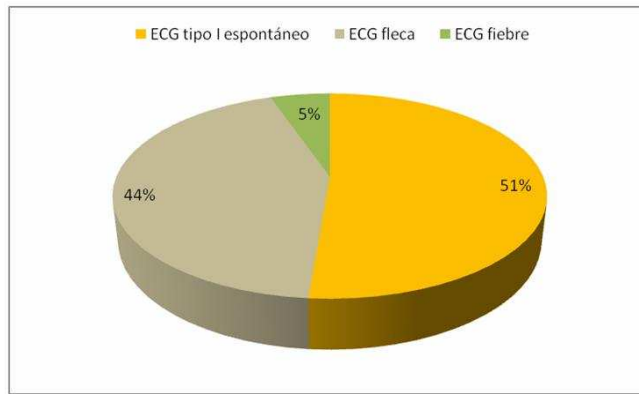


Figura 22. Representación de pacientes con ECG tipo I.

Tabla 9. Características clínicas de los pacientes, indicando tipo de ECG, resultados del test de provocación farmacológico, estudio electrofisiológico (EEF) y tratamiento.

Características clínicas	
Sexo varón	65 (85,5%)
Edad	41,8±13,7
ECG basal tipo III	1 (1,3%)
ECG basal tipo II	2 (2,6%) (+1 tipo II-III)
ECG tipo I espontáneo	43 (52,6%)
Presentación cuadro febril	4 (5,3%)
Asintomáticos	39 (51,3%)
Síncope	10 (13,2%)-cardiogénicos, 22 (29%)-vasovagales/no sugestivos
MS	3 (3,9%)
Historia familiar MS	5 (6,6%)
Test de provocación (N=51)	
Fleca +	46 (90,2%)
Fleca -	3 (5,9%)
No posible/realizado	26 (51%)
Posible/Dudoso	2 (3,9%)
EEF (N=26)	
Arritmias ventriculares	5 (19,2%)
Tratamiento	
DAI	9 (11,8%)
Quinidina	1 (recomendado)
Motivo de diagnóstico	
Casual	54 (71,0%)
Síntomas	18 (23,6%)

El grupo de pacientes varones suma 65 (85,5% de la población) y 11 el de mujeres (14,5%). La edad media de presentación de la enfermedad en el grupo de varones fue de 39,3 años y en el de mujeres fue significativamente mayor (48,1 años) ($p=0,04$). En el caso de los varones, 17 de ellos (26,2%) fueron diagnosticados por síntomas. En el grupo de mujeres 5 de las 11 (45,5%) sometidas a estudio fueron diagnosticadas por síntomas ($p=0,192$). El ECG basal tipo I se detectó en el 57,9% de los varones y en el 42,1% de las mujeres ($p=0,81$). Se realizaron 26 EEF, en 3 mujeres, de los cuales ninguno fue positivo, y en 23 varones estudiados, en los que en 5 se indujeron arritmias ventriculares (21,7%) ($p=0,625$).

Respecto a la tasa de eventos, 3 varones (4,6%) presentaron un episodio de MS con una edad media de $37,3 \pm 9,1$ años, siendo en los 3 casos el motivo del diagnóstico. Seis de los varones sufrieron un síncope de origen cardiogénico (9,2%) y 4 de las mujeres (36,4%) ($p=0,087$). Nueve de los varones llevan implantado un DAI y 2 de las mujeres, 2 varones sufrieron una descarga durante un tiempo de seguimiento de $27,1 \pm 19,2$ meses. Los datos referentes a la comparativa entre varones y mujeres vienen indicados en la tabla 10.

Tabla 10. Comparativa clínica entre hombres y mujeres

	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Significancia (p<0,05)</i>
<i>Nº de pacientes</i>	65 (85,5%)	11 (14,5%)	-
<i>Edad de presentación</i>	39,3 ± 13,3	48,1± 11,8	0,044
<i>Síntomas</i>	17 (26,2%)	5 (45,5%)	0,192
<i>ECG espontáneo</i>	33 (57,9%)	5 (42,1%)	0,81
<i>Presencia de FA</i>	1 (FA paroxística) (1,5%)	1 (FA persistente) (9,1%)	0,148
<i>Inducibilidad de arritmias en el EEF</i>	5 (21,7%. N=23)	0 (0%. N=3)	0,625
<i>Síncope previo</i>	6 (9,2%)	4 (36,4%)	0,087
<i>Presíncope</i>	3 (4,6%)	2 (18,2%)	0,002
<i>MS o FV</i>	3 (4,6%)	1 (9,1%)	0,539
<i>DAI</i>	8 (12,3%)	1 (9,1%)	0,594
<i>Eventos durante el seguimiento</i>	2 (22,2% ptes. Con DAI)	0	0,55
<i>Tiempo de seguimiento (meses)</i>	27,1 ± 19,2	34,3 ± 32,7	0,308

2. SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL GEN SCN5A

Se han detectado 30 variantes génicas distintas en 32 pacientes, de los cuales 24 son conocidas. Veintidós de las alteraciones de secuencia son polimorfismos, 19 conocidos y 2 de ellos con efecto funcional o modulador demostrado (R1193Q y H558R). Encontramos 2 variantes intrónicas de significado incierto, IVS8+21c>t y IVS14-17t>a.

De las 8 mutaciones encontradas (detalladas en la Tabla 11) 5 (62,5%) de ellas están descritas en la bibliografía, aunque en 3 casos ha sido muy recientemente, por lo que fueron estudiadas como variantes nuevas en el momento de su hallazgo. Respecto a la localización de las mutaciones (Figura 23), 2 de ellas se localizan en el extremo N-

terminal, 1 en el “loop” de unión entre los dominios DII-DIII y 5 en la zona transmembrana, 4 de ellas en la zona de selectividad iónica pero en distintos dominios de la proteína. Todas ellas menos una, que codifica para un codón de parada prematura, producen un cambio de sentido (“missense”):

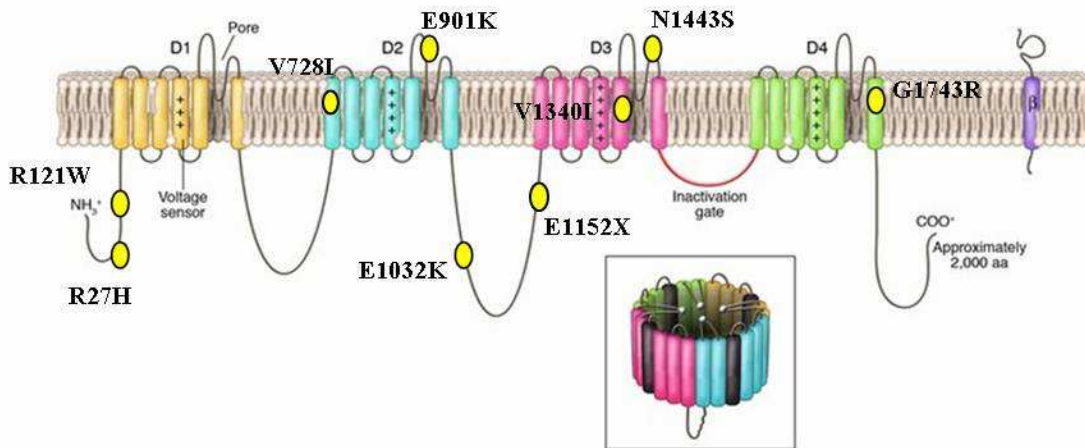


Figura 23. Representación de la estructura del canal de sodio en la membrana plasmática. Vienen indicados los 4 dominios con 6 segmentos transmembrana cada uno de la subunidad α y una subunidad accesoria β .

1. La mutación R27H localizada en el exón 2 de la región codificante del gen y situada en el extremo N-terminal de la proteína. Esta mutación fue descrita por el grupo de Priori en 2002 (Priori *et al.* 2002).

2. La mutación R121W se encuentra en el exón 3, localizada en la extremo N-terminal en una región muy conservada tanto entre especies como entre isoformas. En el momento en que se detectó la variante no era conocida, con lo que se optimizó el amplicón en el dHPLC y se analizaron 200 alelos de controles sanos sin detectarse la alteración.

3. La alteración V728I se detectó en el exón 14, en la región DII S1. Se encuentra en la base de datos de arritmias hereditarias (<http://www.fsm.it/cardmoc/>) como polimorfismo, aunque hasta la fecha el estudio no ha sido publicado por el grupo italiano de Priori. Se encuentra en una región muy conservada entre especies aunque el cambio de aa no es importante puesto que ambos son apolares-alifáticos y con un índice hidropático similar. Conseguimos optimizar por el dHPLC el amplicón y pasamos 200 alelos de controles sanos sin hallarlo en ninguno. La hemos considerado como probablemente patogénica.

4. Se ha detectado la mutación E901K en el exón 16, descrita recientemente por el grupo de Kappliger como mutación (Kapplinger *et al.* 2010). Esta alteración se localiza en el DII S5-S6 correspondiente a la zona de selectividad iónica, por lo tanto vital para el correcto funcionamiento de la proteína, además está localizada en una zona altamente conservada entre especies. También se optimizó para la técnica de dHPLC y se analizaron los 200 alelos sin detectar tampoco dicha mutación.

5. La variante E1032K se encuentra en el “loop” de unión DII-DIII. El alineamiento entre especies muestra que el aa en cuestión no es altamente conservado y el cambio de aa que se produce es de propiedades similares, aunque el glutamato tiene carga negativa y la lisina positiva, y ambos con afinidad a ambientes acuosos. En los estudios bioinformáticos con los programas “Polyphen2” y “Pmut” resulta una variante con predicción no patogénica o benigna. No parece importante para el funcionamiento del canal por lo que la hemos considerado como polimorfismo.

6. Se ha identificado una alteración que provoca un codón de parada prematuro, E1152X, en el exón 19. Se encuentra en el “loop” de unión entre los dominios DII-DIII. Esta variante génica produce una proteína truncada afuncional que no llegaría a membrana, con la consiguiente reducción de corriente de sodio por efecto “dosis” que disminuye el número de proteínas funcionales en la membrana plasmática.

7. La variante V1340I fue detectada también en uno de nuestros casos índice. Se encuentra en el S5 del DIII, como mencionamos antes los segmentos S5 y S6 de cada dominio son de vital importancia en la selectividad iónica del canal, además de localizarse en una posición altamente conservada entre especies. Posteriormente a nuestro análisis fue publicada como mutación en el trabajo de Samani *et al.*

8. El cambio N1443S fue detectado en el exón 25 de otro caso índice, se encuentra en una región muy conservada entre especies e isoformas del canal. Además se localiza también en la zona de selectividad iónica del DIII. Es por tanto posiblemente patogénica.

9. Por último la mutación ya descrita en la literatura G1743R fue detectada en 2 de los casos índices estudiados. Se encuentra en el S6 del DIV. Representa una variante defectuosa al tránsito a membrana que se consigue rescatar con mexiletina.

Tabla 11. Relación de mutaciones detectadas en nuestra serie, indicando efecto (“missense”= cambio de sentido”nonsense” codón de parada prematura), estado (conocida/no conocida).* Posible polimorfismo poco común.

<i>Cambio nucleótido</i>	<i>Cambio aminoácido</i>	<i>Efecto</i>	<i>Estado</i>	<i>Localización en la proteína</i>	<i>Mecanismo funcional /fisiológico</i>	<i>Referencia</i>
g80a	R27H	missense	conocida	N-terminal	Desconocido	Priori et al 2002
c363t	R121W	missense	conocida	N-terminal	Desconocido	Kapplinger et al. 2010
g2182a	V728I	missense	nueva	DII S1	Desconocido	Este estudio
g2703a	E901K	missense	conocida	DII-S5/S6	Desconocido	Kapplinger et al. 2010
g3094a	E1032K*	missense	nueva	DII-DIII	Desconocido	Este estudio
g3451t	E1152X	nonsense	nueva	DII-DIII	Truncamiento o prematuro de la proteína	Este estudio
g4012a	V1340I	missense	conocida	DIII-S5	No aclarado	Samani et al. 2009
a4328g	N1443S	missense	nueva	DIII-S5-S6	Desconocido	Este estudio
g5227a	G1743R	missense	conocida	DIV/S6	Defecto del tránsito a membrana	Valdivia et al. 2004

Tabla 12. Portadores de mutación.

Total	93
Positivos	10 (10,7%)
Edad (años)	41,0 ± 15,3
Rango de edad (años)	21-71
Varones	79
Varones positivos	10 (12,7%)
Mujeres	14
Mujeres positivo	0 (0,0%)

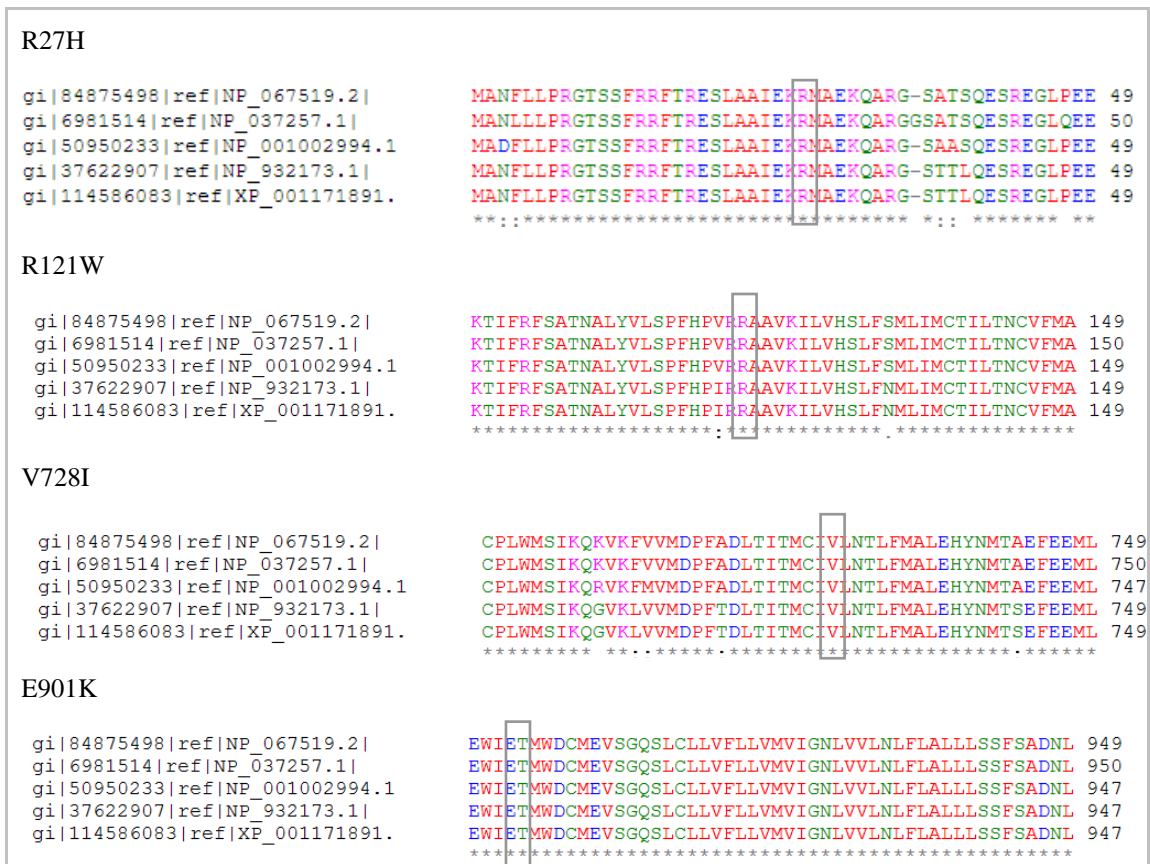
De un total de 93 casos índices, se ha encontrado una variante causal en 10 probandos (10,7%). Los pacientes citados tenían una edad promedio de 41,0±15,3 años,

el rango de edades se sitúa entre los 21 y 71 años. Todas las variantes patógenas encontradas en nuestra población fueron detectadas en pacientes varones, lo cual supone un 12,7% de la población de varones y sólo un 10,7% de la población total (Tabla 12).

3. ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DE LAS ALTERACIONES ENCONTRADAS. ESTUDIOS IN SILICO

3.1. Alineamiento entre especies e isoformas

A continuación se muestra el alineamiento por el programa ClustalW2 entre especies del gen SCN5A resaltando las posiciones donde se ha detectado la mutación de tipo “missense” (Figura 24). Por orden de aparición: gi|84875498|ref|NP_067519.2|[Mus musculus], gi|6981514|ref|NP_037257.1|[Rattus norvegicus], gi|50950233|ref|NP_001002994.1|[Canis lupus familiares], gi|37622907|ref|NP_932173.1|[Homo sapiens], gi|114586083|ref|XP_001171891.1|[Pan troglodytes].



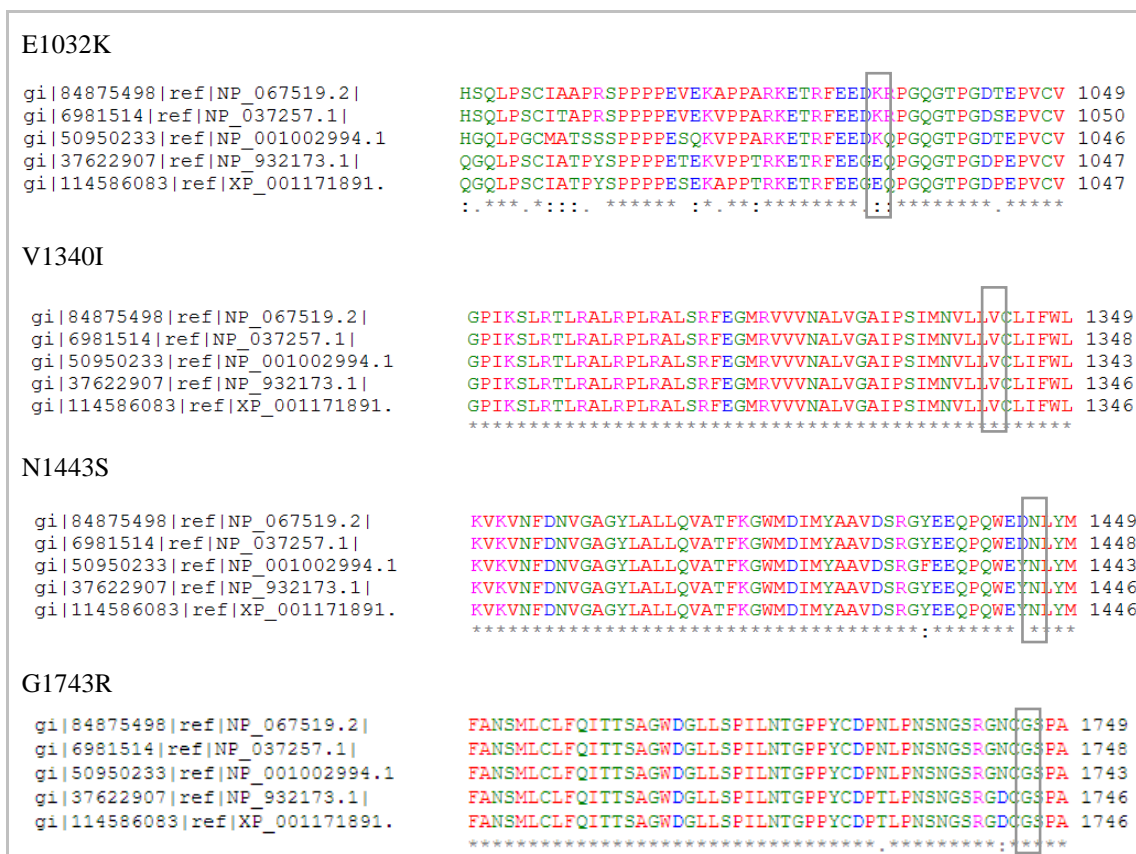


Figura 24. Alineamiento entre especies del canal de sodio cardíaco. La alineación muestra distintos símbolos en cada columna dependiendo del grado de conservación observado: "*" los residuos o nucleótidos en aquella columna son idénticos en todas las secuencias alineadas. ":" el cambio observado es conservado, en función del código de colores que se muestra. "." el cambio observado es semi-conservado, según el código de colores que se muestra. El código de colores sigue una norma en función de criterios físicoquímicos: AVFPMILW en rojo (son pequeños e hidrofóbicos (incluidos -Y aromáticos), DE en azul (son ácidos), RK magenta (son básicos), STYHCNGQ en verde (son Hydroxyl + sulfhydryl + amine + G).

El siguiente alineamiento se realizó entre isoformas del canal de sodio en humano con el programa ClustalW2 (Fig.25) : gi|260166633NP_001159435.1 type 1, gi|37622907|ref|NP_932173.1| type 5 gi|93141210|ref|NP_066287.2| type 2, gi|126362949|ref|NP_008853.3| type 3, gi|93587342|ref|NP_000325.4| type 4, gi|111378393|ref|NP_002967.2| type 7, gi|7657544|ref|NP_055006.1| type 8, gi|4506813|ref|NP_002968.1| type 9 (no se ha incluido la isoforma 6 por no hallarse la secuencia completa de la proteína en la base de datos de referencia del NCBI).

R27H

```
gi|37622907|ref|NP_932173.1| MAN---FLLPRGTSSFRFRFTRESLAAIEKRYAEKQARGSTTLQESREGL 46
gi|93587342|ref|NP_000325.4| MARPSLCTLVPLGPECLRPFTRESLAAIEQRAVEEEAR----LQRNKQME 46
gi|93141210|ref|NP_066287.2| MAQS---VLVPPGPDSEFRFFTRRESLAAIEQRIAEKAKRKPQER---KDE 44
gi|126362949|ref|NP_008853.3| MAQA---LLVPPGPESEFRLFTRESLAAIEKRAAEKAKKPKKE----QDN 43
gi|260166633|ref|NP_001159435. MEQT---VLVPPGPDSEFNFFTRRESLAAIEKRIAEKAKNPKPD---KKD 43
gi|7657544|ref|NP_055006.1| MAAR---LLAPPGPDSEFKPFTRESLANIERRIAESKLLKPPKADGSHRED 47
gi|4506813|ref|NP_002968.1| --MA---MLPFPGPQSFVHFTKQSLALIEQRIAEKSKPEKKE---KKD 41
gi|111378393|ref|NP_002967.2| -----MLASPEPKGLVPFTKESFELIKQHIKAKTHNED----- 32
      * . . . : ** **: *::: .: . .
```

R121W

```
gi|37622907|ref|NP_932173.1| LNKGKTI FRFSATNALYVLSPFHPIARAARKILVHSLFNMLIMCTILTNC 145
gi|93587342|ref|NP_000325.4| LNKGAIFRFSATPALYLLSPFSVVARGAIKVLIHALFSMFIMITILTNC 145
gi|93141210|ref|NP_066287.2| LNKGAISRFSATPALYILTFFNPPIKLAIKILVHSLFNMLIMCTILTNC 143
gi|126362949|ref|NP_008853.3| LNKGKAI FRFSATNALYILTPLNPVKKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNC 142
gi|260166633|ref|NP_001159435. LNKGAIFRFSATSALYILTFFNPPLKKAIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNC 142
gi|7657544|ref|NP_055006.1| LNRGKTLFRFSATPALYILSPFNLIARRIAIKILIHVSFMIIMCTILTNC 146
gi|4506813|ref|NP_002968.1| LNKGKTI FRFNATPALYMLSPFSPLARRISIKILVHSLFSMLIMCTILTNC 140
gi|111378393|ref|NP_002967.2| LNKNRTIFRFNAASILCTLSPFNCRRTTKVLVHPFFQLFILISVLIDC 132
      *: .: .: .: ** *: * *: * : : : : : ** : * . * : * :
```

V728I

```
gi|37622907|ref|NP_932173.1| IKQGVKLVVMDPFDLITMCTIVLNTLFMALEHYNMTSEFEEMLQVGNLV 755
gi|93587342|ref|NP_000325.4| FKNIIHLIVMDPFVLDGITICIVLNTLFMAMEHYPMTEHFNDVLTVGNLV 616
gi|93141210|ref|NP_066287.2| VKHLVNLVMDPFVDLAIITICIVLNTLFMAMEHYPMTEQFSSVLTVGNLV 797
gi|126362949|ref|NP_008853.3| VKHLVNLVMDPFVDLAIITICIVLNTLFMAMEHYPMTEQFSSVLTVGNLV 798
gi|260166633|ref|NP_001159435. VKHVNLVMDPFVDLAIITICIVLNTLFMAMEHYPMTEHFNDVLTVGNLV 806
gi|7657544|ref|NP_055006.1| LKEIVNLVMDPFVDLAIITICIVLNTLFMAMEHHPMTQFEHVLAVGNLV 791
gi|4506813|ref|NP_002968.1| FKKCIYFIVMDPFVDLAIITICIVLNTLFMAMEHHPMTEEFKNVLAIGNLV 771
gi|111378393|ref|NP_002967.2| LKEFVHRIIMAPFDLFLIICIIINVCFLTEHYPMKQNTLLNIGNLV 543
      . * . : : * * * * : : * * . * : : * * * * * : * . . : * : * * * *
```

E901K

```
gi|37622907|ref|NP_932173.1| VGMQLFGKNYSELRD--SDSGLLPRWHMDFHFAFLIIFRILCGEWIETM 903
gi|93587342|ref|NP_000325.4| VGMQLFGKSYKECVCKIALDCNLPWHMDFHFSFLIVFRILCGEWIETM 766
gi|93141210|ref|NP_066287.2| VGMQLFGKSYKECVCKISNDCELPRWHMDFHFSFLIVFRVLCGEWIETM 947
gi|126362949|ref|NP_008853.3| VGMQLFGKSYKECVCKINDDCTLPWHMDFHFSFLIVFRVLCGEWIETM 948
gi|260166633|ref|NP_001159435. VGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRWHMDFHFSFLIVFRVLCGEWIETM 956
gi|7657544|ref|NP_055006.1| VGMQLFGKSYKECVCKINQDCCELPRWHMDFHFSFLIVFRVLCGEWIETM 941
gi|4506813|ref|NP_002968.1| VGMQLFGKSYKECVCKINDDCTLPWHMDFHFSFLIVFRVLCGEWIETM 921
gi|111378393|ref|NP_002967.2| FGMKLFGKNYEEFVCHIDKDCQLPRWHMDFHFSFLNVFRILCGEWIETL 693
      . * * : * * * * * . : . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

E1032K

```
gi|37622907|ref|NP_932173.1| CIATPYSPPPPTEKVPPTKETFEEGEQPGQTPGDPEPVCVPIAVAE 1053
gi|93587342|ref|NP_000325.4| LGEADGAGEAGEGETAPE-----DEKKEPPEEDLKKDNHILNHMGLAD 901
gi|93141210|ref|NP_066287.2| KKDSCISNHTT-----IEIGKDLNLYLKDNGTTSIGI--SSV 1082
gi|126362949|ref|NP_008853.3| KIDSCMSNNTG-----IEISKELNLYLDNGTTSIGVGTGSSV 1080
gi|260166633|ref|NP_001159435. KKDSCMSNHT-----AEIGKDLNLYLDVNGTTSIGIETGSSV 1092
gi|7657544|ref|NP_055006.1| KKANCIANHTG-----ADIHRNGDFQKNGTTSIGI--SSV 1074
gi|4506813|ref|NP_002968.1| KKENYISNHTL-----AEMSKGHNFLKE-KDKISGFG--SSV 1055
gi|111378393|ref|NP_002967.2| HTLSELSNTQD-----FLKDKK-----SSG 813
      :
```

V1340I

```
gi|37622907|ref|NP_932173.1| TLRALRPLRALS RFEGMRVVVNALVGAIPIIMNVLLVCLIFWLIFSIMGV 1353
gi|93587342|ref|NP_000325.4| TLRALRPLRALS RFEGMRVVVNALVGAIPIIMNVLLVCLIFWLIFSIMGV 1179
gi|93141210|ref|NP_066287.2| TLRALRPLRALS RFEGMRVVVNALVGAIPIIMNVLLVCLIFWLIFSIMGV 1356
gi|126362949|ref|NP_008853.3| TLRALRPLRALS RFEGMRVVVNALVGAIPIIMNVLLVCLIFWLIFSIMGV 1354
gi|260166633|ref|NP_001159435. TLRALRPLRALS RFEGMRVVVNALVGAIPIIMNVLLVCLIFWLIFSIMGV 1366
gi|7657544|ref|NP_055006.1| TLRALRPLRALS RFEGMRVVVNALVGAIPIIMNVLLVCLIFWLIFSIMGV 1346
gi|4506813|ref|NP_002968.1| TLRALRPLRALS RFEGMRVVVNALVGAIPIIMNVLLVCLIFWLIFSIMGV 1329
gi|111378393|ref|NP_002967.2| SMKFLRPLRVLSQFERMKVVVVALIKTTLPNTLVVFLVCLMIWLIFSIMGV 1077
      : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```



Figura 25. Alineamiento de las distintas isoformas del canal de sodio en la especie humana. (El criterio de análisis es igual al del alineamiento anterior).

A continuación se muestra una tabla resumen con las posiciones estudiadas y su grado de conservación según especies e isoformas (Tabla 13).

Tabla 13. Grado de conservación entre especies e isoformas en posiciones de alteraciones no conocidas.

Variante	Alineamiento entre especies	Alineamiento entre isoformas
R27H	Igual entre especies	Conservado
R121W	Igual entre especies	Conservado
V728I	Igual entre especies	Conservado
E901K	Igual entre especies	Igual entre isoformas
E1032K	Conservado	Semi-conservado
V1340I	Igual entre especies	Igual entre especies
N1443S	Igual entre especies	Semi-conservado
G1743R	Igual entre especies	Igual entre especies

3.2. Mutaciones de cambio de sentido

Todas las mutaciones detectadas menos una son de tipo “missense”. Las mutaciones de cambio de sentido o “missense” son causadas por el reemplazo de un aa por otro. La importancia del cambio dependerá de si los aa que se intercambian son más o menos parecidos, de la región de la proteína que se trate y de si la región en la que se encuentren está más o menos conservada entre especies e isoformas.

3.2.1. Propiedades de los aminoácidos

En la tabla 14 se muestra una comparativa de los índices hidropáticos y la distancia de Grantham de los aa de las variantes nuevas encontradas. El índice hidropático indica el grado de afinidad a ambientes acuosos de los aa implicados.

Tabla 14. Comparación de propiedades hidropáticas del aminoácido salvaje frente al mutado.

<i>Cambio de aminoácido</i>	<i>#Distancia de Grantham</i>	<i>*Polaridad / Índice hidropático</i>	<i>Polaridad / Índice hidropático</i>
		<i>aminoácido salvaje</i>	<i>aminoácido mutante</i>
R > H	86	Básico	Básico
R > W	101	Básico (+) / -4,5	Aromático / -0,9
V > I	29	Apolar-alifático / -4,2	Apolar-alifático / -4,5
E > K	56	Acídico (-) / -3,5	Básico (+) / -3,9
N > S	46	Polar-sin carga / -3,5	Polar-sin carga / -0,8
G > R	125	Hidrofóbico	Básico

* Escala que combina la hidrofobicidad y la hidrofiliidad; puede utilizarse para predecir qué aminoácidos se encontrarán en ambientes acuosos (valores negativos) y cuales en un ambiente hidrofóbico (valores positivos). # El índice de Grantham es una medida de la disparidad entre los aa, tiene en cuenta, el volumen, el peso, la polaridad y la composición de carbono. Los cambios de aa con un valor de la distancia de Grantham entre 5–60 se consideran “conservadas”, entre 60-100 “no conservadas” y > 100 “radicales” (Tavtigian et al. 2008).

3.2.2. Programas de predicción de patogenicidad

- **Pmut.** Los resultados del análisis con el programa Pmut vienen resumidos en la tabla 15.

Tabla 15. Predicción de patogenicidad del programa Pmut.

<i>Salvaje</i>	<i>Mutado</i>	<i>Posición</i>	<i>Fiabilidad*</i>	<i>Predicción</i>
R	H	27	2	Patogénica
R	W	121	8	Patogénica
V	I	728	9	Neutra
E	K	901	6	Patogénica
E	K	1032	2	Neutra
N	S	1443	2	Neutra
V	I	1340	6	Neutra
G	R	1743	6	Patogénica

*Los rangos de fiabilidad varían entre 0 (baja fiabilidad) y 9 (muy fiable.)

- **Polyphen2** (Polymorphism Phenotyping). Los resultados del análisis con el programa Polyphen2 vienen resumidos en la tabla 16.

Tabla 16. Predicción de patogenicidad del programa Polyphen. Los rangos de puntuación son: 0,6-1 (probablemente patogénica), 0,3-0,6 (posiblemente patogénica) y <0,3 (benigna).

<i>Salvaje</i>	<i>Mutante</i>	<i>Posición</i>	<i>Puntuación</i>	<i>Predicción</i>
R	H	27	0,996	Probablemente patogénica
R	W	121	0,998	Probablemente patogénica
V	I	728	0,632	Probablemente patogénica
E	K	901	0,962	Probablemente patogénica
E	K	1032	0,0	Benigna
N	S	1443	0,993	Probablemente patogénica
V	I	1340	0,903	Probablemente patogénica
G	R	1743	0,998	Probablemente patogénica

3.3. Mutaciones de codón de parada prematura

Encontramos en nuestro grupo de pacientes una única mutación de codón de parada prematura E1152X en el exón 19 del gen. Esta variante provoca un corte de la proteína entre los dominios DII y DIII, justo a la mitad del tetrámero.

3.4. Variantes intrónicas

Se han detectado 7 variantes intrónicas, cinco de ellas antes descritas en la literatura como polimorfismos, IVS2-25g>a, IVS2-24c>t, IVS9-3c>a, IVS10-24g>a y IVS16-6c>t, el resto no están descritas, IVS8+21c>t y IVS14-17t>a. Se han analizado las dos no descritas por tres programas bioinformáticas (Tabla 17-Figura 26-28) que dan información acerca de los sitios de corte y empalme y proteínas que intervienen en el procesamiento. Los programas de análisis ESEFinder y Netgene detectan un cambio entre los sitios identificados como aceptores y donadores entre la proteína salvaje y la mutante.

El programa ESEFinder detecta la desaparición del sitio de unión a las proteínas **SRp40** (IVS8+21c>t) y **SC35** (IVS14-17t>a) respectivamente pudiendo afectar al “splicing”. Las proteínas SRP (del inglés “Signal Recognition Particle”) son proteínas que reconocen ESEs (del inglés “Exonic Splicing Enhancers”) y se unen a ellas activando la maquinaria de corte y empalme.

El programa Netgene2 detecta una posición nueva en el sitio aceptor (263) en el caso de la variante IVS8+21c>t y una posición nueva en el sitio donador (64) en la variante IVS14-17t>a.

El programa NNS no detecta ninguna variación entre las dos proteínas, salvaje y mutante en ninguna de las dos variantes.

Tabla 17. Variantes intrónicas encontradas se analizan por programas de predicción de alteración del “splicing”

	<i>ESEFinder 3.0</i>	<i>Netgene2 v.2.4</i>	<i>NNS</i>
IVS8+21c>t	afecta	afecta	no afecta
IVS14-17t>a	afecta	afecta	no afecta

✓ Resultados del programa ESEFinder:

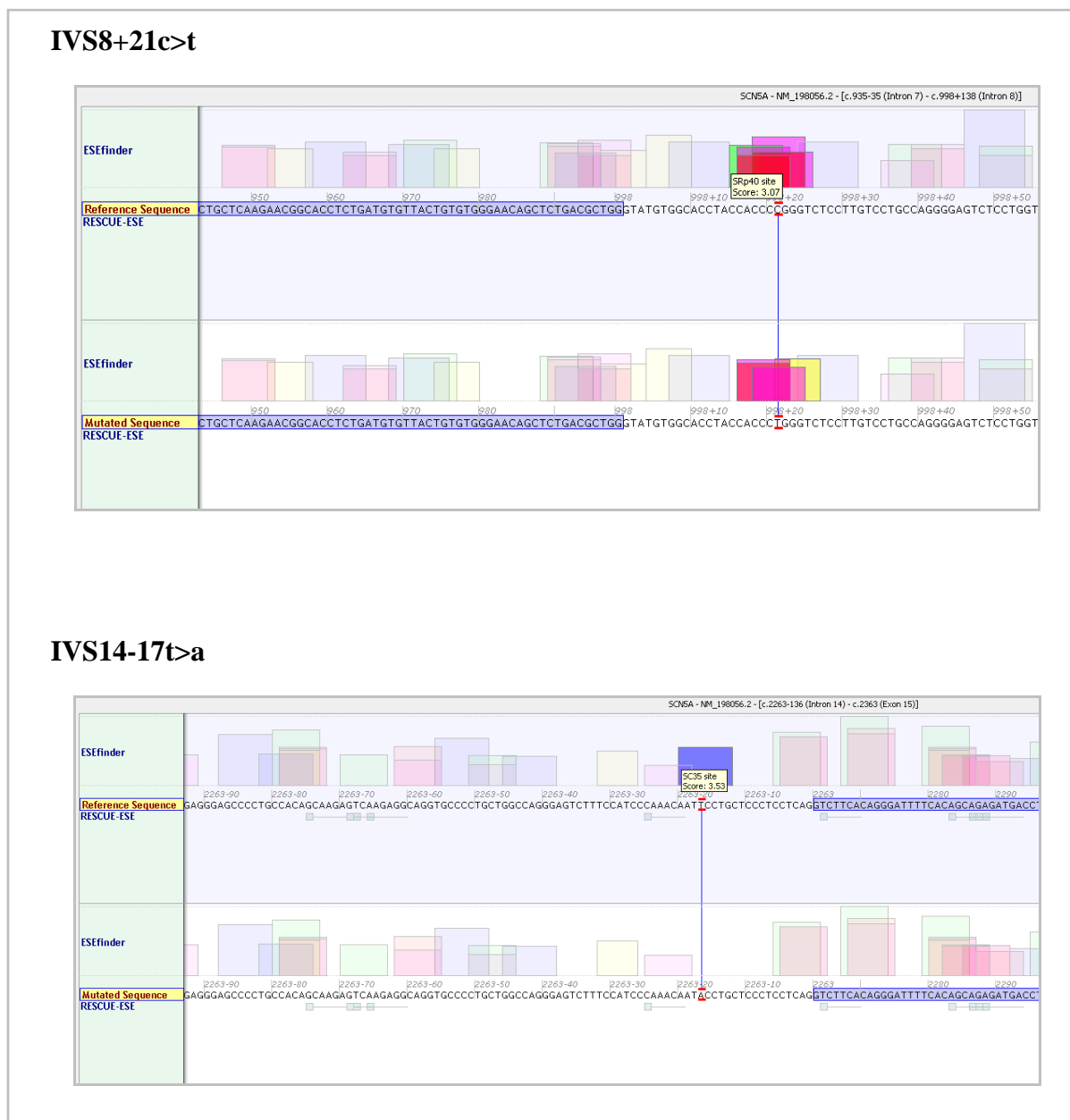


Figura 26. Resultados ESEFinder.

✓ Resultados programa Netgene:

IVS8+21c>t			
<i>WT</i> pos 5'→3'		<i>Acceptor splice sites, direct strand</i>	<i>Fiabilidad</i>
90		ACCTCCCCAG^AGCCCTGGAT	0.0
139		CCCTCACCAG^CATGATGTTT	0.18
158		TCTCTTACAG^AAAAATTACCT	0.96
175		CCTGCTCAAG^AACGGCACCT	0.2
321		CTGACCCCAG^GGACAGCGAG	0.0
<i>MUT</i> pos 5'→3'		<i>Acceptor splice sites, direct strand</i>	
90		ACCTCCCCAG^AGCCCTGGAT	0.0
139		CCCTCACCAG^CATGATGTTT	0.18
158		TCTCTTACAG^AAAAATTACCT	0.96
175		CCTGCTCAAG^AACGGCACCT	0.2
263		CCTGCTCAAG^AACGGCACCT	0.0
321		CTGACCCCAG^GGACAGCGAG	0.0
IVS14-17t>a			
<i>WT</i>		<i>Donor splice sites, complement strand</i>	<i>Fiabilidad</i>
pos 3'→5'	pos 5'→3'		
257	94	GTCCAGCCAG^GTACCAGGCG	0.0
<i>MUT</i>		<i>Donor splice sites, complement strand</i>	
pos 3'→5'	pos 5'→3'		
257	94	GTCCAGCCAG^GTACCAGGCG	0.0
64	287	GAGGGAGCAG^GTATTGTTTG	0.0

Figura 27. Resultados Netgene.

✓ Resultados programa NNS:

<i>Salvaje</i>				
Predicción del sitio donador				
Start	End	Score	Exon	Intron
216	230	0.83	acgctggg	t atgtgg
Predicción del sitio aceptor				
Start	End	Score	Intron	Exon
70	110	0.79	gtgaggtctccacctcccc	âg agccctggatgcaaggcgga
138	178	0.79	agcatgatgtttctcttac	âg aaaattacctgctcaagaac
243	283	0.57	cggtctccttgcctgcc	âg gggagtctcctggtgtttc
301	341	0.65	ctatttatgccctgacccc	âg ggacagcgaggccttctttt
339	379	0.81	tttgtctcccttacctgcc	âg gacccttccccagcttcccc
<i>Mutante</i>				
Predicción del sitio donador				
Start	End	Score	Exon	Intron
216	230	0.83	acgctggg	t atgtgg
Predicción del sitio aceptor				
Start	End	Score	Intron	Exon
70	110	0.79	gtgaggtctccacctcccc	âg agccctggatgcaaggcgga
138	178	0.79	agcatgatgtttctcttac	âg aaaattacctgctcaagaac
243	283	0.47	tgggtctccttgcctgcc	âg gggagtctcctggtgtttc
301	341	0.65	ctatttatgccctgacccc	âg ggacagcgaggccttctttt
339	379	0.81	tttgtctcccttacctgcc	âg gacccttccccagcttcccc
<i>IVS14-17t-a</i>				
<i>Salvaje</i>				
Predicción del sitio aceptor				
129	169	0.99	caattcctgctccctcctc	âg gtcttcacagggattttcac
139	179	0.90	tcctcctcagggtcttcac	âg ggattttcacagcagagatg
242	282	0.58	cagcatcatcgtcatectt	âg cctcatggagctgggcctgt
<i>Mutante</i>				
Predicción del sitio aceptor				
129	169	0.98	caatacctgctccctcctc	âg gtcttcacagggattttcac
139	179	0.90	tcctcctcagggtcttcac	âg ggattttcacagcagagatg
242	282	0.58	cagcatcatcgtcatectt	âg cctcatggagctgggcctgt

Figura 28. Resultados NNS.

3.5. Polimorfismos hallados. Frecuencia alélica

En total se detectaron 21 polimorfismos, 4 variantes nuevas y 17 conocidas, todas ellas repartidas a lo largo de la proteína (Tabla 18). Diez son sinónimas, 4 no sinónimas y 7 variantes intrónicas. Las variantes nuevas con efecto sinónimo detectadas, V232V y S667S, no se encuentran localizadas en regiones consenso* que puedan alterar el corte y empalme por lo que las hemos considerado no patológicas (*los cambios en el primer nucleótido o los dos últimos de cada exón podrían alterar el “splicing”).

Tabla 18. Relación de los polimorfismos hallados, indicando el efecto del cambio de nucleótido, estado, localización en la proteína y la bibliografía en la que se referencia.

<i>Cambio nucleótido</i>	<i>Cambio de aminoácido</i>	<i>Efecto</i>	<i>Estado</i>	<i>Localización en la proteína</i>	<i>Referencia</i>
g87a rs6599230	A29A	sinónimo	conocido	N-terminal	Aydin et al 2005
c100t rs6791924	R34C	cambio de sentido	conocido	N-terminal	Mank-Seymour 2006
IVS2-25g>a rs7636280	-	-	conocido	-	Millat et al 2009
IVS2-24c>t rs41258344	-	-	conocido	-	Millat et al 2009
IVS8+21c>t	-	-	Nuevo	-	Este estudio
c696a	V232V	sinónimo	Nuevo	DI-S4	Este estudio
c717t rs41285129	I239I	sinónimo	conocido	DI-S4/S5	Millat et al 2009
IVS9-3c>a rs41312433	-	-	conocido	-	Aydin et al 2005
c1302t rs41313699	F434F	sinónimo	conocido	DI/DII	Este estudio
IVS10-24g>a rs7428779	-	-	conocido	-	Aydin et al 2005

a1673g rs1805124	H558R	cambio de sentido	conocido	DI-DII	Chen et al 2007;
t1587c rs45624133	I529I	sinónimo	conocido	DI/DII	Millat et al 2009
c2001t	S667S	sinónimo	Nuevo	DI/DII	Este estudio
IVS14-17t>a	-	-	Nuevo	-	Este estudio
IVS16-6c>t rs41260344	-	-	conocido	-	Paulussen 2004
g2961c	Q987H	cambio de sentido	conocido	DII-DIII	Takahata 2003
g3183a rs7430407	E1061E	sinónimo	conocido	DII-DIII	Aydin et al 2005
g3578a rs41261344	R1193Q	cambio de sentido	conocido	DII-DIII	Arnestad et al 2007
g4218c	G1406G	sinónimo	conocido	DIII-S5-S6	Millat et al 2009
c4509t rs45548237	S1503S	sinónimo	conocido	DIII-DIV	Wattanasirichai goon et al 1999
t5457c rs1805126	D1819D	sinónimo	conocido	C-terminal	Chen et al. 2004

Se calcularon las frecuencias alélicas de cada polimorfismo destacando 4, tres variantes sinónimas, que aparecen con una frecuencia superior al 20% en nuestra población, en el exón 2 A29A, H558R en el exón 12, E1061E en el exón 17 y en el exón 28 la variante D1819D (Tabla 19). El polimorfismo del exón 12, H558R, con una frecuencia alélica del 34,1%, ejerce un efecto modulador en algunas mutaciones estudiadas y sólo se ha detectado en homocigosis en 3 familiares de los portadores de mutación. Este polimorfismo se ha estudiado con distintas mutaciones, modulando positivamente/negativamente su efecto e incluso permitiendo el tránsito a membrana de la proteína (tránsito defectuoso debido a una mutación). También esta asociado a una mayor frecuencia de fibrilación auricular.

Tabla 19. Frecuencia alélica de los polimorfismos hallados en nuestra serie.

<i>Exón</i>	<i>Polimorfismo</i>	<i>Presencia en n° de pacientes (Heterocigotos/Homocigotos)</i>	<i>Frecuencia alélica (Heterocigotos/Homocigotos)</i>
2	A29A	(17/31)	18,3/33,3
2	R34C	(2/0)	2,2/0
Intrón 2	IVS2-25g>a	(1/0)	1,1/0
Intrón 2	IVS2-24c>t	(1/0)	1,1/0
6	V232V	(1/0)	1,1/0
7	I239I	(2/0)	2,2/0
Intrón 8	IVS8+21c>t	(1/0)	1,1/0
Intrón 9	IVS9-3c>a	(11/0)	14,3/0
10	F434F	(2/0)	2,2/0
Intrón 10	IVS10-24g>a	(6/0)	9,9/0
12	H558R	(29/0)	34,1/0
12	I529I	(4/0)	6,6/0
	H558R+I529I	2/0	2,2/0
13	S667S	(1/0)	1,1/0
Intrón 14	IVS14-17t>a	(1/0)	1,1/0
Intrón 16	IVS16-6c>t	(1/0)	1,1/0
17	Q987H	(1/0)	1,1/0
17	E1061E	(20/22)	27,5/25,3
20	R1193Q	(1/0)	1,1/0
23	G1406G	(2/0)	2,2/0
26	S1503S	(2/0)	2,2/0
28	D1819D	(30/10)	51,6/12,1

4. TÉCNICA DHPLC. MÉTODO DE CRIBADO

Hemos detectado distintos polimorfismos o mutaciones en 15 de las regiones codificantes estudiadas. Cada región se intentó optimizar por la técnica de dHPLC para que se incluyera en el cribado de muestras y secuenciar únicamente las muestras con perfiles anómalos. Se ha conseguido la optimización de 9 de las 15 regiones codificantes (60,0%) que supone un ahorro del 29% de las regiones totales a secuenciar (Figura 29).

Los amplicones optimizados y la temperatura/s de elución vienen indicados en la tabla 20.

Tabla 20. Exones optimizados mediante la técnica dHPLC.

<i>Amplicón</i>	<i>Tipo de alteración</i>	<i>Variante</i>	<i>Tª óptima elución(°C)</i>
Exón 3	Mutación nueva	R121W	60,6-60,7-60,8
Exón 7	Polimorfismo	I239I	62,5
Exón 10	Variante intrónica	IVS9-3c>a	61,5-61,3
Exón 12	Mutación nueva- Polimorfismo	R620H*-H558R	64,3-63,9
Exón 13	Polimorfismo	S667S	64,5-64,6
Exón 14	Variante de significado incierto	V728I	62,5-62,6
Exón 16	Mutación conocida	E901K	61,8
Exón 23	Mutación conocida	V1340I	61,8
Exón 28.3	Polimorfismo	D1819D	61-61,2

* Mutación detectada en un paciente de miocardiopatía dilatada

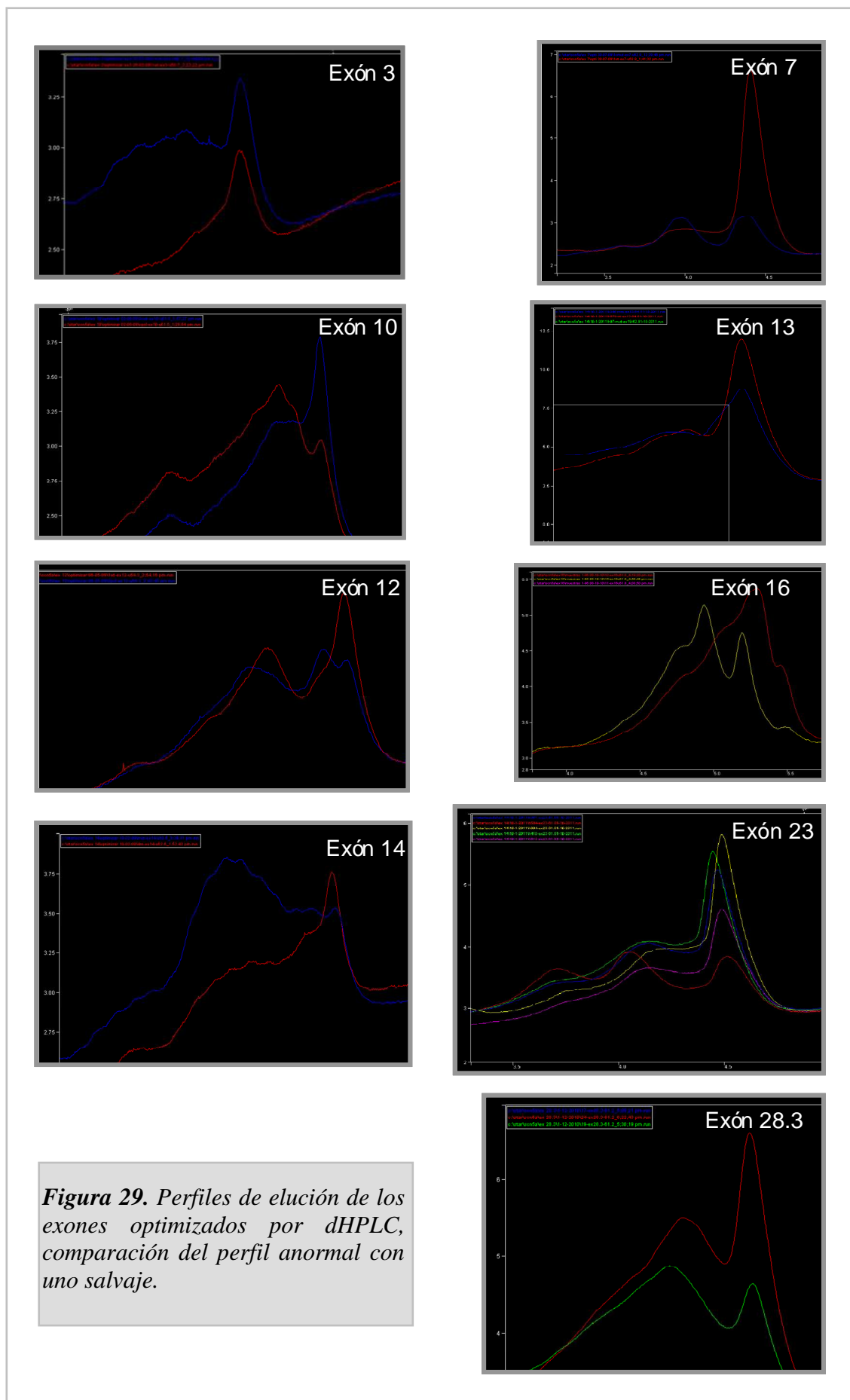


Figura 29. Perfiles de elución de los exones optimizados por dHPLC, comparación del perfil anormal con uno salvaje.

4.1. Comparación de la técnica dhplc vs. secuenciación

Fueron analizados los perfiles de elución de algunos de los pacientes incluidos en este estudio para los exones optimizados mediante dHPLC, y se determinó si se consideraban perfiles salvajes o anómalos (Tabla 21). Los comparamos con los resultados obtenidos en la secuenciación del canal de sodio para estudiar la sensibilidad y especificidad de la técnica de cribado utilizada, dHPLC.

Tabla 21. Estudio de la sensibilidad y especificidad de la técnica de dHPLC.

Exón	N	Nº perfiles anómalos	Nº variantes por secuenciación	FP	FN	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP	VPN
3	90	8	5	3	0	100	96,3	62,5%	100%
7	95	2	2	0	0	100	100	100%	100%
10	96	14	14	0	0	100	100	100%	100%
12	96	34	34	0	0	100	100	100%	100%
13	94	1	1	0	0	100	100	100%	100%
14	95	1	1	0	0	100	100	100%	100%
16	57	11	1	10*	0	100	82,1	9,1%	100%
23	36	1	1	0	0	100	100	100%	100%
28.3	41	19	18	1	0	100	95,6	94,7%	100%

* La detección de un elevado número de falsos positivos en el exón 16 es debido a la presencia de una repetición en tandem [CA]*n* (considerada polimorfismo (Wang et al. 1996)) al final del exón en las que varía el número de repeticiones. Se pudo confirmar mediante secuenciación sólo en algunos casos, por lo que se han determinado como falsos positivos por precaución.

Resulta obvio que lo ideal sería trabajar con pruebas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad, pero esto no siempre es posible. En general, las pruebas de cribado deben ser de alta sensibilidad para poder captar a todos los enfermos. La técnica de cribado escogida tiene una sensibilidad del 100% en los exones optimizados, sin presentar ningún falso negativo por lo que es muy eficaz en la detección de posibles alteraciones en los individuos a estudio.

5. GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS EN EL GEN SCN5A

Las muestras de 67 pacientes (71,3% de la población) en los que no se detectó ninguna mutación causal en el canal de sodio fueron analizados mediante la técnica de MLPA para la detección de posibles deleciones o duplicaciones en el gen. Se procesaron en tandas de 6 muestras más dos controles (siempre utilizando los mismos).

No se detectó ningún gran reordenamiento génico en el canal de sodio cardíaco. Los resultados se expresan como el valor de las áreas de cada pico normalizado con respecto a dos controles sanos, sin historia familiar de muerte súbita. En la figura 30 se muestran mediante diagrama de puntos los resultados de una muestra, todos los picos correspondientes a las sondas tienen un valor de área normalizado cercano a 1.

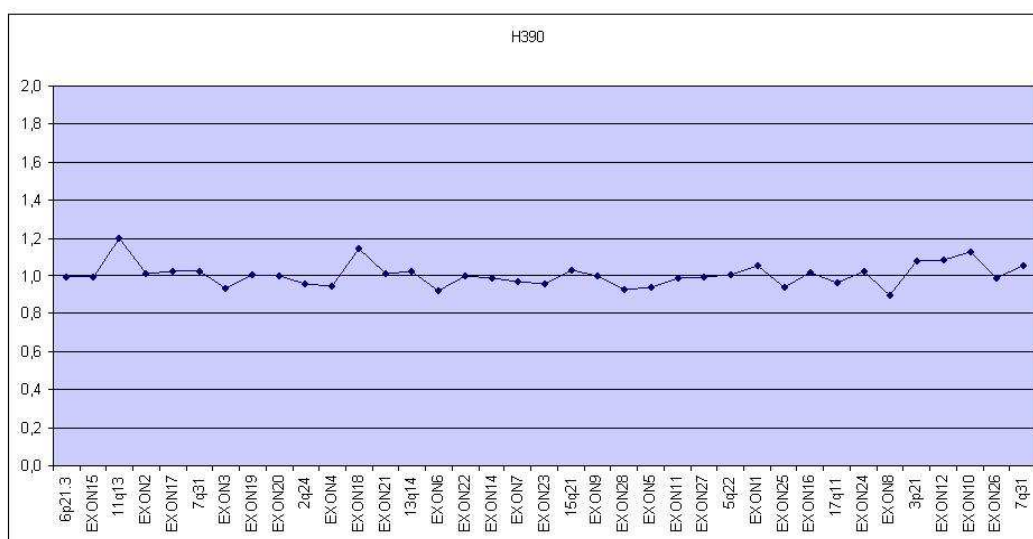


Figura 30. Representación gráfica de los resultados de la muestra H390.

6. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

6.1. Comparativa clínica, factores moduladores e historia familiar de portadores frente a no portadores

Se analizaron y compararon distintos parámetros clínicos en el grupo de portadores de alguna mutación (12), incluyendo probandos y familiares con ECG tipo I, frente al de no portadores (68), incluyendo probandos no portadores con ECG tipo I ya que ninguno de los familiares no portadores estaba afectado (Tabla 22). Ocho de los 12 portadores (66,9%) presentó un ECG basal diagnóstico frente a 36 del grupo de los no

portadores (52,9%) ($p=0,062$). La edad de presentación en los grupos fue: $39,5 \pm 14,5$ vs $40,5 \pm 13,9$ de portadores y no portadores respectivamente.

Ningún portador sufrió una MS aunque sí existen 5 casos de MS familiar (41,7%), en el grupo de no portadores hubo 3 casos de MS (4,4%) y 15 casos de MS familiar (22,1%) ($p=0,331$). En 4 de los portadores (33,3%) se realizó el diagnóstico gracias al test de provocación farmacológico frente a 32 de los no portadores (47,1%). Se produjo 1 caso de síncope de origen cardiogénico en el grupo de los portadores (8,3%), frente al otro grupo de pacientes en los que se registraron 9 casos de síncope (13,2%). Se tiene constancia de que 1 de los casos de síncope en el grupo de portadores fue desencadenado por un episodio febril (8,3%). Dos de los portadores que presentaron síncope en algún momento de su vida, eran portadores de la misma mutación, G1743R. En cuanto al estudio electrofisiológico (EEF) fue anormal en dos de los 12 portadores ($N=6$, 33,3%) y en 3 de los 68 no portadores ($N=21$, 14,3%) ($p=0,049$).

En cuanto a la población pediátrica, tres de nuestros casos índices tenían menos de 16 años (3,2%) y en ninguno de los tres casos se detectó ninguna alteración génica causal en el gen SCN5A.

Tabla 22. Características clínicas de pacientes con ECG diagnóstico (tipo I), portadores frente a no portadores.

	<i>Portador</i>	<i>No portador</i>	<i>Total</i>	<i>Sig. (p<0,05)</i>	<i>Probandos</i>
<i>N</i>	12	68	80	-	76
<i>Edad</i>	40,6±15,7	41,8±13,3	41,2±14,5	0,734	41,8±13,7
<i>Edad dco</i>	39,5±14,5	40,5±13,9	40,0±14,2	0,833	40,6±14,1
<i>Sexo (varón)</i>	10 (83,3%)	58 (85,3%)	68 (85,0%)	0,219	65 (85,5%)
Motivo dco					
<i>Parada cardíaca resucitada</i>	0 (0%)	3 (4,4%)	3 (3,7%)	0,544	3 (3,9%)
<i>Síntomas</i>	1 (8,3%)	17 (25,0%)	18 (22,5%)	0,312	18 (23,6%)
<i>Casual</i>	8 (66,7%)	47 (69,1%)	55 (68,7%)	0,278	54 (71,1%)
<i>Estudio familiar</i>	3 (25%)	1 (1,5%)	4 (5,0%)	0,730	1 (1,3%)
Eventos previos					
<i>Síncope con fiebre</i>	1 (8,3%)	7 (10,3%)	8 (10,0%)	0,848	1 (1,3%)
<i>Síncope cardiogénico</i>	1 (8,3%)	9 (13,2%)	10 (12,5%)	0,954	9 (11,8%)
<i>Palpitaciones</i>	1 (8,3%)	7 (10,3%)	8 (10,0%)	0,544	4 (5,26%)
DAI	2 (16,6%)	7 (10,3%)	9 (11,3%)	0,223	9 (11,8%)
Descarga DAI	0 (0,0%)	2 (2,9%)	2 (2,5%)	0,780	2 (2,6%)
EEF	2 (33,3%)	3 (4,4%)	5 (6,2%)	0,049	5 (6,6%)
ECG tipo I espontáneo	8 (66,7%)	36 (52,9%)	44 (55,0%)	0,062	43 (56,6%)
ECG tipo I fleca	4 (33,3%)	32 (47,1%)	36 (45,0%)	0,062	33 (43,4%)
ECG tipo I fiebre	1 (8,3%)	2 (2,9%)	3 (3,7%)	0,189	4 (5,3%)
ECG tipo I alternante	4 (33,3%)	25 (36,8%)	29 (36,2%)	0,156	26 (34,2%)
MS familiar	5 (41,7%)	15 (22,1%)	20 (25,0%)	0,331	18 (23,7%)
Fibrilación auricular	0 (0,0%)	2 (2,9%)	2 (2,5%)	0,623	2 (2,6%)
Meses en seguimiento	29,8±15,1	28,4±20,6	29,1± 17,8	0,784	28,1± 21,6

6.2. Estudio familiar

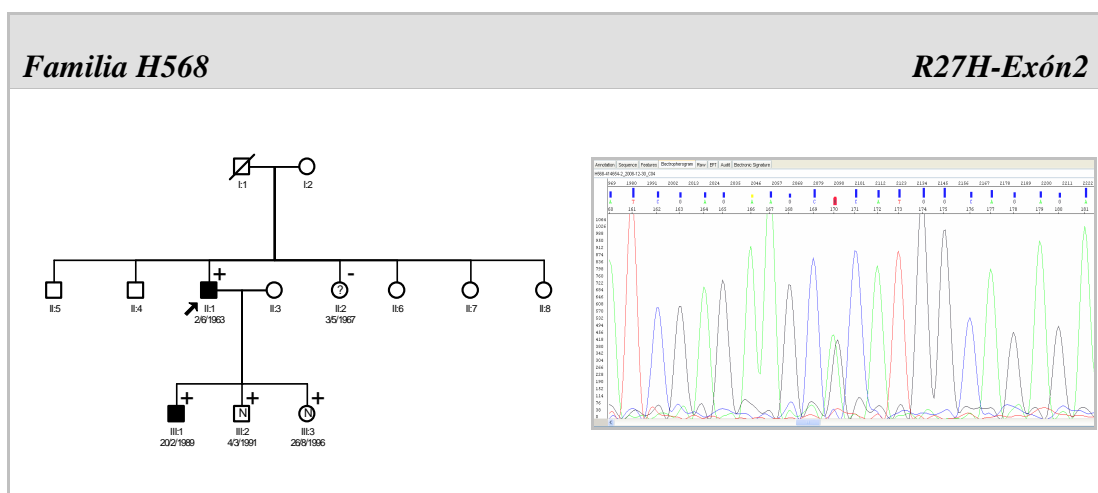


Figura 31. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H568.

El caso índice de la familia H568 es portador de la mutación R27H en el exón 2 del SCN5A, varón de 46 años con ECG basal entre tipo II y III con test de provocación de flecainida positivo. Su hermana, de 42 años, no es portadora. Se le realizó el test de provocación y resultó anormal aunque no diagnóstico. Sufrió varios síncope vasovagales, todos de pie, pero el ECG y la ECO son normales. Sin embargo los tres hijos (dos varones y una mujer) del probando son portadores de la mutación y sólo uno de ellos está afectado (III.1), dando el test de provocación positivo. III.2 y III.3, varón y mujer respectivamente, tienen un ECG normal y el test en el caso de II.2 es negativo, no se realizó el test en la paciente III.3 debido a su corta edad. No fue posible completar el estudio familiar en otros miembros (II.4-II.8) (Figura 31-Tabla 23).

Tabla 23. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H568.

Línea familiar	Sexo	Edad	Genotipo	Diagnóstico	P/F	Síncope	ECG tipo I	Test fleca	DAI
II.1	V	46	+	Afectado	P	N	ECG tipo II-III	+	N
II.2	M	42	-	Anormal no diagnóstico	F	Sin. vasovagal	N	Patolog. no diag.	N
III.1	V	20	+	Afectado	F	N	Patolog. no diag.	+	N
III.2	V	18	+	Normal	F	N	N	-	N
III.3	M	12	+	Normal	F	N	N	NR	N

P/F Probando/ Familiar. NR no realizado. N no/ S sí.

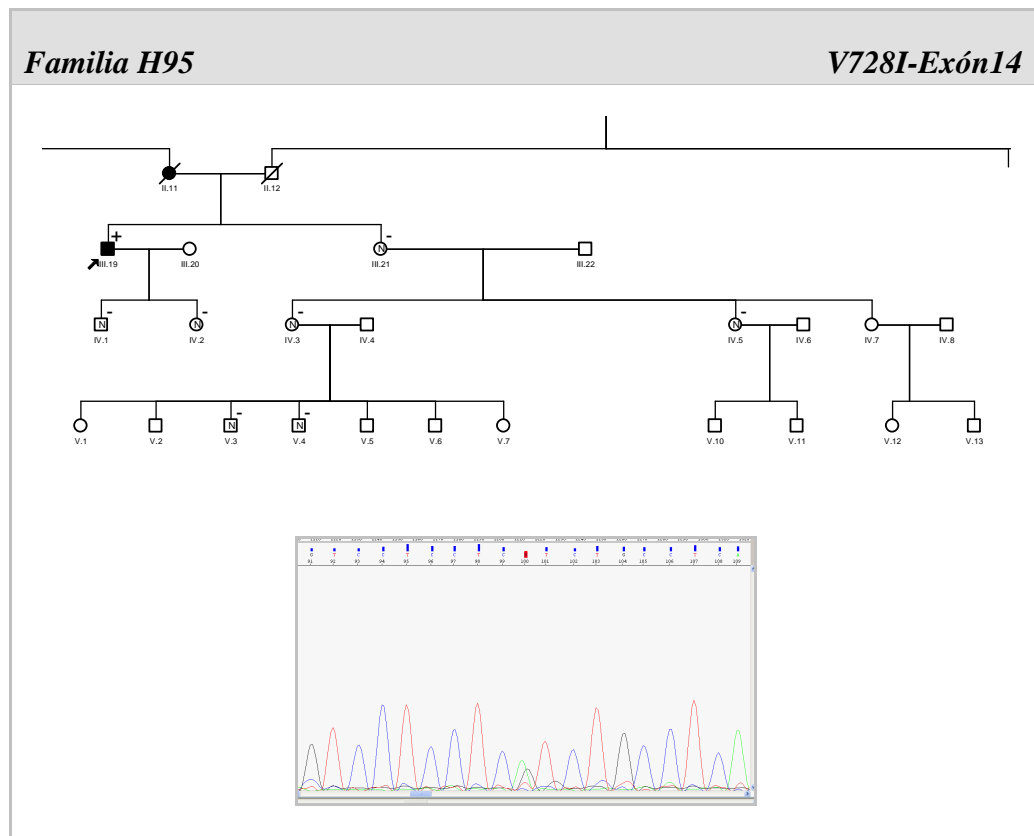


Figura 32. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H95.

En el probando de la familia H95 se detectó la mutación V728I (III.19). Un varón asintomático de 55 años sin antecedentes de MS familiar, con ECG basal tipo I alternante y prueba de flecainida positiva, sin embargo el EEF fue normal. Se evaluaron 8 familiares, 5 mujeres y 3 varones, todos ellos con ECG normal y no portadores de la mutación. El test de flecainida en 3 familiares que no portan la mutación fue negativo (Figura 32-Tabla 24). Su madre estaba diagnosticada de SB aunque con ECG alternante, falleció por causas ajenas a la patología y por lo que no tenemos muestra para el análisis genético.

Tabla 24. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H95.

<i>Línea familiar</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>P/F</i>	<i>Síncope</i>	<i>ECG tipo I</i>	<i>Test fleca</i>	<i>DAI</i>
II.11	M	88 (Exitus)	No muestra	Afectado	F	¿	Tipo II y I	NR	N
III.19	V	57	+	Afectado	P	N	S	+	N
III.21	M	72	-	Normal	F	N	N	-	N
IV.1	V	18	-	Normal	F	N	N	NR	N
IV.2	M	37	-	Normal	F	N	N	-	N
IV.3	M	48	-	Normal	F	N	N	-	N
IV.5	M	43	-	Normal	F	N	N	NR	N
V.3	V	25	-	Normal	F	N	N	NR	N
V.4	V	26	-	Normal	F	N	N	NR	N

P/F Probando/ Familiar. NR no realizado. N no/ S sí.

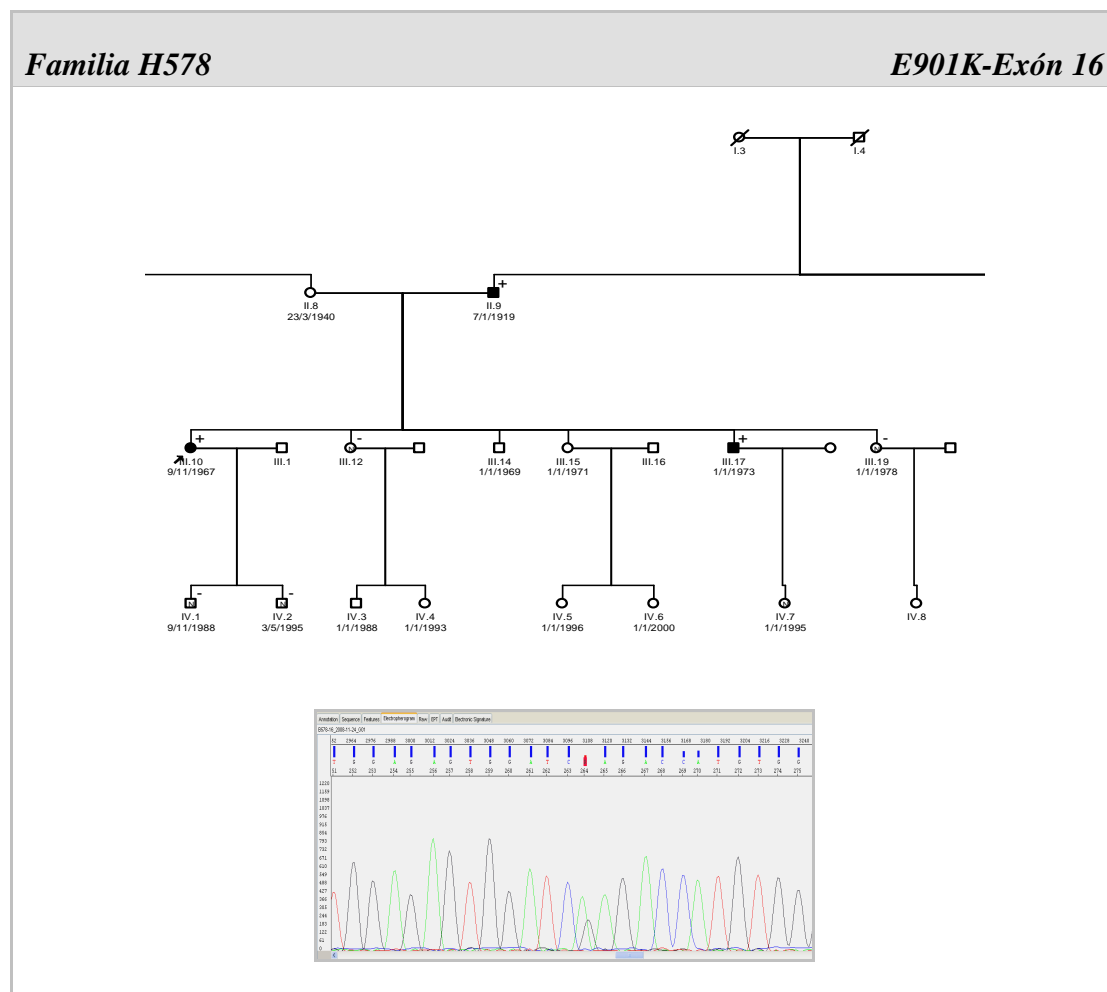


Figura 33. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H578.

El caso índice de la familia H578 es un varón de 35 años portador de la mutación E901K, ha sufrido dos síncope a lo largo de su vida, uno ortostático al levantarse de la siesta y otro vasovagal por la noche al levantarse, tiene un ECG constante de SB. Su hermana, III.19, de 30 años también ha sufrido síncope, aunque claramente vasovagales, no es portadora de la mutación y el ECG es normal. El padre del probando, II.9 (70 años), de genotipo positivo ha sufrido también síncope vasovagales, presenta un ECG patológico no diagnóstico. Otra hermana del probando de 42 años, III.10, es asintomática pero con un ECG dudoso que hace considerarla como posiblemente afectada, también es portadora de la mutación (Figura 33-Tabla 25).

Tabla 25. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H578.

<i>Línea familiar</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>P/F</i>	<i>Síncope</i>	<i>ECG tipo I</i>	<i>Test fleca</i>	<i>DAI</i>
II.9	V	70	+	Afectado	F	Sin. vasovagal	Dudoso	NR	N
III.10	M	42	+	Afectado	F	N	Dudoso	+	N
III.12	M	41	-	Normal	F	N	N	NR	N
III.17	V	35	+	Afectado	P	2 síncope	S	NR	N
III.19	M	30	-	Normal	F	Sin vasovagal	N	NR	N
IV.1	V	19	-	Normal	F	N	N	Pendiente	N
IV.2	V	13	-	Normal	F	N	N	Pendiente	N
IV.7	M	14	No muestra	Normal	F	N	N	NR	N

P/F Probando/ Familiar. *NR* no realizado. *N* no/ *S* sí.

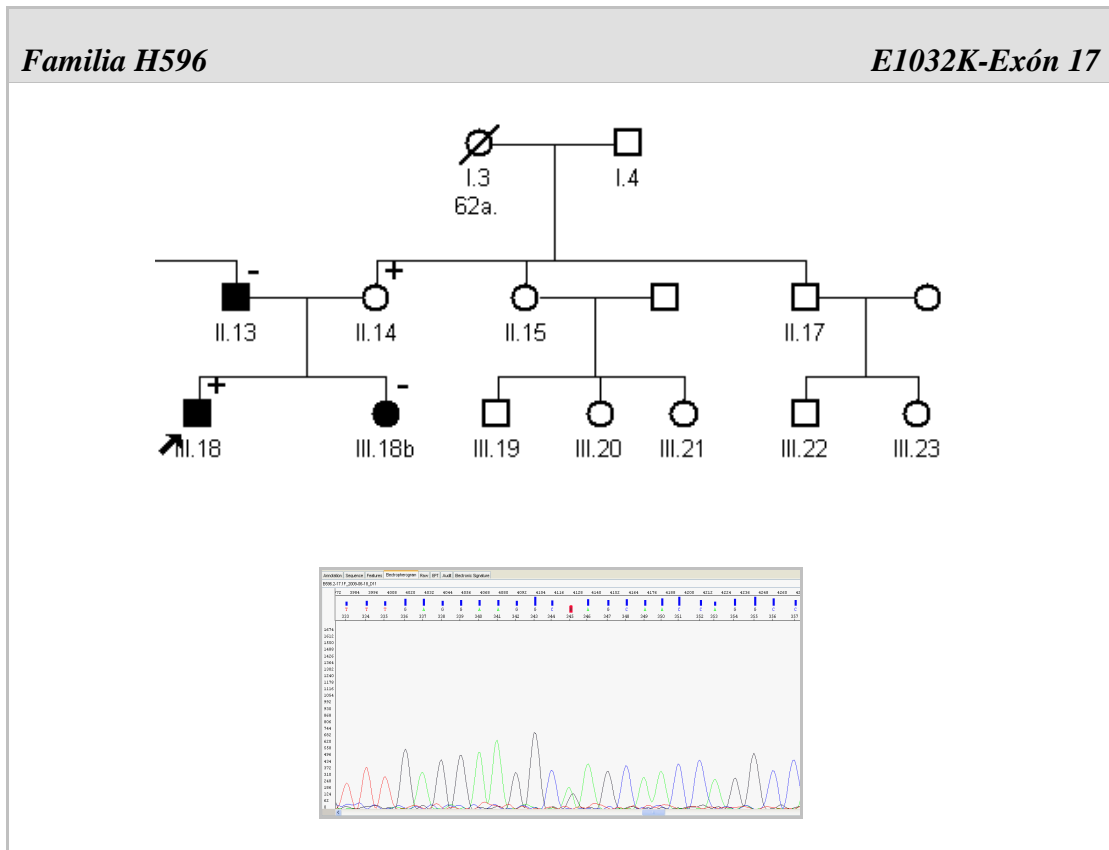


Figura 34. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H596.

El probando de la familia H596 (II.1), varón de 30 años asintomático, es portador de la variante E1032K. Tiene un patrón electrocardiográfico tipo I constante. Su hermana de 30 años, II.2 ha sufrido 2 síncope sospechosos de origen arrítmico, está afectada clínicamente pero no es portadora de la mutación. El padre del probando presenta un ECG dudoso, se le realizó el test de provocación que dió positivo, sin embargo tampoco es portador de la mutación. La madre no está afectada clínicamente, tiene un ECG y test de flecainida normales y es portadora de la mutación. En esta familia se confirma que la variante genética no se segrega con la enfermedad. Se ha implantado un DAI a la paciente con ECG de Brugada y síncope de probable origen arrítmico (Figura 34-Tabla 26).

Tabla 26. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H596.

Línea familiar	Sexo	Edad	Genotipo	Diagnóstico	P/F	Síncope	ECG tipo I	Test fleca	DAI
II.14	M	47	+	Normal	F	Sin. vasovagal	N	-	N
II.13	V	48	-	Afectado	F	N	Dudoso	+	N
III.18	V	30	+	Afectado	P	N	S	+	N
III.19	M	28	-	Afectado	F	2 Sin. Cardial.	N	+	S (2008)

P/F Probando/ Familiar. NR no realizado. N no/ S sí.

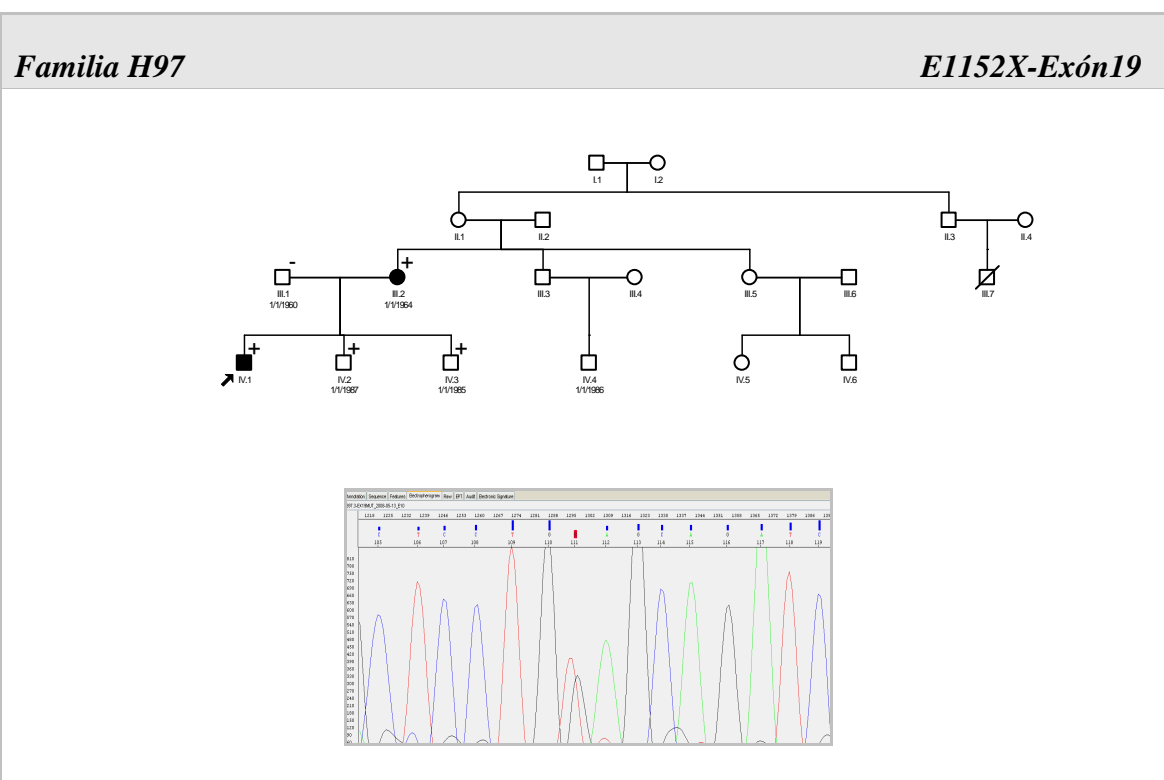


Figura 35. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H97.

El caso índice de la familia H97 (IV.I) es un varón de 25 años que presentó un presíncope con mareo y dolor torácico que llevo a ECG diagnóstico. El EEF resultó normal y no fue posible el test de provocación. Se recomendó al paciente la implantación del DAI, decidiendo finalmente no seguir la recomendación del clínico.

Se detectó una alteración no conocida en el exón 19 del gen SCN5A que provoca un codón de parada prematura, E1152X. Los familiares estudiados fueron 3 varones y una mujer (III.2), madre del probando. Esta paciente tenía un ECG basal dudoso, siendo el test de procainamida positivo (tipo I), lo que llevó a diagnóstico. Dicha paciente está asintomática y es portadora de la mutación encontrada en el caso índice. Los dos hermanos del probando (IV2 y IV3), ambos varones de 21 y 19 años respectivamente, son portadores de la mutación aunque con ECG basal normal y prueba de procainamida negativa. El padre del probando (II.1) tiene ECG normal y no es portador de la mutación (Figura 35-Tabla 27).

Tabla 27. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H97.

<i>Línea familiar</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>P/F</i>	<i>Síncope</i>	<i>ECG tipo I</i>	<i>Test fleca</i>	<i>DAI</i>
III.1	V	48	-	Normal	F	N	N	NR	N
III.2	M	49	+	Afectado	F	N	Dudoso	+	N
IV.1	V	25	+	Afectado	P	Presíncope	S	NR	N
IV.2	V	21	+	Normal	F	N	N	-	N
IV.3	V	19	+	Normal	F	N	N	-	N

P/F Probando/ Familiar. NR no realizado .N no/ S sí.

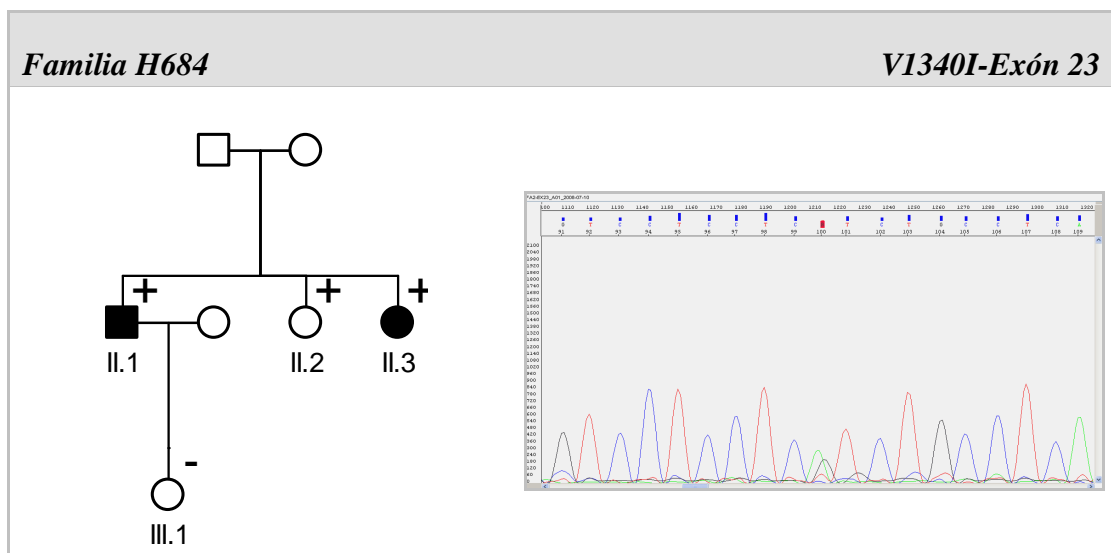


Figura 36. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H97.

El caso índice de la familia H684, un varón de 41 años, que debutó con síncope en el 2000. Presenta ECG tipo I, implantándose DAI. Durante el tiempo de seguimiento sufre 4 episodios de FV, que han precisado descargas del DAI. Tiene dos hermanas portadoras asintomáticas, una de ellas con un test de provocación positivo y otra negativo (Figura 36-Tabla 28).

Tabla 28. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H684.

<i>Línea familiar</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>P/F</i>	<i>Síncope</i>	<i>ECG tipo I</i>	<i>Test fleca</i>	<i>DAI</i>
II.1	V	41	+	Afectado	P	S	S	NR	S
II.2	M	50	+	Normal	F	N	N	-	N
II.3	M	44	+	Afectada	F	N	Tipo II	+	N
III.1	M	7	-	Normal	F	N	N	NR	N

P/F Probando/ Familiar. *NR* no realizado. *N* no/ *S* sí.

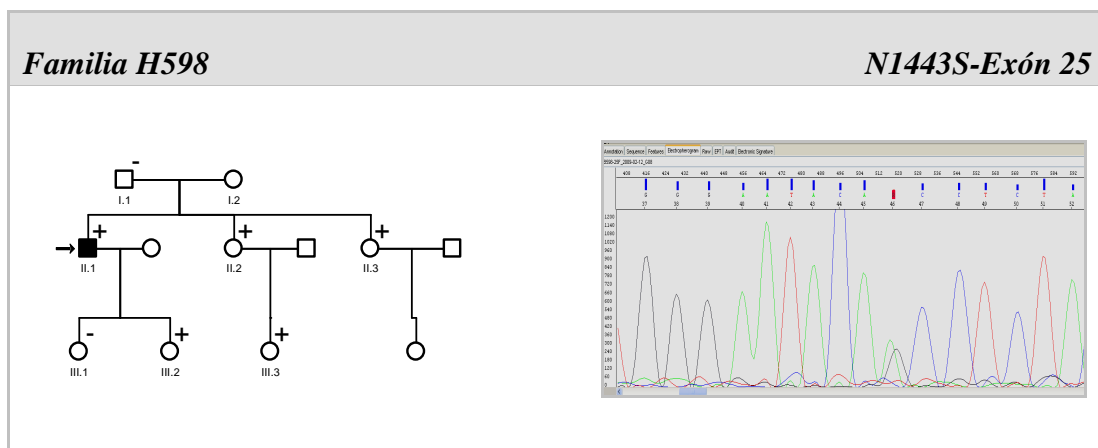


Figura 37. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H598.

El probando de la familia H598 (III.1), varón de 36 años que sufrió un presíncope a raíz de un episodio febril (amigdalitis pultácea) sin presentar ningún síncope con anterioridad. Se estudiaron a los padres y a las 2 hermanas del probando, el II.4 (padre) de diagnóstico normal no es portador de la mutación, sin embargo las dos hermanas III.3 y III.5 y la madre, II.5, son normales y genotipo positivo. Se realizó el estudio del genotipo de las dos hijas del probando y a su sobrina, una de sus hijas no es portadora de la mutación (Figura 37-Tabla 29).

Tabla 29. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H598.

Línea familiar	Sexo	Edad	Genotipo	Diagnóstico	P/F	Síncope	ECG tipo I	Test fleca	DAI
I.1	V	61	-	Normal	F	N	N	NR	N
I.2	M	59	+	Normal	F	N	N	-	N
II.1	V	36	+	Afectado	P	N	S*	NR	N
II.2	M	34	-	Normal	F	N	N	NR	N
II.3	M	29	+	Normal	F	N	N	-	N
III.1	M	4	-	Normal	F	N	NR	NR	N
III.2	M	1	+	Normal	F	N	NR	NR	N
III.3	M	3	+	Normal	F	N	NR	NR	N

* Tras episodio febril. P/F Probando/ Familiar. NR no realizado. N no/ S sí.

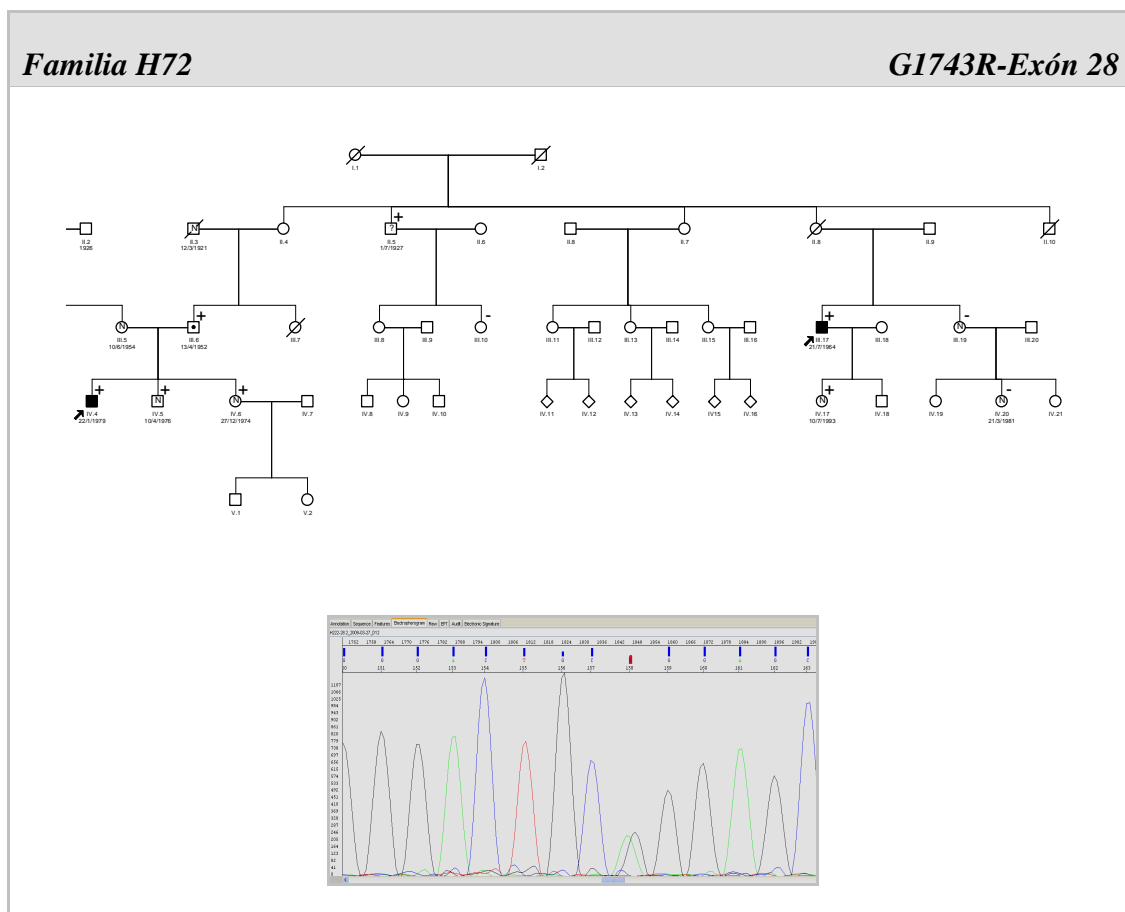


Figura 38. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia 72.

La familia H72 es bastante extensa y se ha podido examinar alguna de las líneas familiares de tres generaciones. El caso índice, IV.4, es un varón de 29 con ECG basal tipo I aunque alternante, con antecedentes de MS de un tío abuelo. Nunca ha presentado eventos pero en el EEF se le provocó una TV que requirió cardioversión eléctrica, lo cual llevó a la implantación de un DAI (2004). Desde la implantación del mismo no ha requerido ninguna terapia.

El paciente I.4, varón, falleció súbitamente a los 83 años, sufrió un infarto agudo de miocardio por el que no ingresó y nunca presentó síncope. Tenía un ECG con alteraciones en la repolarización pero no sugestivo de Brugada. No se tiene muestra de sangre por lo que no se pudo llevar a cabo el estudio genético. El caso II.5, un varón de 82 años con varios síncope recurrentes, acabando el último en una MS también era portador de la mutación G1743R, aunque con un ECG patológico pero no diagnóstico de SB.

El resto de familiares incluidos en el estudio genético fueron 4 varones y 5 mujeres, de edades comprendidas entre 26 y 53 años. Todos los que tenían un ECG

patológico o dudoso son portadores de la mutación. La mayoría han rechazado la realización del test de provocación. Dos de los portadores tienen el test de provocación normal (Figura 38-Tabla 30).

Tabla 30. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H72.

<i>Línea familiar</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>P/F</i>	<i>Síncope</i>	<i>ECG tipo I</i>	<i>Test fleca</i>	<i>DAI</i>
II.3	V	83 (MS)	No muestra	Normal	F	N	Patológico no Diag.	NR	N
II.5	V	82 (Exitus)	+	Normal	F	4-5 el último con MS	Patol. No Diag.	NR	N
III.5	M	53	No muestra	Normal	F	N	N	-	N
III.6	V	55	+	Normal	F	N	Dudoso	-	N
III.10	M	48	-	Normal	F	N	N	-	N
III.17	V	43	+	Afectado	F	N	S	NR	N
III.19	M	48	-	Normal	F	N	N	NR	N
IV.4	V	29	+	Afectado	P	N	Diagnóstico	NR	S(2004)
IV.5	V	31	+	Normal	F	N	N	-	N
IV.6	M	33	+	Normal	F	N	N	-	N
IV.17	M	14	+	Normal	F	N	N	NR	N
IV.20	M	26	-	Normal	F	N	N	NR	N

P/F Probando/ Familiar. NR no realizado. N no/ S sí.

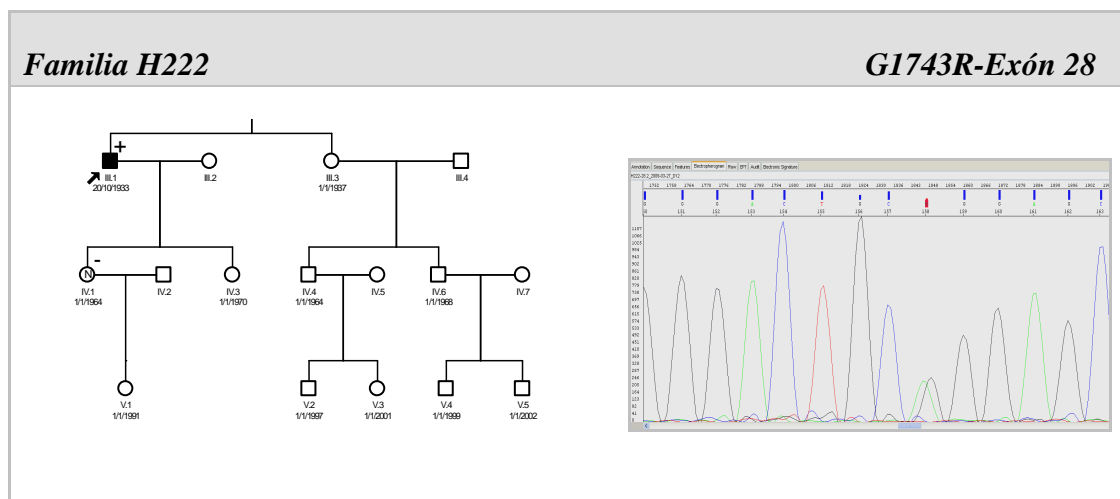


Figura 39. Árbol familiar y electroferograma diagnóstico de la familia H222.

El probando de la familia H222 también es portador de la mutación G1743R, varón de 74 años que había sufrido 3 síncope durante el reposo y con EEF positivo. Se le implantó un DAI en el 2004, aunque no requirió descarga ha sufrido 1-2 síncope tras la implantación. Sólo tenemos muestra de su hija de 44 años, con diagnóstico normal y no portadora de la mutación (Figura 39-Tabla 31).

Tabla 31. Estudio genotipo-fenotipo de la familia H222

Línea familiar	Sexo	Edad	Genotipo	Diagnóstico	P/F	Síncope	ECG tipo I	Test fleca	DAI
III.1	V	74	+	Afectado	P	3 sín. reposo. 1-2 tras DAI	Diagnóstico	NR	2004
IV.1	M	44	-	Normal	F	N	N	NR	N

P/F Probando/ Familiar. NR no realizado. N no/ S sí.

Se ha detectado en el probando de la **familia H876** la mutación G1743R. El caso índice es un varón de 60 años, fue diagnosticado casualmente de SB, presentando ECG tipo I sin eventos previos. No tenemos información de la familia.

En la tabla 32 se detallan las características clínicas de las 3 familias portadoras de la mutación conocida G1743R.

Tabla 32. Resultados de las tres familias portadoras de G1743R..

<i>G1743R</i>	<i>portadores</i>	<i>no portadores</i>	<i>total</i>
N	9	4	13
Varón	6 (66,6%)	0	6 (46,1%)
Edad	44,0 ± 23,4	25,8 ± 10,5	42,4 ± 19,9
ECG tipo I espontáneo	4 (44,4%)	0	4 (30,7%)
Síncope	2 (22,2%)	0	2 (15,4%)
DAI	2 (22,2%)	0	2 (15,4%)
MS (3 familias)	1 (11,1%)	1(25,0%)	2 (15,4%)

De todos los portadores de mutación hallados, 5 de ellos ya estaban diagnosticados clínicamente. El estudio genético llevó al diagnóstico de 12 portadores silentes. Sólo un individuo afectado no es portador de la alteración de su familia, paciente II.13 de la familia H596, con lo que esta variante no determina la expresión del SB en esta familia.

6.3. Estudio de microsatélites en tres familias portadoras de la mutación G1743R

El estudio de genotipado de los 6 marcadores de microsatélites y el estudio de la segregación propuestos confirmó la presencia de un antecesor común (Figura 40). Cada alelo (paterno y materno) del microsatélite estudiado ha sido nombrado según el tamaño del fragmento, analizado en el sistema ABI3130. Todos los individuos portadores de la mutación G1743R tienen el mismo haplotipo “patogénico” (marcado con color negro) incluso entre probandos de diferentes familias (efecto fundador). Cada uno de los alelos representados en la figura 40 es el resultado de los 6 *loci* que se transmiten juntos.

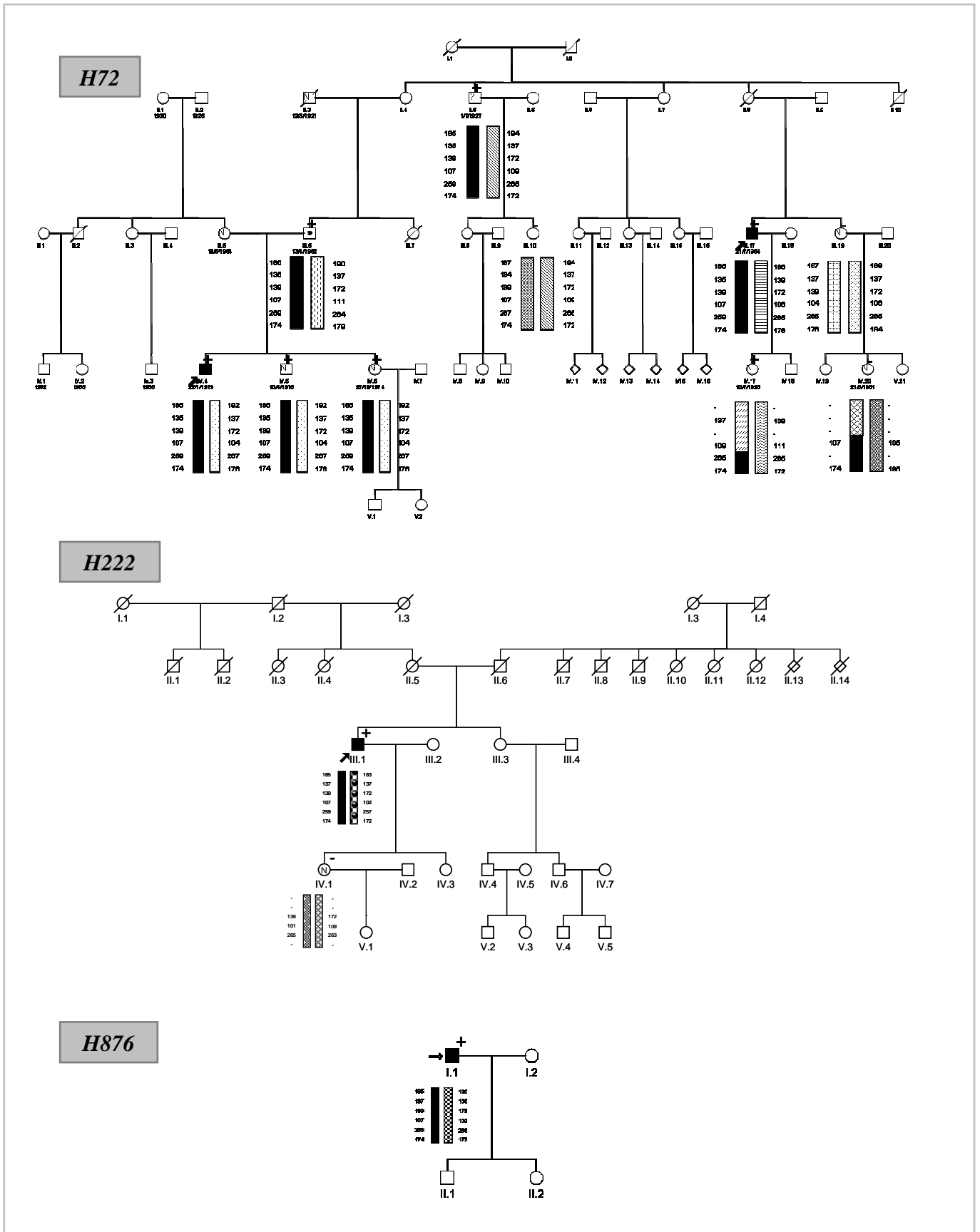


Figura 40. Segregación de los marcadores microsatélites en las tres familias portadoras

6.4. Estudio del polimorfismo frecuente H558R

Se realizó el estudio del polimorfismo frecuente H558R (Tabla 33) con posible papel modulador, en las familias portadoras de mutación. Se estudió un total de 44 individuos divididos en 4 grupos: afectados con genética positiva, no afectados (confirmado con test de provocación) con genética positiva, no afectados con genética negativa, y pacientes con ECG patológico pero no diagnóstico. El grupo de mayor interés es el de no afectados con genética positiva para darle una posible explicación a la penetrancia de las variantes, 2 de los individuos de este grupo (22,2%) presentaron el polimorfismo en los dos alelos (homocigoto mutante) pudiendo representar esto un efecto modulador del polimorfismo en homocigosis sobre la mutación y ser la razón por la que dichos pacientes no muestran el fenotipo afectado. Curiosamente también un familiar (100%) con ECG patológico no diagnóstico presenta en homocigosis el polimorfismo. Por otro lado el 80% (4 de 5 pacientes) de portadores homocigotos para el alelo salvaje tenían ECG diagnóstico.

Tabla 33. Estudio de frecuencia alélica del polimorfismo H558R.

Polimorfismo H558R (a>g)	Afectados /Gen+ (N=14)	No afectados /Gen + (N=9)	No afectados/ Gen – (N=20)	Patolog. no diagnóstico /Gen+(N=1)
AA	4 (28,6%)	1 (11,1%)	11 (55,0%)	0 (%)
AG	10 (71,4%)	6 (66,6%)	9 (45,0%)	0 (%)
GG	0 (0,0%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)	1 (100%)

Se analizaron todos los portadores de mutación que presentaban el polimorfismo (en heterocigosis u homocigosis), un 73% de ellos no presentaron síncope y solo un 37% mostraban ECG tipo I espontáneo.

El estudio del efecto modulador del polimorfismo H558R viene representado en la figura 41, en la que se representa mediante barras el porcentaje de individuos de cada grupo que presenta el polimorfismo en heterocigosis (AG) o en homocigosis (GG). La representación gráfica de los distintos grupos: afectados/genética positiva, sanos*/genética positiva (*clínicamente sanos confirmado con test de provocación e incluyendo el paciente patológico no diagnóstico) y sanos/genética negativa.

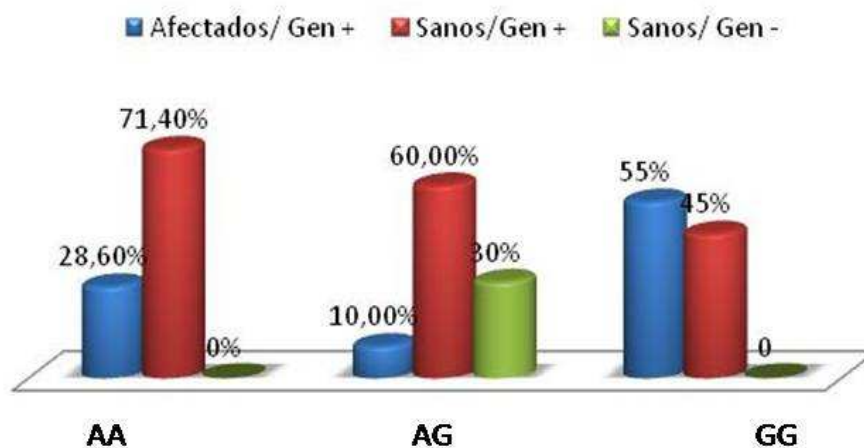


Figura 41. Representación de la frecuencia alélica del polimorfismo común H558R.

La presencia del polimorfismo H558R en homocigosis puede producir un efecto modulador positivo en los pacientes portadores de las mutaciones E901K y E1152X en el gen SCN5A.

6.5. Predicción de patogenicidad de las variantes nuevas encontradas

La tabla 34 resume el estudio realizado a las variantes nuevas detectadas (en el momento de su descubrimiento). Tras valorar las características de cada mutación y teniendo en cuenta la segregación con la enfermedad y la ausencia de la alteración en controles sanos, consideramos las variantes E1152X y E901K (recientemente publicada como mutación) encontradas como causantes de la patología, y la E1032K como polimorfismo, ya que no segrega con la enfermedad (factor determinante en la predicción). Dos de las variantes posteriormente han sido publicadas como mutaciones, R121W y V1340I. Las variantes V728I y N1443S no se ha podido confirmar que segregue con la enfermedad, debido a la corta edad de los familiares de los que se tiene muestra y la no afectación de los mismos, no obstante todos los individuos afectados poseen la mutación.

Tabla 34. Tabla de la predicción de patogenicidad de las mutaciones nuevas encontradas.

<i>Variante</i>	<i>Predicción Pmut/PolyPhen2</i>	<i>Alineamiento especies-isoformas</i>	<i>Distancia de Grantham</i>	<i>Segregación con la enfermedad</i>	<i>Localización en la proteína</i>	<i>Encontrada controles sanos</i>
R121W	Patogénica/ Probablemente	Igual/conservado	101	¿	N-terminal	No
V728I	Neutra/ Posiblemente	Igual/conservado	29	¿	DII-SI	No
E901K	Patogénica/ Probablemente	Igual/Igual	56	Sí	DII-S5-S6	No
E1032K	Neutra/Benigna	Conservado/semiconservado	56	No	DII-DIII	No
E1152X	-	-	No	Sí	DII-DIII	No
V1340I	Neutra/ Probablemente	Igual/Igual	29	Sí	DIII-S5	No
N1443S	Neutra/ Probablemente	Igual/semiconservado	46	¿	DIII-S5-S6	No

6.6. Sensibilidad y especificidad del test farmacológico

Se indican en la tabla 35 los resultados del test de provocación con flecainida/procainamida en los familiares a los que se les realizó el diagnóstico genético (n = 20). Se ha determinado la sensibilidad (40,0%) y especificidad (100%) del test de flecainida/procainamida, sin embargo un número importante de familiares rechazaron realizarse el test (29 individuos, 59,2%). Un gran porcentaje de pacientes con resultado genético positivo (60%) tuvieron un test de provocación negativo.

Tabla 35. Resultados del test de provocación en las familias con estudio genético.

<i>N=20</i>	<i>Genética positiva</i>	<i>Genética negativa</i>	<i>Total</i>
<i>Test positivo</i>	6 (30,0%)	0 (0%)	6 (30,0%)
<i>Test negativo</i>	9 (45,0%)	5(25,0%)	14 (70,0%)
<i>Total</i>	15 (75,0%)	5(25,0%)	20

Discusión

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

El SB se incluye dentro de las enfermedades llamadas eléctricas, que son causadas por fallos en canales iónicos intervinientes en los procesos como la transmisión del impulso nervioso o el ritmo cardíaco. Aunque es una enfermedad que se transmite de forma autosómica dominante el fenotipo se expresa mayoritariamente en hombres (Di Diego JM *et al.* 2002).

Nuestra cohorte de pacientes supone una de las series más extensas estudiadas genéticamente en nuestro país (García-Castro *et al.* 2010). Es posible que intervengan ciertos factores genéticos característicos en nuestra Región que la hagan más prevalente, o simplemente que exista un mayor interés por la patología en nuestro medio. Aunque se ha realizado el diagnóstico genético de 93 pacientes, sólo se dispone de los datos clínicos de los pacientes provenientes de nuestro hospital, que suman 76 pacientes, de los cuales 8 de ellos son portadores, por lo que los datos clínicos aportados se referirán siempre a este grupo.

Es una patología que se suele diagnosticar alrededor de la cuarta década de vida, la edad de diagnóstico en nuestra serie fue $41,8 \pm 13,7$ años. El SB tiene una penetrancia incompleta y una incidencia de 5-66 de cada 10.000 (Yap *et al.* 2009). En muchas ocasiones el paciente está asintomático (Benito *et al.* 2009). En nuestra cohorte, 54 probandos fueron diagnosticados de manera casual (71,1%). En otras series de pacientes también se obtienen porcentajes elevados de individuos asintomáticos, aunque inferiores al nuestro, como el de Eckart de 2005 (58%), el de Brugada de 2002 (57%) o el de Kamakura de 2009 (63%).

No se encuentran diferencias destacables entre el grupo de pacientes asintomáticos frente al de sintomáticos, 32 de los casos índices asintomáticos presentaron ECG basal tipo I (59,3%-asintomáticos Vs 54,5%-sintomáticos), 22 presentaron ECG tipo I tras el test farmacológico (40,7%-asintomáticos Vs 45,4%-sintomáticos). En los primeros años de estudio de nuestra serie (2002-2006) se realizaron estudios EEF que no se han indicado en la última fase (2006-2010) por lo que no es posible sacar conclusiones en este sentido. En un estudio de 2005 de Brugada *et al.* identifica al EEF como valor pronóstico a sufrir eventos en pacientes asintomáticos y sin historia familiar de MS, en el que un 6% de estos casos sufren un episodio de FV durante el seguimiento (Brugada P & Napolitano 2005).

Siendo una enfermedad puramente eléctrica, el corazón es estructuralmente normal, y el diagnóstico se realiza mediante un ECG. El de tipo I es el único que actualmente se considera diagnóstico, aunque en algunos trabajos se sugiere la posibilidad de que el ECG de tipo II sea una forma de expresión más leve del fenotipo (Nunn *et al.* 2010), 44 pacientes (57,9%) presentaron ECG espontáneo tipo I. En nuestra serie todos los pacientes índice debían tener un ECG tipo I espontáneo o provocado para ser incluidos.

Alrededor de 12 pacientes se aquejaban de haber sufrido dolor torácico o abdominal que llevó al diagnóstico. En otros casos también se ha relacionado el dolor de pecho junto con fiebre y la expresión del ECG típico del SB (Martinez *et al.* 2008; Patane *et al.* 2010). A diferencia de las primeras publicaciones, en nuestra serie es excepcional el modo de presentación de ECG tipo I con fiebre, arritmias o síncope con fiebre.

Distintos estudios apuntan que entre un 17% y un 42% de los casos debutan con síncope o MS como consecuencia de una arritmia ventricular en algún momento de su vida (Priori *et al.* 2002; Brugada *et al.* 2002; Brugada *et al.* 2003; Eckardt *et al.* 2005; Khan *et al.* 2009). En nuestro grupo de pacientes, 21 fueron diagnosticados por presentación de síntomas (27,6%), siendo 3 de ellos tras un episodio de MS (3,9%). Un 33,3% de los pacientes que sufrieron MS habían experimentado con anterioridad un síncope, algo superior a otras series (Benito *et al.* 2009).

Nuestra serie es por tanto de mejor pronóstico que las series definidas. Los pacientes de nuestro trabajo fueron incluidos de forma consecutiva independientemente de los síntomas o forma de presentación. Es posible que las series comentadas provenientes de centros de referencia presenten un sesgo de inclusión hacia los casos más severos.

En los 3 pacientes que sufrieron MS este fue el modo de presentación de la enfermedad, y en los tres casos fue resucitada. Dos de ellos sufrieron una o varias descargas apropiadas (66,6%) después de la implantación del DAI (de 4 a 7 años después de la implantación), porcentaje similar al descrito en la serie de Brugada (62%) en un período de 54 meses (Brugada *et al.* 2002).

En nuestra serie el EEF se realizó en 26 de los 76 casos índices (34,2%), de los cuales en 5 resultó anormal (19,2%). Todos ellos llevan implantado un DAI. Dos de

ellos presentaban síncope, otro un episodio de MS y 2 de ellos tenían la ECO anormal (uno con diagnóstico de miocardiopatía hipertrófica, que curiosamente se le detectó una mutación, G1743R)

El único tratamiento hasta la fecha es la implantación de un DAI, 9 de nuestros pacientes lo llevan implantado (11,8%), y dos de ellos (20,0%) han recibido descargas durante el seguimiento. Todos fueron implantados por prevención secundaria, ninguno de los pacientes en los que se implantó el DAI por prevención primaria ha tenido descargas.

La teoría del desequilibrio de corrientes iónicas da explicación a la aparición de los rasgos típicos del síndrome y siguiendo la misma se plantean nuevos tratamientos con fármacos bloqueantes de los canales iónicos, como es el caso de la quinidina, recomendada en uno de nuestros pacientes principalmente por su corta edad. Existen varios estudios que apuntan al uso de la quinidina, fármaco bloqueante de las corrientes transitorias de potasio, para evitar la fibrilación ventricular espontánea y la aparición de arritmias malignas (Belhassen *et al.* 2004; Valdivia *et al.* 2004; Shimizu *et al.* 2005; Napolitano & Priori 2006; Antzelevitch *et al.* 2007).

1.2 Características clínicas en función del sexo y edad

Aunque es una enfermedad de transmisión autosómica dominante, el porcentaje de expresión en hombres es muy superior al de mujeres, 65 frente a 11. Según el estudio realizado por Di Diego *et al.*, los varones tienen constitutivamente más elevada la corriente transitoria de potasio (I_{to}), lo que hace que se acentúe más la muesca de potencial típica de pacientes con SB (Di Diego JM *et al.* 2002).

Los factores de riesgo considerados a la hora de sufrir eventos, como la presencia de ECG tipo I espontáneo, el síncope o la inducibilidad de arritmias en el EEF, reflejan la diferenciación entre sexos aunque no es significativa estadísticamente. El 57,9% de los varones presentaba ECG tipo I frente al 42,1% de las mujeres ($p=0,81$). Se realizaron 26 EEF de los cuales 3 fueron a mujeres, ninguna de ellas dieron positivo y 5 de los 23 varones sufrieron arritmias ventriculares durante el estudio (21,7%). Curiosamente la tasa de presentación de síncope de origen cardiogénico fue superior en mujeres respecto a los varones (36,4% vs 9,2% respectivamente, $p=0,087$), la presentación de eventos cardiacos mayores (MS) se determinó en 3 pacientes varones, de edades comprendidas entre 27 y 44 años, (4,6% varones vs 0,0% mujeres)

coincidiendo con los resultados publicados por Benito et al en una serie de 384 pacientes (70,8% varones vs 29,2% mujeres) (Benito *et al.* 2008b).

La edad media de presentación de los síntomas fue de $41,8 \pm 13,7$ años, coincidiendo con lo establecido en el “segundo consenso” y series posteriores (Brugada *et al.* 2002; Antzelevitch *et al.* 2005a; Benito *et al.* 2008a), aunque el probando más joven de nuestra serie es de 5 años.

En cuanto a la población pediátrica, tres de nuestros casos índices tenían menos de 16 años (3,9%), dos de ellos (66,6%) con síncope vasovagales claramente relacionados con la aparición de fiebre, en la serie más grande de niños con SB estudiada identifica los episodios febriles como factor precipitante a sufrir arritmias especialmente en niños (Probst *et al.* 2007). Otros tres niños se incluyeron en el estudio, familiares de los probandos en los que detectamos mutación y que no estaban afectados clínicamente; uno de ellos resultó portador de una mutación.

2. SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL GEN SCN5A

En la mayor parte de series publicadas se identifican mutaciones en el gen SCN5A en el 15% de los casos estudiados (Schulze-Bahr *et al.* 2003; Tan 2006; Antzelevitch *et al.* 2007), aunque en un compendio publicado recientemente, el más amplio hasta la fecha, estudió a 2111 pacientes con SB encontrando una prevalencia del 21% (Kapplinger *et al.* 2010). En nuestra serie sin embargo detectamos un porcentaje bastante inferior, detectamos 8 mutaciones distintas en 10 casos índices (10,7%), en el momento de su descubrimiento sólo dos de ellas eran conocidas y el resto no estaba descrito en la bibliografía. Esto puede ser debido a los criterios clínicos de inclusión de los probandos, distinto tamaño de las series o la inclusión de casos esporádicos sin conocimiento de cardiopatía familiar. En nuestra serie existe un 25,0% de afectación familiar.

En cuanto a los criterios clínicos de inclusión, actualmente el ECG tipo I es el único que se considera diagnóstico. El grupo de Priori et al. (Priori *et al.* 2002) incluye a los dos tipos de ECG mezclados en el análisis (130 pacientes; 21,5% genotipo positivo), sin embargo el grupo de Kamakura et al. (Kamakura *et al.* 2009) analiza los dos grupos por separado (no se mencionan los resultados obtenidos en el genotipado) y aun así no encuentra ninguna diferencia significativa entre ambos grupos respecto a la tasa de

eventos, historia de MS familiar y pacientes asintomáticos. En otro artículo más reciente del grupo de Priori (Bai *et al.* 2009) si realizan el genotipado diferenciando de los grupos según las características electrocardiográficas, presentando sólo en un 12,6% mutación en el canal de sodio los pacientes con ECG tipo I y en los de tipo II-III en un 4,4%. Sin embargo al analizar los resultados, determinaron que la única variante predictiva a la hora de encontrar un genotipado positivo y aumentar el rendimiento del estudio genético fue la presencia de bloqueo auriculo-ventricular (BAV), aumentando de un 8% (pacientes con ECG tipo I sin BAV) a un 23% (pacientes con ECG tipo I con BAV) (Bai *et al.* 2009), en nuestra serie sin embargo ninguno de nuestros pacientes presentan BAV.

Todas las mutaciones detectadas menos una, que codifica un codón de parada prematuro (E1152X) en el exón 19, son de tipo “missense” (87,5%). Se encuentran localizadas mayoritariamente en los segmentos transmembrana S5 o S6 (55,5%), involucrados en la selectividad iónica del canal, dos en el extremo N-terminal (22,2%) y otras dos en uniones inter-dominio (22,2%). Las mutaciones encontradas se encuentran por lo tanto repartidas a lo largo de toda la proteína, sin conocerse hasta la fecha ningún “cluster” de mutaciones. En el compendio de Kapplinger mencionan que tres cuartas partes de las mutaciones encontradas en su cohorte se localizan en la región transmembrana y helices formadoras del poro (Kapplinger *et al.* 2010).

A pesar de que la mutación de parada prematura produce un cambio en la proteína más dramático, los portadores de la mutación E1152X no parecen expresar un fenotipo más severo. El 10,9% de los sujetos incluidos en el estudio de Kapplinger tenían mutaciones de parada prematura. Sin embargo en las de tipo “missense” parece crítica su localización a la hora de caracterizarlas (Kapa *et al.* 2009). En el caso de las 4 mutaciones que hemos detectado en la zona de selectividad iónica, en el momento de su descubrimiento sólo estaba descrita la variante en el exón 28, G1743R, por lo que se estudiaron los controles sanos para los amplicones dónde encontramos las variantes nuevas, sin encontrarlas en ninguno de ellos.

3. ESTUDIOS IN SILICO

Los estudios *in silico* son herramientas útiles en la valoración del efecto funcional de variantes nuevas, en ausencia de estudios funcionales con modelos animales o celulares. Estos estudios tienen algunas limitaciones, consideran mínimamente las interacciones supramoleculares con moléculas homólogas y zonas relacionadas con la señalización intracelular junto con la posibilidad de la existencia de otra alteración en otro gen (Tchernitchko *et al.* 2004) aunque su uso se ha popularizado en los últimos años.

Las versiones actuales de distintos algoritmos tienen una sensibilidad del 80%, y en algunos casos hasta el 90% en la clasificación de variantes como patógenas o benignas (Tavtigian *et al.* 2008). Algunas publicaciones sobre la aplicación clínica del estudio *in silico* de mutaciones de cambio de sentido, en los genes BRCA1 y BRCA2, son prueba de su espectacular desarrollo (Goldgar *et al.* 2004; Tavtigian *et al.* 2006; Chenevix-Trench *et al.* 2006; Lovelock *et al.* 2006; Spurdle *et al.* 2008).

4. MÉTODO DE CRIBADO. DHPLC

Se ha conseguido optimizar 9 de los 15 exones (60,0%) en los que había alguna variante, esto supone que sólo se debería secuenciar los 23 exones restantes (71,8% del trabajo), más los casos en los que el perfil de una muestra fuera anómalo. Varios artículos hacen referencia a la utilización de esta técnica de cribado en el gen SCN5A en pacientes con SQT (Millat *et al.* 2006; Chung *et al.* 2007), realizando el cribado de todos los exones del gen mediante dHPLC. Esto no ha sido posible en nuestra serie ya que se disponía de controles mutantes (polimorfismo/mutación presente en el fragmento de ADN a amplificar) para 15 amplicones únicamente. Es necesario el diseño específico de nuevos cebadores para los 6 amplicones que no se ha conseguido optimizar mediante esta técnica.

La mayoría de los métodos de cribado presentan una alta especificidad, aunque la sensibilidad es baja comparada con la técnica de dHPLC, como en el caso de SSCP/SSCA (Single Strand Conformation Polymorphism/ Single Strand Conformation Analysis) y DGGE (Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante). Recientemente se ha descrito una técnica más rápida y menos costosa, del inglés “High Resolution Melting” (HRM) que detecta todas las mutaciones detectadas mediante la técnica de dHPLC (Millat *et al.* 2009).

La técnica de dHPLC utilizada en nuestra serie como método de cribado, ha resultado una técnica eficaz para agilizar el proceso de genotipado de las muestras ya que presenta una sensibilidad del 100% para detectar individuos con alteraciones en su secuencia.

5. GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS

Se sabe que existe una relación entre el número de copias genómicas presentes y la expresión fenotípica en varios síndromes. Actualmente se considera que, muchos fenotipos intermedios podrían estar relacionados con microduplicaciones y microdeleciones que son subdiagnosticadas clínicamente o que no pueden incluirse en ningún síndrome genético específico por falta de criterios (Ramirez JM1 2009)

Hasta la fecha sólo hay descritos en la literatura dos trabajos de análisis de grandes reordenamientos genéticos en SCN5A. En el publicado por Koopmann *et al.* analizaron 38 pacientes con SB en los que el genotipado del canal de sodio había sido negativo, no se encontró ningún gran reordenamiento genético (Koopmann *et al.* 2007). Recientemente se ha publicado otro artículo en el que describen un varón de 14 años con SB que presenta una deleción en el SCN5A detectada por MLPA (Eastaugh *et al.* 2011).

A pesar de ser la serie de pacientes con SB más larga que ha sido estudiada por MLPA hasta la fecha, no se ha detectado ningún reordenamiento genético. Estos resultados coinciden con el estudio de Koopman de 2007 (Koopmann *et al.* 2007).

El estudio del SCN5A mediante la técnica de MLPA en pacientes con SB no parece ser decisivo en un porcentaje importante de pacientes que quedan sin diagnóstico genético.

6. RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Se ha realizado el estudio genético en un total de 114 pacientes entre casos índice y familiares, de los cuales 26 con genotipo positivo, lo que supone un 23% de diagnóstico genético.

La mutación descrita por el grupo de Priori R27H (Priori *et al.* 2002) se detectó en el caso índice de la familia H568 y segrega con una penetrancia del 50%. Es una mutación conocida localizada en el extremo N-terminal de la proteína. Actualmente se

desconoce el papel real que realiza el extremo N-terminal en el “gating” y conductancia del canal (Liang *et al.* 2010).

La variante R121W localizada en el exón 3 y detectada en un paciente remitido de otro hospital no se tuvo en cuenta para la estimación clínica de los datos a este caso por no disponer de los datos demográficos ni de la historia familiar, tampoco se pudo realizar el estudio al resto de la familia por lo que no se pueden estimar datos de prevalencia ni saber si segrega con la enfermedad sólo se aportan los datos referentes a la alteración detectada y se ha incluido en el grupo de pacientes para la consiguiente estimación del porcentaje de casos en los que se ha encontrado la causa genética de la enfermedad. Esta mutación se ha descrito recientemente por el grupo de Kapplinger, detectándose en un paciente.

En el probando de la familia H95 se detectó la variante V728I, localizada en el DII-SI, otras mutaciones están descritas en la región mencionada. Sólo se ha detectado en el probando de la familia, siendo el resto de familiares de los que se tiene muestra no portadores y clínicamente normales. Tampoco aparece descrita en la serie de Kapplinger como polimorfismo o mutación, aunque en la base de datos <http://www.fsm.it/cardmoc/> está caracterizada como polimorfismo (no publicado). Los programas bioinformáticas de predicción de patogenicidad la pronostican como una variante posiblemente patogénica (Polyphen2) y por otro lado benigna (Pmut). En nuestro laboratorio no hemos detectado esta variante génica en 200 alelos sanos por lo que podría ser la causa de la enfermedad.

En la familia H578 hallamos 3 portadores de la mutación E901K. Aunque tanto la localización de la variante en la proteína como su carácter conservado evolutivamente nos hacen pronosticar una variante potencialmente patogénica, se hereda de forma autosómica dominante pero con penetrancia incompleta, 66,6%. De los 3 portadores uno presentaba ECG patológico pero no diagnóstico en el que se encontró en homocigosis el polimorfismo H558R, que podría ser el causante de que no se exprese por completo el fenotipo, como en la paciente III.10 de la familia H578. Cuando detectamos la mutación no estaba descrita en la bibliografía y se analizaron los controles sanos sin detectar la variante en 200 alelos. Se ha publicado la presencia de esta mutación en otros 3 pacientes.

La variante detectada en el exón 17, E1032K, no segrega con la enfermedad. Es una alteración poco conservada entre especies e isoformas aunque no se ha hallado en ninguno de los 200 alelos sanos analizados. Lo consideramos como un polimorfismo poco común en raza caucásica. Sin embargo los miembros de esta familia sufren algunas alteraciones estructurales que sí podrían estar ligadas a la variante.

En la familia H97 se detectó en el exón 19 la mutación E1152X. Una mutación “non-missense” (de parada prematura (“nonsense”), deleción, inserción o de alteración del “splicing”) tiene un valor predictivo > 99% sin tener en cuenta su localización en la proteína (Kapplinger *et al.* 2010). Sin embargo la penetrancia de esta mutación en la familia es del 50%. Cuatro individuos de la familia son portadores incluyendo al probando, sus dos hermanos, que son clínicamente normales y la madre asintomática aunque con prueba de procainamida positiva. La penetrancia incompleta de esta mutación claramente patógena por su efecto de truncamiento de la proteína se podría explicar por la presencia del polimorfismo H558R en homocigosis, el efecto modulador positivo del polimorfismo, como se conocen cuando está presente junto con otras mutaciones, puede determinar que no presenten fenotipo o que sea menos severo, como en el caso de la madre.

Se ha detectado en un caso índice de raza asiática, un polimorfismo poco frecuente en caucásicos con efecto funcional demostrado, R1193Q, que sin embargo es común en la raza asiática (Huang *et al.* 2006; Kapplinger *et al.* 2010). Existe cierta controversia respecto a la patogenicidad de esta alteración. En 2006 el grupo de Niu *et al.* describen una familia japonesa portadora de una mutación “nonsense” en el SCN5A, en el que un familiar portador de la mutación y este polimorfismo presentaba un fenotipo menos severo que el de su familia (Niu *et al.* 2006). En otro trabajo realizaron estudios funcionales de la variante, fue expresada en dos modelos distintos, según los modelos de “splicing” salvajes conocidos del canal y concluyeron que presentaba alteraciones significativas de la activación e inactivación del canal similares a las producidas por otras mutaciones dependiendo de la isoforma que se exprese (Tan *et al.* 2005).

Se recibió derivada del Hospital General de Alicante la muestra de un caso de SB, identificada como H684. Se detectó en el caso índice de la familia una mutación en el momento no descrita, V1340I, comprobándose la no presencia de la misma en 200 alelos sanos en el exón 23 del gen SCN5A. Fue publicada por el grupo de Samani *et al.*

en 2009, este grupo caracterizó la mutación concluyendo que en pacientes portadores durante estados febriles aumentaba el riesgo de sufrir arritmias, como ocurre en otras mutaciones (Samani *et al.* 2009). También ha sido publicada en el compendio de mutaciones de Kapplinger de 2010 detectada en un paciente de 2111 analizados. Se detectó en dos familiares (uno de ellos afectado), presentando una penetrancia del 66,6%.

La variante N1443S detectada en el caso índice de la familia H598, no está descrita en la bibliografía pero existen varias mutaciones conocidas en los aminoácidos colindantes. Está bastante conservada entre especies e isoformas, el cambio de aminoácidos provoca una variación importante en el índice hidropático y el programa de análisis Polyphen2 la predice como variante “probablemente patogénica”. Se segrega con una penetrancia del 33,3% y no está presente en 200 alelos de controles sanos. Aunque la hemos considerado como la causante de la enfermedad no parece una variante de alto riesgo ya que el probando sufrió un presíncope relacionado con fiebre presentando ECG tipo I alternante a ECG normal días después sin más síntomas ni síncope previos. Tampoco existen antecedentes de MS en la familia ni cardiopatía familiar evidente.

Se ha detectado en tres de los probandos la mutación G1743R. Esta variante se da en nuestra población con una prevalencia mayor que el resto de variantes, 3,2%. Esta prevalencia es superior a la obtenida por el grupo de Kapplinger et al que detectan esta variante en 5 individuos afectados de SB, 0,2%. En las familias afectadas, H222 y H72, encontramos una penetrancia del 28,6% y del 50,0% respectivamente de la mutación. En el caso de la tercera familia, H876, no se ha podido estimar la penetrancia por no disponer de las muestras de los familiares. Sin embargo si analizamos la penetrancia de la familia H72 por sexo y edad, los varones tienen una clara predominancia en la expresión del fenotipo, penetrancia del 40,0% frente a penetrancia 0% en mujeres. En el caso de la expresión en distintos grupos de edad no encontramos mucha diferencia 25,0% vs 33,3% (< 40 vs > 40 años). En dos de las familias existía historia de MS pero sólo en una de ellas se considera que hay afectación familiar. La mutación se publicó en 2003 por el grupo de Takahata et al (Takahata *et al.* 2003). Se han realizado estudios funcionales de esta variante resultando defectuosa al tránsito de la proteína a membrana (Valdivia *et al.* 2004). Los estudios *in vitro* revelan que puede ser rescatada por mexiletina, un antiarrítmico bloqueante de los canales rápidos de sodio cardíacos. El

diagnóstico genético en estas familias permitiría, a partir de estos resultados, valorar la indicación de un tratamiento específico.

El estudio familiar del polimorfismo frecuente H558R, revela la importancia del H558R en la expresión del fenotipo como se describen en otros artículos (Ye *et al.* 2003; Viswanathan *et al.* 2003). Nosotros hemos detectado este polimorfismo en nuestros casos índice con una frecuencia de aproximadamente un 30% lo que coincide con lo datos publicados por el grupo de Gouas *et al.* en raza caucásica (Gouas *et al.* 2005).

El alelo R558 en homocigosis se ha detectado en 3 familiares de los casos probando, todos portadores de mutación, dos casos en los que el sujeto era normal y otro patológico no diagnóstico. Dado el efecto modulador positivo junto con determinadas mutaciones del polimorfismo, debe ser la causa de que estos pacientes con genotipo positivo no muestren una clínica tan severa o sencillamente no muestren ningún rasgo de la patología. Cuando el polimorfismo se encuentra en homocigosis determina una expresión nula o más leve del fenotipo en las mutaciones E901K y E1152X. Sin embargo también está descrito el efecto modulador negativo de este polimorfismo, agravando el efecto de ciertas mutaciones (E161K, P1298L, and R1632H) o la no influencia de este sobre otras (L212P, T220I, DelF1617, T187I, R878C, G1408R, W1421X, K1578fs/52, R1623X) en pacientes afectados de “sick sinus syndrome” (Gui *et al.* 2010).

En casos de SIDS con mutaciones o variantes raras en el SCN5A se han encontrado diferencias significativas en la proporción del alelo R558 con respecto a controles (Arnestad *et al.* 2007).

Variantes comunes pueden provocar alteraciones subclínicas en la función de los canales iónicos, que se manifestarán únicamente en presencia de otros factores proarrítmicos como fármacos o la aterosclerosis (Albert *et al.* 2010). Recientemente se describe un polimorfismo común en el ancestro Europeo (rs11720524) en el intrón 1 que está asociado con la MS/arritmias independientemente de variables como el sexo o factores de riesgo.

Se han detectado dos variantes intrónicas de efecto incierto IVS8+21c>t y IVS14-17t>a. No se tiene información sobre el resto de familiares por lo que no se ha podido determinar si segregan o no con la enfermedad. Además el análisis con dos de

los programas de localización zonas intervinientes en el corte y empalme predicen que las variantes pueden afectar en la transcripción del ARNm, desapareciendo el punto de unión a las proteínas SRp40 y SC35 respectivamente. Aunque la zona en la que se localizan no corresponde a la región consenso (sitio aceptor: IVS-1, -2 o -3; sitio donador: IVS+1, +2, +3, +4 o +5) (Kapplinger *et al.* 2010) que interviene en el corte y empalme, en la actualidad se reconoce la relevancia de las regiones intrónicas en la causalidad genética de las enfermedades mendelianas, describiéndose algunas variantes relacionadas con la patología alejadas de la región consenso (Bezzina *et al.* 2006; Albert *et al.* 2010).

En muchos estudios se determina la relación de una variante, ya sea polimorfismo o mutación con la expresión o la predisposición a desarrollar el fenotipo clínico típico del SB o con mayor frecuencia presentar arritmias o MS.(Brugada 2001; Keating & Sanguinetti 2001; Makita *et al.* 2002; Yang *et al.* 2002; Hong *et al.* 2004a; Hong *et al.* 2005; Makielski & Valdivia 2005; Antzelevitch *et al.* 2005b; Makielski 2006; Bezzina *et al.* 2006; Plant *et al.* 2006; Tan 2006; Chung *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Watanabe *et al.* 2008; Rodriguez-Calvo *et al.* 2008; Lizotte *et al.* 2009; Kapa *et al.* 2009; Bai *et al.* 2009; Albert *et al.* 2010).

En el presente trabajo hemos observado que los pacientes portadores de mutación muestran un fenotipo más severo y un peor pronóstico. El 66,7% de portadores presentan ECG tipo I espontáneo frente al 52,9% de los no portadores. Existe evidencia de MS familiar en un 41,7% de portadores frente al 22,1% de no portadores.

Hasta la fecha no se han publicado series de pacientes en las que se realice una comparativa clínica entre portadores y no portadores de mutación en pacientes afectos de SB, sin embargo en un estudio familiar realizado por Schwartz *et al.* de 2009 sí lo analizan en una cohorte de pacientes recién nacidos con SQTL, el 76% de los familiares portadores de mutación se les detectó un alargamiento del QTc no identificado con anterioridad (Arnestad *et al.* 2007). En un estudio realizado por Hong *et al.* en 2004 de 147 individuos (de 4 familias distintas con mutación en SCN5A) con SB, en todos los que presentaban ECG tipo I espontáneo eran portadores de mutación (Hong *et al.* 2004b).

El tipo de mutación, la localización y la frecuencia alélica dependiendo de la etnia del sujeto que la presente son factores críticos a la hora de determinar la patogenicidad de variantes nuevas.

Dado que los polimorfismos, que están presentes frecuentemente en la población, están implicados en la variabilidad, la fisiología, la farmacología y en la fisiopatología del fenotipo (Viswanathan *et al.* 2003) entran en juego multitud de variables con las que poder dar explicación a un fenotipo determinado, como la epigenética, la evolución de la humanidad y el medio ambiente, relacionados en estudios recientes con la diversidad en la expresión del fenotipo (Hong *et al.* 2008; Bokil *et al.* 2010).

La baja prevalencia mutacional obtenida en el SCN5A no descarta otras posibilidades como la presencia de alguna alteración en la región promotora, sitios de “splicing” alternativo en zonas intrónicas no estudiadas, así como mutaciones en otros genes recientemente implicados en la enfermedad (CACNA1C, CACNB2, GPD1L, etc.) que forman parte de un gran complejo macromolecular de proteínas que interactúan con el canal de sodio (ChIPs) (Kapplinger *et al.* 2010). Aunque en principio podrían ser la causa génica de menos de un 10% de nuestra cohorte, no descartamos incluirlos en futuros estudios mutacionales en pacientes con SB.

Conclusiones

Conclusión 1

El estudio de secuenciación directa del gen SCN5A en nuestra población llevó a la identificación de mutaciones causales o probablemente causales en un 10% de los casos, inferior al publicado en la literatura.

Conclusión 2

No se ha identificado ningún reordenamiento génico mediante la técnica de MLPA.

Conclusión 3

Los pacientes con SB portadores de mutación en el gen SCN5A presentan con mayor frecuencia ECG tipo I espontáneo y más antecedentes de MS familiar que los pacientes con SB en los que el resultado del estudio genético fue negativo.

Conclusión 4

El estudio genético del gen SCN5A ha permitido identificar a un grupo significativo de portadores sin expresión fenotípica.

Conclusión 5

El estudio genético ha permitido concluir que la sensibilidad de los test de provocación empleados (flecainida) para identificar portadores es baja (~ 40%) aunque la especificidad es muy elevada.

Conclusión 6

La penetrancia de la enfermedad es baja, y es variable para las distintas mutaciones identificadas. La influencia de polimorfismos, como H558R, parece ser importante en la expresión del fenotipo.

Conclusión 7

La técnica de dHPLC a resultado eficaz para el cribado de muestras y acelerar el proceso de genotipado, presentando una sensibilidad en los exones optimizados del 100% para detectar individuos con variantes génicas.

Anexos

ANEXO I**ESTUDIO FAMILIAR DE SÍNDROME DE BRUGADA**

Algunas enfermedades del músculo cardíaco y algunas enfermedades del sistema eléctrico del corazón pueden condicionar la aparición de arritmias malignas en los individuos jóvenes. Entre las enfermedades del sistema eléctrico se encuentran el síndrome de Brugada y el Síndrome de QT largo. Hay otras enfermedades del músculo que también pueden causar arritmias malignas como la miocardiopatía hipertrófica, la miocardiopatía dilatada y la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho.

El Síndrome de Brugada es una enfermedad de los canales cardíacos de sodio, que puede aparecer por una mutación espontánea de los genes o bien transmitida de forma hereditaria por los padres. Esta enfermedad se reconoce por una alteración en el electrocardiograma, bien espontánea o bien producida por distintos estímulos (fármacos, fiebre, etc...) y permanece silente y asintomática en la mayoría de los pacientes. No obstante, algunos de los pacientes que sufren esta enfermedad pueden sufrir arritmias malignas que desemboquen en pérdida de conocimiento o incluso MS. A veces esta enfermedad afecta a varios individuos de la misma familia. El diagnóstico adecuado es preciso para realizar una correcta valoración del riesgo y comenzar un tratamiento preventivo eficaz.

Un familiar suyo ha sido diagnosticado de Síndrome de Brugada. Le ofrecemos la posibilidad de realizar una revisión que consideramos importante no sólo para usted, sino también para el resto de su familia. La revisión consistiría en la elaboración de una historia clínica (preguntas sobre sus síntomas y antecedentes clínicos), una exploración física (auscultación, etc...), un electrocardiograma y un electrocardiograma de 24 horas de duración (Holter). Es posible que además le aconsejemos la realización de una prueba de provocación con un fármaco para desenmascarar alteraciones ocultas en el electrocardiograma. Recogeremos una muestra de sangre para la realización de estudios bioquímicos y genéticos sobre esta enfermedad, los datos recogidos serán almacenados en soporte informático y se conservará una muestra de sangre congelada para realizar un posterior análisis.

[ANEXOS]

Para la realización de este estudio necesitaríamos su consentimiento. Agradeceríamos rellenara y firmara este documento. El médico firmante se responsabiliza de la confidencialidad de estos datos y asegura que nos serán utilizados con otro objetivo diferente al que le hemos explicado.

ESTUDIO FAMILIAR DE SÍNDROME DE BRUGADA

Yo D./Dña.....,
DNI:....., desearía formar parte del estudio de esta enfermedad, según las condiciones antes señaladas, y autorizo a los doctores Javier Lacunza Ruiz y Juan R. Gimeno Blanes para la realización de los análisis y pruebas oportunas.

Fdo:

Fecha:

Fdo: Dr. J Lacunza

Dr. J. R. Gimeno
(Médico responsable del estudio)

(Por favor, rellene los siguientes datos personales)

Datos personales:

Nombre y apellidos:

Dirección:

Fecha de nacimiento:Peso:Talla:

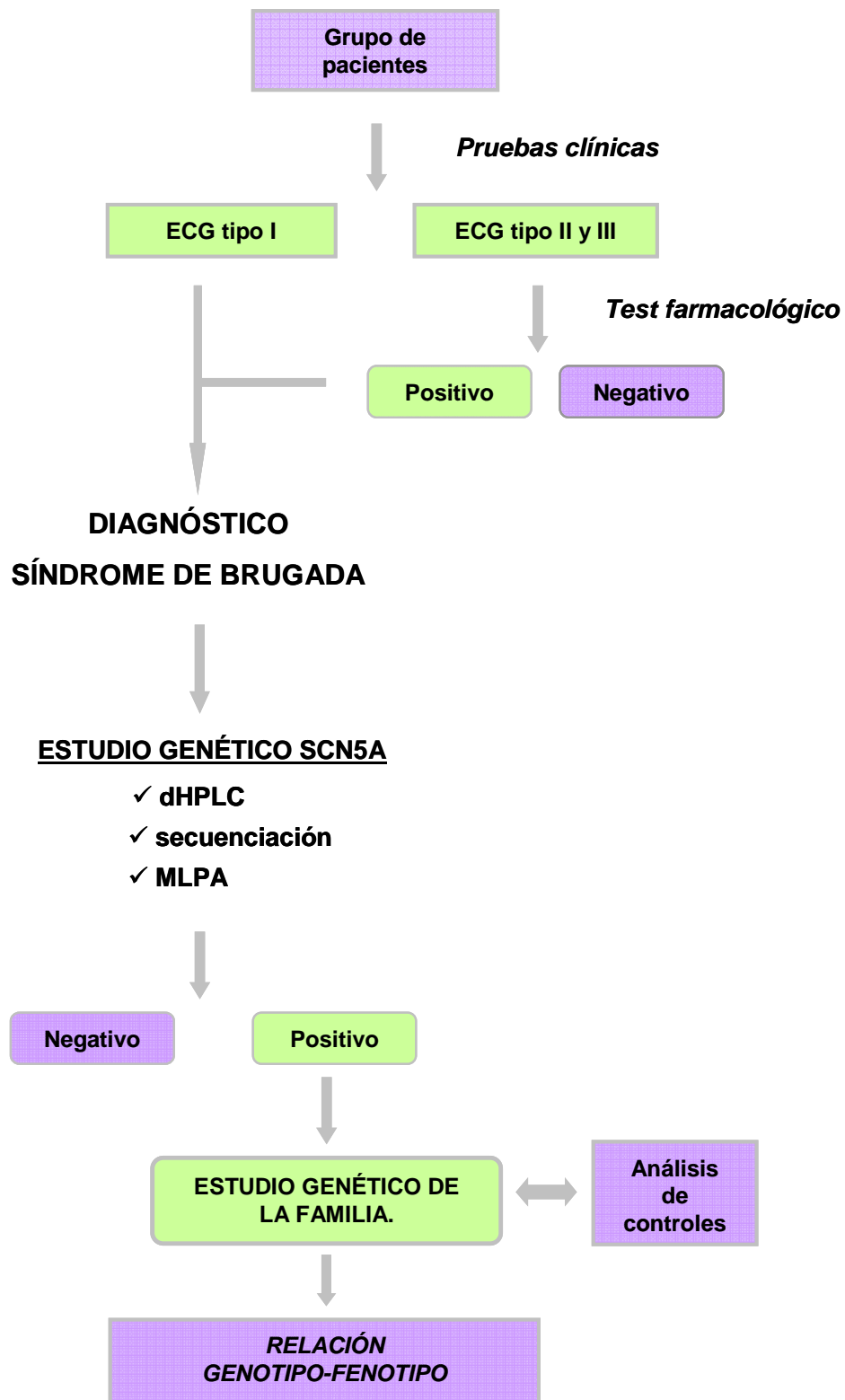
Telf. Domicilio:Telf. Trabajo:Telf. Móvil:

Centro de salud al que pertenece y dirección:
.....
.....

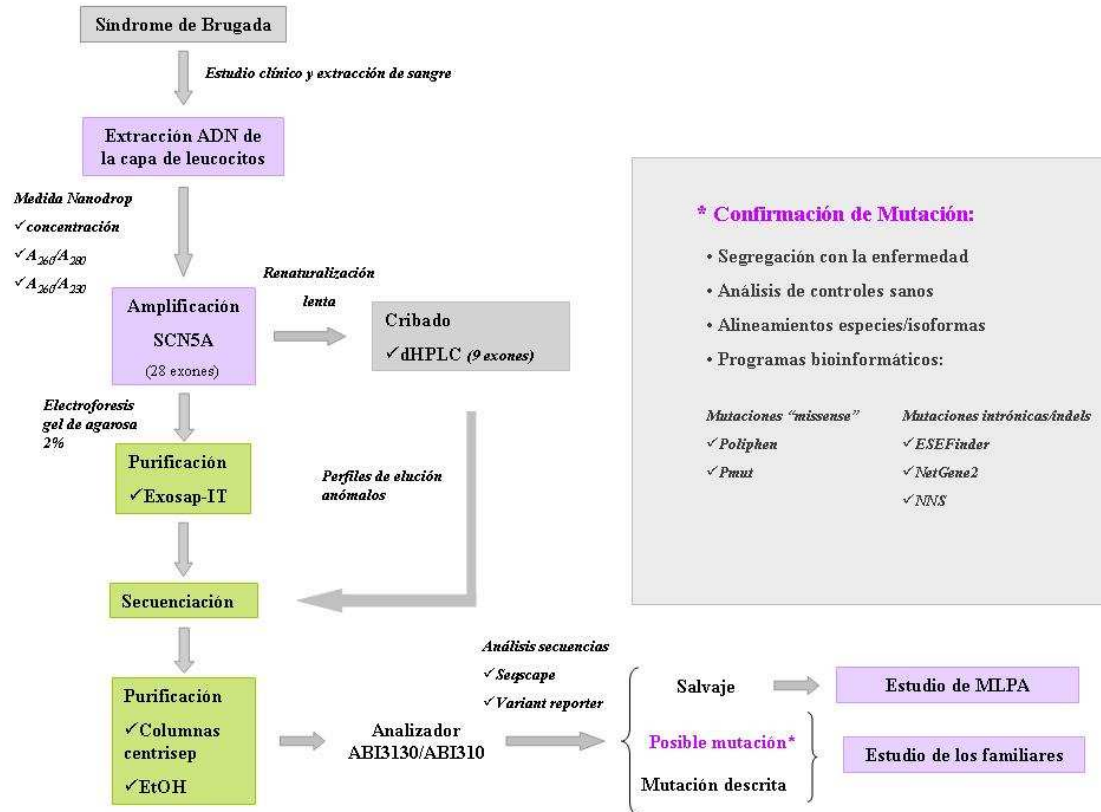
Nombre del médico de cabecera:
.....

Tratamiento que toma en la actualidad:
.....

ANEXO II



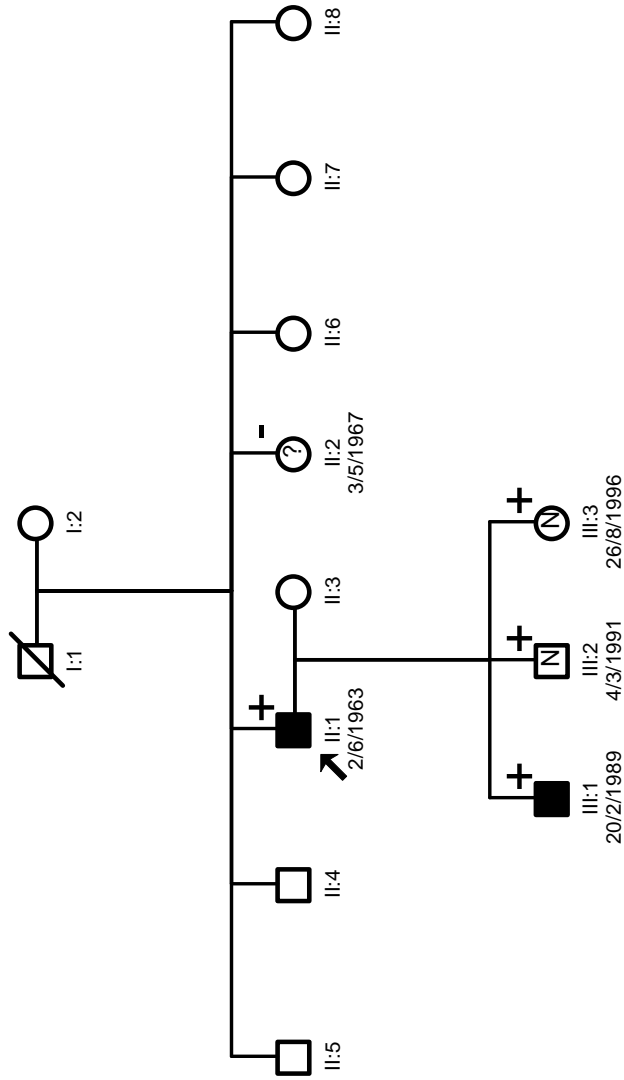
ANEXOIII



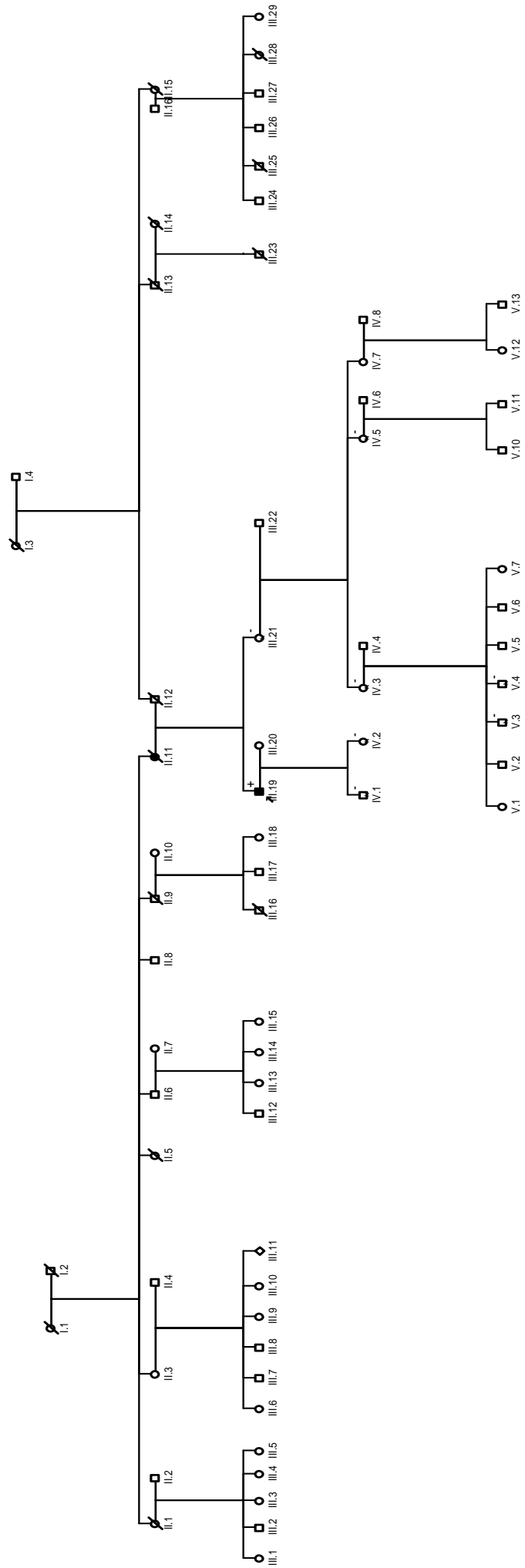
ANEXO IV

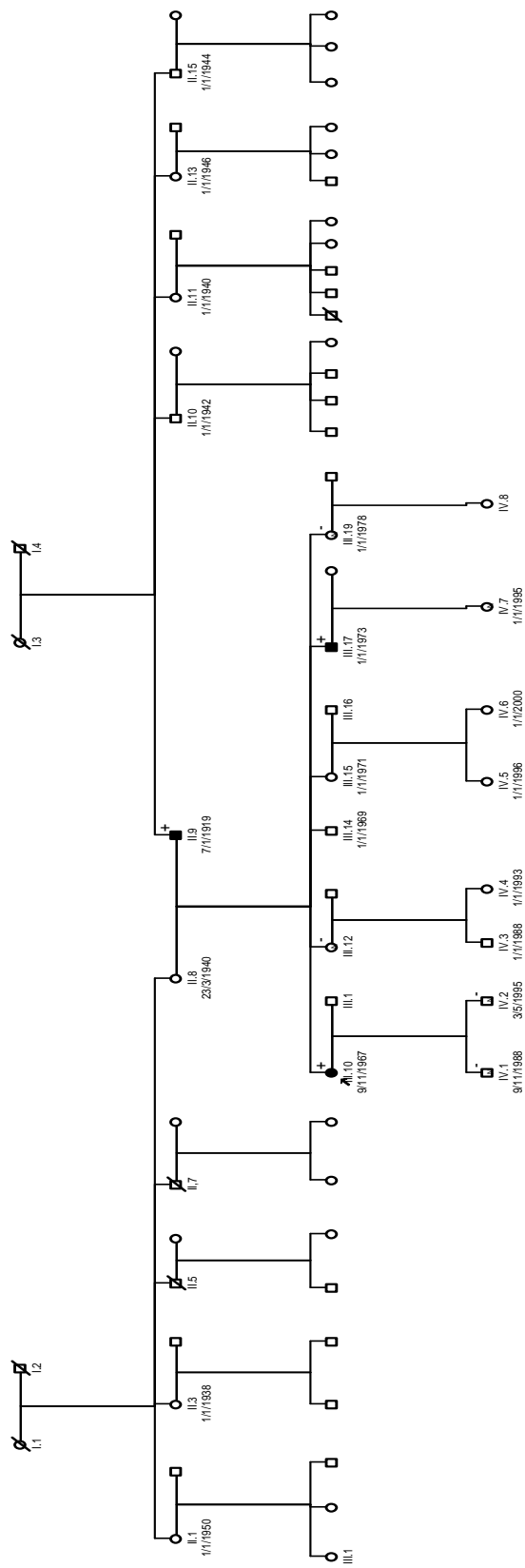
Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		reference	SCN5A
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
142 *	Reference probe 14199-L15813	2q13	
148	SCN5A probe 03564-L02930		Exon 16
154 *	Reference probe 14744-L16441	1q23	
160	SCN5A probe 03557-L09329		Exon 2
166 *	SCN5A probe 15391-L17222		Exon 18
172 *	Reference probe 10143-L10605	18q11	
178	SCN5A probe 03558-L02924		Exon 3
184	SCN5A probe 03566-L02932		Exon 20
190	SCN5A probe 07815-L07545		Exon 21
202	SCN5A probe 03559-L02925		Exon 4
209 *	SCN5A probe 15390-L17787		Exon 19
214	SCN5A probe 03567-L09330		Exon 22
222 *	Reference probe 05709-L15344	3q21	
229 *	SCN5A probe 15386-L17217		Exon 7
241	SCN5A probe 03568-L17788		Exon 23
247	SCN5A probe 07812-L09326		Exon 15
256	SCN5A probe 03561-L02927		Exon 8
265	SCN5A probe 03569-L02935		Exon 24
274 *	Reference probe 11358-L12083	12p13	
284	SCN5A probe 03562-L02928		Exon 10
292	SCN5A probe 03570-L02936		Exon 29
298 *	SCN5A probe 15388-L17790		Exon 5
305 *	SCN5A probe 15387-L17789		Exon 29
312 *	SCN5A probe 15380-L17791		Exon 12
319 *	SCN5A probe 15385-L17792		Exon 28
328 *	Reference probe 04132-L03489	9q34	
337	SCN5A probe 03579-L02940		Exon 1
346	SCN5A probe 03580-L02941		Exon 26
355	SCN5A probe 07813-L07543		Exon 17
364 *	Reference probe 07269-L06840	16q24	
373 *	SCN5A probe 15382-L17213		Exon 25
382	SCN5A probe 07808-L07538		Exon 9
391 *	SCN5A probe 15395-L17793		Exon 6
400 *	Reference probe 14204-L15818	11p15	
409 *	SCN5A probe 15392-L17223		Exon 13
418 *	SCN5A probe 15394-L17225		Exon 11
427	SCN5A probe 07817-L07547		Exon 27
436 *	SCN5A probe 15389-L17220		Exon 14
445 *	SCN5A probe 15383-L17214		upstream
453 *	Reference probe 11712-L12483	17q25	

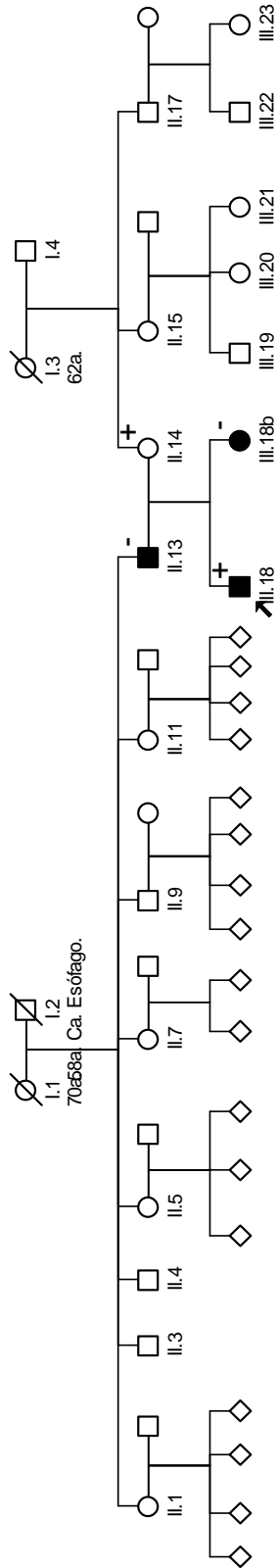
Length (nt)	SALSA MLPA probe	SCN5A exon	Ligation site NM_198056.2*	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next exon
		<i>start codon</i>	195-197 (exon 2)		
445	15383-L17214	upstream	1745 nt before exon 1	GAAACGTTGACA-CTGCCTGCACTT	2.1 kb
337 ±	03579-L02940	Exon 1	232 nt after exon 1	CGTCTCTAAACA-CCGTGCGCCCC	16.0 kb
160	03557-L09329	Exon 2	240-241	GCTTCCGAGGT-TCACACGGGAGT	2.9 kb
178	03558-L02924	Exon 3	528-529	CCAACGCCTTGT-ATGTCCTCAGTC	7.9 kb
202	03559-L02925	Exon 4	633-634	CCAACTGCGTGT-TCATGGCCAGC	1.6 kb
298	15388-L17790	Exon 5	794-793 reverse	GCCATGATAATC-ACACTAAAGTCC	6.9 kb
391 *	15395-L17793	Exon 6	890-891 in NM_001099404.1	ACTATTTTCACTT-ATCCCAGGTAAG	0.1 kb
229	15386-L17217	Exon 7	811-810 reverse	CAAATTCAGTTG-TGTATCTGTAAC	4.0 kb
256	03561-L02927	Exon 8 (7)	985-986	CCTCAGCGTCTT-TGCCCTCATCGG	1.7 kb
382	07808-L07538	Exon 9 (8)	1165-1166	CTCTGATGTGTT-ACTGTGTGGGAA	1.4 kb
284	03562-L02928	Exon 10 (9)	1248-1249	CCGACCACGGCT-ACACCAGCTTCG	0.7 kb
418	15394-L17225	Exon 11	1466-1467	CAAGCCACCATC-GCTGAGACCGAG	1.3 kb
312	15380-L17791	Exon 12	1706-1707	GATGGTCCCAGA-GCAATGGTAATC	0.9 kb
409	15392-L17223	Exon 13	1967-1968	CATGGCAAAAAG-AACAGCACTGTG	4.9 kb
436	15389-L17220	Exon 14	2201-2202	GTCAGCGTCCTC-ACCAGCGCACTG	1.1 kb
247	07812-L09326	Exon 15	2348-2349	ATGGACCCGTTT-ACTGACCTCACC	10.4 kb
148	03564-L02930	Exon 16 (15)	2596-2597	CCTGTCCCGCAT-GAGCAACTTGTC	1.7 kb
355	07813-L07543	Exon 17 (16)	2961-2962	TCTTGCTTGTTA-TGGTCATTGGCA	4.6 kb
166	15391-L17222	Exon 18	3262-3261 reverse	GTGTTTCCTTGC-GGGTGGGAGGCA	1.7 kb
209	15390-L17787	Exon 19a	3531-3532	GTGCATCTCAGG-CCGACTGGCGGC	2.7 kb
184	03566-L02932	Exon 20 (19)	3640-3641	CAACACCGCTGA-GCTCCTGGAGCA	1.4 kb
190	07815-L07545	Exon 21 (20)	3821-3822	TGGTTCGAGACA-TTCATCATCTTC	8.8 kb
214	03567-L09330	Exon 22 (21)	3936-3937	AGATGTTACAT-ATGTCTTCGTGC	4.0 kb
241	03568-L17788	Exon 23 (22)	4108-4109	ACTGCGGACGCT-GCGTGCACTCCG	2.2 kb
265	03569-L02935	Exon 24 (23)	4344-4345	ACAAGAGCCAGT-GTGAGTCCTTGA	2.9 kb
373	15382-L17213	Exon 25	46 nt before exon 25	GAAGCTCAAGCG-AGGTACAGAATT	0.8 kb
346	03580-L02941	Exon 26 (25)	4550-4549 reverse	AAGATGATGAAA-ATGACAAAATAG	0.8 kb
427	07817-L07547	Exon 27 (26)	5 nt before exon 27	GTGCCTTCTCTT-TGCACCTTAGGGG	1.3 kb
319	15385-L17792	Exon 28	4800-4799 reverse	GCAGATCAGAAA-CATGATGGTGAC	3.0 kb
292	03570-L02936	Exon 29 (28)	5035-5036	CATCATCCAGAA-GTACTTCTTCTC	0.8 kb
305	15387-L17789	Exon 29	5846-5845 reverse	GAGATCTTGGAT-GGGTTGGCTGCC	
		<i>stop codon</i>	6243-6245		

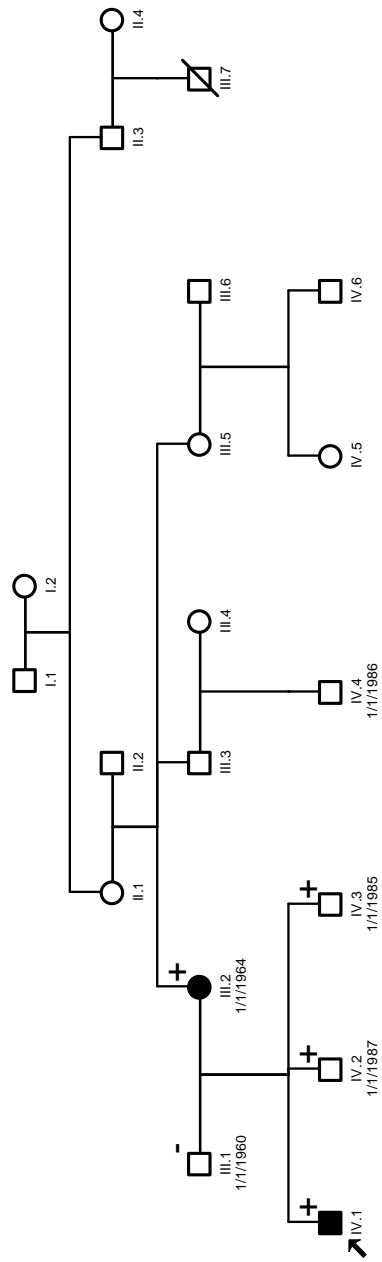


H95

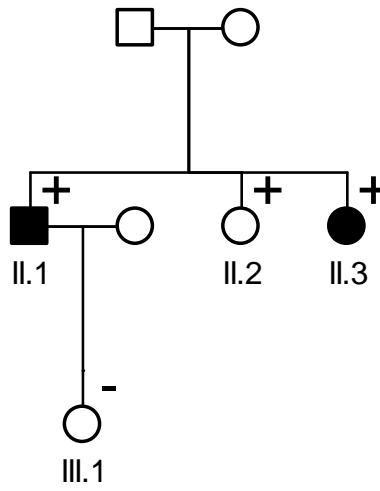




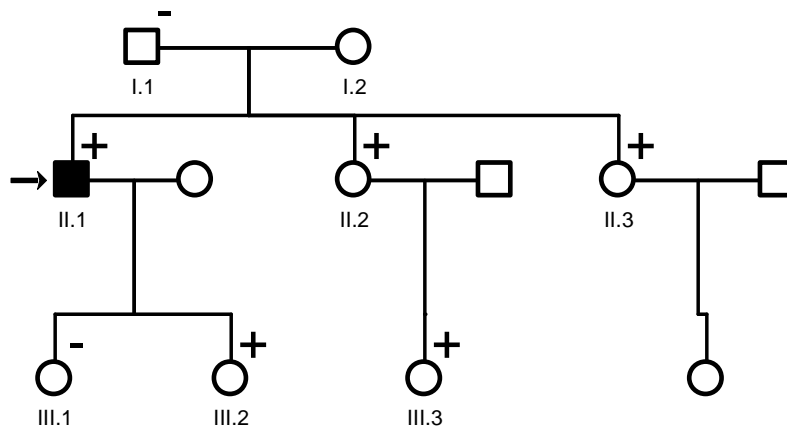


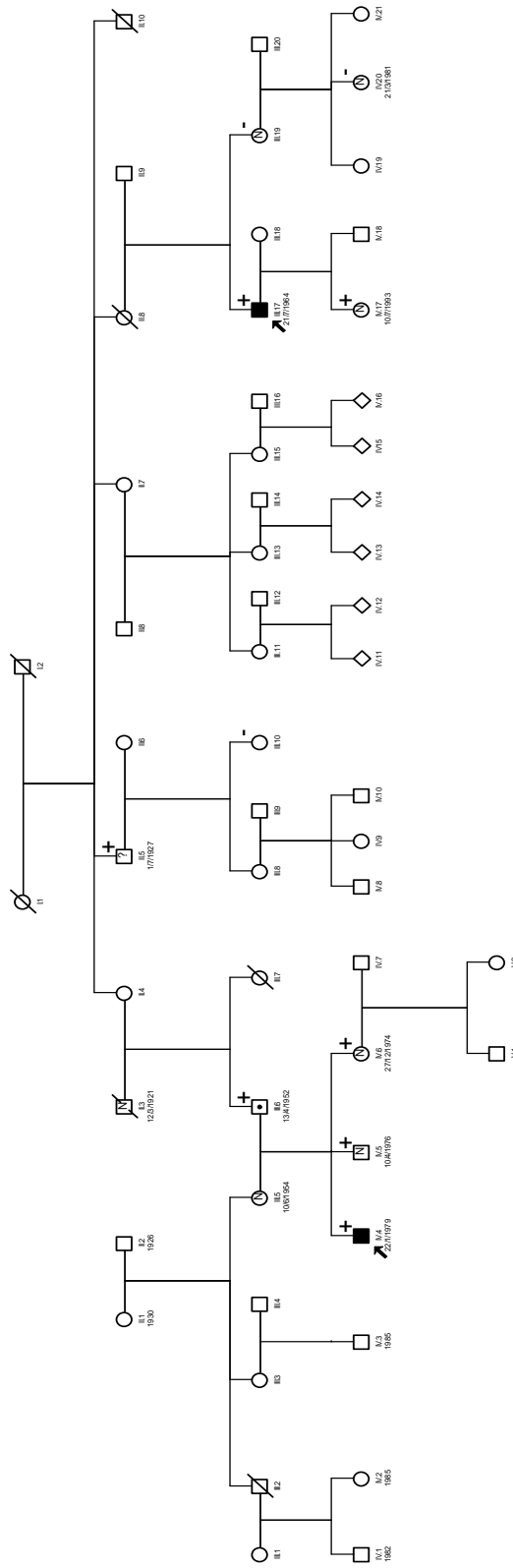


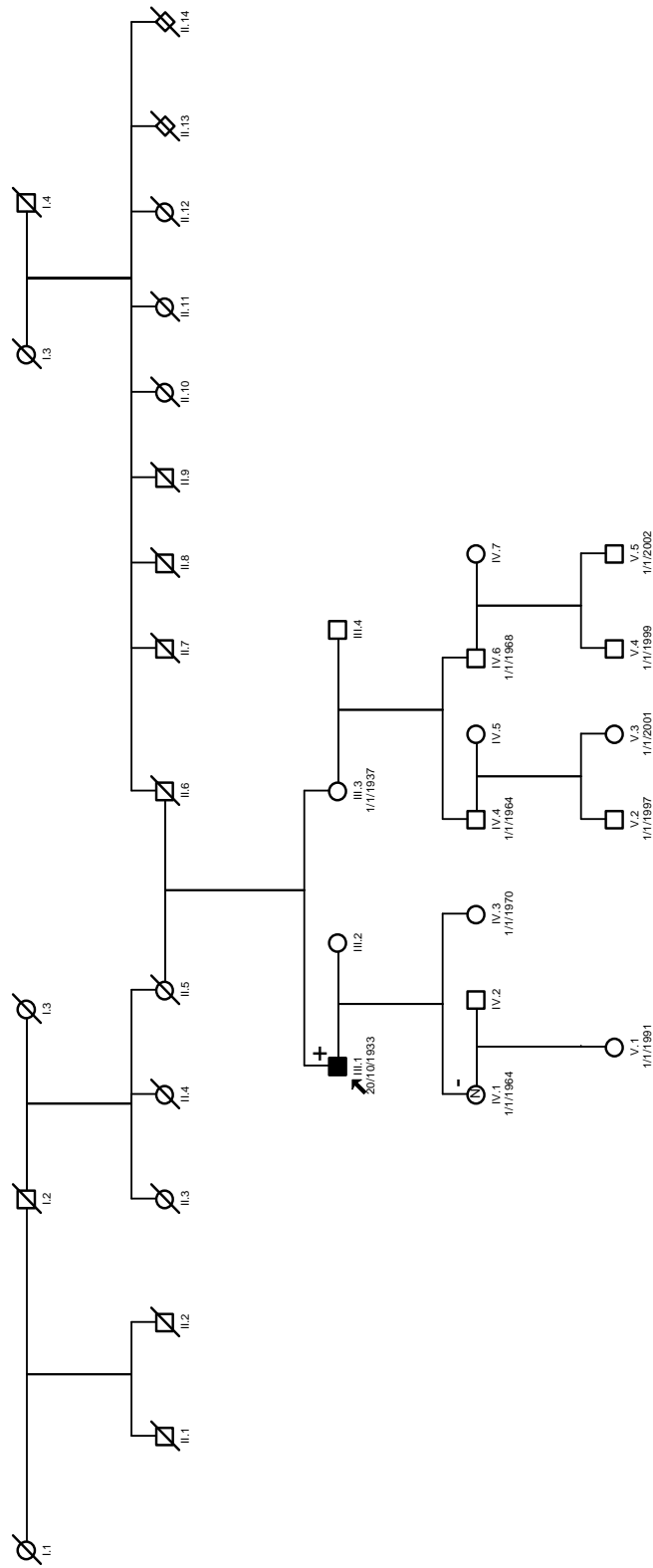
H684



H598







Referencias

1. Akhtar, M., and N. F. Goldschlager, 2006. Brugada electrocardiographic pattern due to tricyclic antidepressant overdose. *J Electrocardiol.* 39: 336-339.
2. Albert, C. M., C. A. MacRae, D. I. Chasman, M. VanDenburgh, J. E. Buring et al. 2010. Common variants in cardiac ion channel genes are associated with sudden cardiac death. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol* 3: 222-229.
3. Alfonso Vega. Fisiopatología de los canales sensibles al voltaje. *Avance y Perspectiva* 20. 2001.
4. Amirali & Massumi. Inherited Arrhythmic Disorders: Long QT and Brugada Syndromes. *Tex Heart Inst J.*2007; 34(1): 67-75. 34(1), 67-75.
5. Andres R., Cader G. & Goldman P. Net potassium movement between resting muscle and plasma in man in the basal state and during the night. *J Clin.Invest* 36, 723-729. 1957.
6. Antzelevitch, C., 2007b. Heterogeneity and cardiac arrhythmias: an overview. *Heart Rhythm.* 4: 964-972.
7. Antzelevitch, C., 2006. Brugada syndrome. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 29: 1130-1159.
8. Antzelevitch, C., 2007a. Genetic basis of Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* 4: 756-757.
9. Antzelevitch, C., P. Brugada, M. Borggrefe, J. Brugada, R. Brugada et al. 2005a. Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart Rhythm.* 2: 429-440.
10. Antzelevitch, C., P. Brugada, J. Brugada, and R. Brugada, 2005b. Brugada syndrome: from cell to bedside. *Curr.Probl.Cardiol.* 30: 9-54.
11. Antzelevitch, C., and R. Brugada, 2002. Fever and Brugada syndrome. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 25: 1537-1539.
12. Antzelevitch, C., G. D. Pollevick, J. M. Cordeiro, O. Casis, M. C. Sanguinetti et al. 2007. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 115: 442-449.
13. Antzelevitch C. Brugada syndrome:From bench to bedside. 2005.

[Referencias]

14. Arnestad, M., L. Crotti, T. O. Rognum, R. Insolia, M. Pedrazzini et al. 2007. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115: 361-367.
15. Bai, R., C. Napolitano, R. Bloise, N. Monteforte, and S. G. Priori, 2009. Yield of genetic screening in inherited cardiac channelopathies: how to prioritize access to genetic testing. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol* 2: 6-15.
16. Baroudi, G., S. Acharfi, C. Larouche, and M. Chahine, 2002. Expression and intracellular localization of an SCN5A double mutant R1232W/T1620M implicated in Brugada syndrome. *Circ.Res.* 90: E11-E16.
17. Beaufort-Krol, G. C., M. P. van den Berg, A. A. Wilde, J. P. van Tintelen, J. W. Viersma et al. 2005. Developmental aspects of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome on the basis of a single SCN5A mutation in childhood. *J Am.Coll.Cardiol.* 46: 331-337.
18. Belhassen, B., A. Glick, and S. Viskin, 2004. Efficacy of quinidine in high-risk patients with Brugada syndrome. *Circulation* 110: 1731-1737.
19. Benito, B., J. Brugada, R. Brugada, and P. Brugada, 2009. Brugada syndrome. *Rev.Esp.Cardiol.* 62: 1297-1315.
20. Benito, B., R. Brugada, J. Brugada, and P. Brugada, 2008a. Brugada syndrome. *Prog.Cardiovasc Dis.* 51: 1-22.
21. Benito, B., A. Sarkozy, L. Mont, S. Henkens, A. Berruezo et al. 2008b. Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome. *J Am.Coll.Cardiol.* 52: 1567-1573.
22. Bezzina, C. R., M. B. Rook, W. A. Groenewegen, L. J. Herfst, A. C. van der Wal et al. 2003. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ.Res.* 92: 159-168.
23. Bezzina, C. R., W. Shimizu, P. Yang, T. T. Koopmann, M. W. Tanck et al. 2006. Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation* 113: 338-344.
24. Bokil, N. J., J. M. Baisden, D. J. Radford, and K. M. Summers, 2010. Molecular genetics of long QT syndrome. *Mol.Genet.Metab* 101: 1-8.

25. Brugada P, P. S. G., and C. Napolitano, 2005. Should patients with an asymptomatic Brugada electrocardiogram undergo pharmacological and electrophysiological testing? *Circulation* 112: 279-292.
26. Brugada, J., R. Brugada, C. Antzelevitch, J. Towbin, K. Nademanee et al. 2002. Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* 105: 73-78.
27. Brugada, J., R. Brugada, and P. Brugada, 2003. Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation* 108: 3092-3096.
28. Brugada, P., and J. Brugada, 1992. 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.* 20: 1391-1396.
29. Brugada, P., J. Brugada, and R. Brugada, 2000a. Arrhythmia induction by antiarrhythmic drugs. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 23: 291-292.
30. Brugada, R., 2001. Single nucleotide polymorphisms and life-threatening arrhythmias: causal or casual? *J Cardiovasc.Electrophysiol.* 12: 1230-1231.
31. Brugada, R., J. Brugada, C. Antzelevitch, G. E. Kirsch, D. Potenza et al. 2000b. Sodium Channel Blockers Identify Risk for Sudden Death in Patients With ST-Segment Elevation and Right Bundle Branch Block but Structurally Normal Hearts. *Circulation* 101: 510-515.
32. Catterall, W. A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
33. Celesia, G. G., 2001. Disorders of membrane channels or channelopathies. *Clin.Neurophysiol.* 112: 2-18.
34. Chen, Q., G. E. Kirsch, D. Zhang, R. Brugada, J. Brugada et al. 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392: 293-296.
35. Chenevix-Trench, G., S. Healey, S. Lakhani, P. Waring, M. Cummings et al. 2006. Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res.* 66: 2019-2027.

[Referencias]

36. Chung, S. K., J. M. MacCormick, C. H. McCulley, J. Crawford, C. A. Eddy et al. 2007. Long QT and Brugada syndrome gene mutations in New Zealand. *Heart Rhythm*. 4: 1306-1314.
37. Cormier, J. W., I. Rivolta, M. Tateyama, A. S. Yang, and R. S. Kass, 2002. 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*. 277: 9233-9241.
38. Delpon E et al. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ.Arrhythmia Electrophysiol*.vol.1, 209-218, 2008.
39. Di Diego JM, Cordeiro J.M. & Goodrow RJ. Ionic and celular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 106, 2004-2011. 2002.
40. Dumaine, R., J. A. Towbin, P. Brugada, M. Vatta, D. V. Nesterenko et al. 1999. Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ.Res*. 85: 803-809.
41. Eastaugh, L. J., P. A. James, D. G. Phelan, and A. M. Davis, 2011. Brugada Syndrome Caused by a Large Deletion in SCN5A Only Detected by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *J Cardiovasc Electrophysiol*.
42. Eckardt, L., V. Probst, J. P. Smits, E. S. Bahr, C. Wolpert et al. 2005. Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome. *Circulation* 111: 257-263.
43. Fahmi, A. I., M. Patel, E. B. Stevens, A. L. Fowden, J. E. John, III et al. 2001. The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *J Physiol* 537: 693-700.
44. Ficker, E., C. A. Obejero-Paz, S. Zhao, and A. M. Brown, 2002. The binding site for channel blockers that rescue misprocessed human long QT syndrome type 2 ether-a-gogo-related gene (HERG) mutations. *J Biol.Chem*. 277: 4989-4998.
45. Fozzard, H. A., 2002. Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc.Res*. 55: 1-8.

46. Francis, J., and C. Antzelevitch, 2005. Brugada syndrome. *Int.J Cardiol.* 101: 173-178.
47. Frustaci, A., S. G. Priori, M. Pieroni, C. Chimenti, C. Napolitano et al. 2005. Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* 112: 3680-3687.
48. Gallano P. Técnicas de diagnóstico molecular. *Neurol Supl* 1(3), 14-18. 2005.
49. Garcia-Castro, M., C. Garcia, J. R. Reguero, A. Miar, J. M. Rubin et al. 2010. The spectrum of SCN5A gene mutations in Spanish Brugada syndrome patients. *Rev.Esp.Cardiol.* 63: 856-859.
50. Gargus, J. J., 2003. Unraveling monogenic channelopathies and their implications for complex polygenic disease. *Am.J Hum.Genet* 72: 785-803.
51. George, A. L., Jr., 2005. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin.Invest* 115: 1990-1999.
52. Goldgar, D. E., D. F. Easton, A. M. Deffenbaugh, A. N. Monteiro, S. V. Tavtigian et al. 2004. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am.J Hum Genet.* 75: 535-544.
53. Gouas, L., V. Nicaud, M. Berthet, A. Forhan, L. Tiret et al. 2005. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur.J Hum.Genet* 13: 1213-1222.
54. Grant, A. O., 2001. Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am.J Med.* 110: 296-305.
55. Gui, J., T. Wang, D. Trump, T. Zimmer, and M. Lei, 2010. Mutation-Specific Effects of Polymorphism H558R in SCN5A-Related Sick Sinus Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* .
56. Haack, B., S. Kupka, M. Ebauer, A. Siemiatkowska, M. Pfister et al. 2004. Analysis of candidate genes for genotypic diagnosis in the long QT syndrome. *J Appl.Genet.* 45: 375-381.

57. Herfst, L. J., F. Potet, C. R. Bezzina, W. A. Groenewegen, M. H. Le et al. 2003. Na⁺ channel mutation leading to loss of function and non-progressive cardiac conduction defects. *J Mol.Cell Cardiol.* 35: 549-557.
58. Hermida, J. S., J. L. Lemoine, F. B. Aoun, G. Jarry, J. L. Rey et al. 2000. Prevalence of the brugada syndrome in an apparently healthy population. *Am.J Cardiol.* 86: 91-94.
59. Hodgking, A. L., and A. F. Huxley, 1952. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 140: 177-183.
60. Hong, K., A. Berruezo-Sanchez, N. Pongvarin, A. Oliva, M. Vatta et al. 2004a. Phenotypic characterization of a large European family with Brugada syndrome displaying a sudden unexpected death syndrome mutation in SCN5A. *J Cardiovasc.Electrophysiol.* 15: 64-69.
61. Hong, K., J. Brugada, A. Oliva, A. Berruezo-Sanchez, D. Potenza et al. 2004b. Value of electrocardiographic parameters and ajmaline test in the diagnosis of Brugada syndrome caused by SCN5A mutations. *Circulation* 110: 3023-3027.
62. Hong, K., A. Guerchicoff, G. D. Pollevick, A. Oliva, R. Dumaine et al. 2005. Cryptic 5' splice site activation in SCN5A associated with Brugada syndrome. *J Mol.Cell Cardiol.* 38: 555-560.
63. Hong, L., K. Wu, and D. Fan, 2008. Letter by Hong et al regarding article, "Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation". *Circulation* 118: e668.
64. Hu D. et al. A mutation in the beta-3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ.Cardiovasc.Genet.* vol.2, 270-278, 2009. [PubMed: 20031595].
65. Huang, H., J. Zhao, F. Z. Barrane, J. Champagne, and M. Chahine, 2006. Nav1.5/R1193Q polymorphism is associated with both long QT and Brugada syndromes. *Can.J Cardiol.* 22: 309-313.
66. Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* . 2001.

67. Kamakura, S., T. Ohe, K. Nakazawa, Y. Aizawa, A. Shimizu et al. 2009. Long-term prognosis of probands with Brugada-pattern ST-elevation in leads V1-V3. *Circ.Arrhythm.Electrophysiol* 2: 495-503.
68. Kambouris, N. G., H. B. Nuss, D. C. Johns, E. Marban, G. F. Tomaselli et al. 2000. A revised view of cardiac sodium channel "blockade" in the long-QT syndrome. *J.Clin.Invest* 105: 1133-1140.
69. Kapa, S., D. J. Tester, B. A. Salisbury, C. Harris-Kerr, M. S. Pungliya et al. 2009 Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 120: 1752-1760.
70. Kapplinger, J. D., D. J. Tester, M. Alders, B. Benito, M. Berthet et al. 2010. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 7: 33-46.
71. Kasanuki, H., S. Ohnishi, M. Ohtuka, N. Matsuda, T. Nirei et al. 1997. Idiopathic ventricular fibrillation induced with vagal activity in patients without obvious heart disease. *Circulation* 95: 2277-2285.
72. Kazarinova-Noyes, K., J. D. Malhotra, D. P. McEwen, L. N. Mattei, E. O. Berglund et al. 2001. Contactin associates with Na⁺ channels and increases their functional expression. *J.Neurosci*. 21: 7517-7525.
73. Keating, M. T., and M. C. Sanguinetti, 2001. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104: 569-580.
74. Khan, A., S. Mittal, and M. V. Sherrid, 2009. Current review of Brugada syndrome: from epidemiology to treatment. *Anadolu.Kardiyol.Derg.* 9 Suppl 2: 12-16.
75. Koopmann, T. T., L. Beekman, M. Alders, P. G. Meregalli, M. M. Mannens et al. 2007. Exclusion of multiple candidate genes and large genomic rearrangements in SCN5A in a Dutch Brugada syndrome cohort. *Heart Rhythm*. 4: 752-755.
76. Kostopoulou, A., M. Koutelou, G. Theodorakis, A. Theodorakos, E. Livanis et al. 2010. Disorders of the Autonomic Nervous System in Patients With Brugada Syndrome: A Pilot Study. *J Cardiovasc Electrophysiol* .

77. Krittayaphong, R., G. Veerakul, K. Nademanee, and C. Kangkagate, 2003. Heart rate variability in patients with Brugada syndrome in Thailand. *Eur.Heart J* 24: 1771-1778.
78. Kum LCC, Fung JWH & Sanderson JE. Brugada syndrome unmasked by febrile illness. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 25, 1660-1661. 2002.
79. Kumar, D., 2008. Disorders of the genome architecture: a review. *Genomic.Med.* 2: 69-76.
80. Kyndt, F., V. Probst, F. Potet, S. Demolombe, J. C. Chevallier et al. 2001. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 104: 3081-3086.
81. Liang, P., W. Liu, C. Li, W. Tao, L. Li et al. 2010. Genetic analysis of Brugada syndrome and congenital long-QT syndrome type 3 in the Chinese. *J Cardiovasc Dis.Res.* 1: 69-74.
82. Litovsky, S. H., and C. Antzelevitch, 1990. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular subendocardium and subepicardium to acetylcholine and isoproterenol. A direct effect of acetylcholine in ventricular myocardium. *Circ.Res.* 67: 615-627.
83. Lizotte, E., M. J. Junttila, M. P. Dube, K. Hong, B. Benito et al. 2009. Genetic modulation of brugada syndrome by a common polymorphism. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 20: 1137-1141.
84. London, B., M. Michalec, H. Mehdi, X. Zhu, L. Kerchner et al. 2007. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 116: 2260-2268.
85. Loo, T. W., and D. M. Clarke, 1997. Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J Biol.Chem.* 272: 709-712.
86. Lovelock, P. K., S. Healey, W. Au, E. Y. Sum, A. Tesoriero et al. 2006. Genetic, functional, and histopathological evaluation of two C-terminal BRCA1 missense variants. *J Med.Genet.* 43: 74-83.
87. Makielski, J. C., 2006. SIDS: genetic and environmental influences may cause arrhythmia in this silent killer. *J Clin.Invest* 116: 297-299.

88. Makielski, J. C., and C. R. Valdivia, 2005. Arrhythmia mutations in non-coding region of SCN5A: implications for genetic screening. *J Mol.Cell Cardiol.* 38: 551-553.
89. Makita, N., M. Horie, T. Nakamura, T. Ai, K. Sasaki et al. 2002. Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. *Circulation* 106: 1269-1274.
90. Martinez, H., L. Montano, L. Rodriguez-Ospina, Z. Campos, M. Muniz et al. 2008. A case of Brugada syndrome in a 63 y/o man with chest pain. *Bol.Asoc.Med.P.R.* 100: 86-88.
91. Matsuo, K., T. Kurita, M. Inagaki, M. Kakishita, N. Aihara et al. 1999. The circadian pattern of the development of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Eur.Heart J* 20: 465-470.
92. Meregalli, P. G., J. M. Ruijter, N. Hofman, C. R. Bezzina, A. A. Wilde et al. 2006. Diagnostic value of flecainide testing in unmasking SCN5A-related Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17: 857-864.
93. Millat, G., V. Chanavat, C. Rodriguez-Lafrasse, and R. Rousson, 2009. Rapid, sensitive and inexpensive detection of SCN5A genetic variations by high resolution melting analysis. *Clin.Biochem.* 42: 491-499.
94. Millat, G., P. Chevalier, L. Restier-Miron, C. A. Da, P. Bouvagnet et al. 2006. Spectrum of pathogenic mutations and associated polymorphisms in a cohort of 44 unrelated patients with long QT syndrome. *Clin.Genet* 70: 214-227.
95. Miyasaka, Y., H. Tsuji, K. Yamada, S. Tokunaga, D. Saito et al. 2001. Prevalence and mortality of the Brugada-type electrocardiogram in one city in Japan. *J Am.Coll.Cardiol.* 38: 771-774.
96. Mizumaki, K., A. Fujiki, K. Nishida, J. Iwamoto, T. Sakamoto et al. 2007. Postprandial augmentation of bradycardia-dependent ST elevation in patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18: 839-844.
97. Mizumaki, K., A. Fujiki, T. Tsuneda, M. Sakabe, K. Nishida et al. 2004. Vagal activity modulates spontaneous augmentation of ST elevation in the daily life of patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 15: 667-673.

[Referencias]

98. Morello, J. P., A. Salahpour, A. Laperriere, V. Bernier, M. F. Arthus et al. 2000. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin. Invest* 105: 887-895.
99. Morgan, K., E. B. Stevens, B. Shah, P. J. Cox, A. K. Dixon et al. 2000. Beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 2308-2313.
100. Moric, E., E. Herbert, M. Trusz-Gluza, A. Filipecki, U. Mazurek et al. 2003. The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (SCN5A). *Europace*. 5: 325-334.
101. Morita H & Kusano-Fukushima k. Atrial Fibrillation and Atrial Vulnerability in Patients With Brugada Syndrome. 40, 1437-1444. 2002.
102. Morita H, Nagase S & Kusano k. Spontaneous T wave alternans and premature ventricular contractions during febrile illness in a patient with Brugada syndrome. *Electrophysiol*. 13, 816-818. 2002.
103. Nademanee, K., 1997. Sudden unexplained death syndrome in Southeast Asia. *Am.J Cardiol*. 79: 10-11.
104. Napolitano, C., and S. G. Priori, 2006. Brugada syndrome. *Orphanet.J Rare.Dis*. 1: 35.
105. Nerbonne JM and Guo W. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* . 2002.
106. Nerbonne, J. M., and R. S. Kass, 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 85: 1205-1253.
107. Nimannit S & Malasit P . Pathogenesis of unexplained nocturnal death and endemic distal renal tubular acidosis. 338, 930-932. 1991.
108. Nishizaki, M., H. Sakurada, T. Ashikaga, N. Yamawake, H. Fujii et al. 2003. Effects of glucose-induced insulin secretion on ST segment elevation in the Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14: 243-249.

109. Niu, D. M., B. Hwang, H. W. Hwang, N. H. Wang, J. Y. Wu et al. 2006. A common SCN5A polymorphism attenuates a severe cardiac phenotype caused by a nonsense SCN5A mutation in a Chinese family with an inherited cardiac conduction defect. *Journal of Medical Genetics* 43: 817-821.
110. Noda T & Shimizu W. ST-segment elevation and ventricular fibrillation without coronary spasm by intracoronary injection of acetylcholine and/or ergonovine maleate in patients with Brugada syndrome. *J Am.Coll.Cardiol.* 40, 1841-1847. 2002.
111. Nogami, A., M. Nakao, S. Kubota, A. Sugiyasu, H. Doi et al. 2003. Enhancement of J-ST-segment elevation by the glucose and insulin test in Brugada syndrome. *Pacing Clin.Electrophysiol* 26: 332-337.
112. Nunn, L., J. Bhar-Amato, and P. Lambiase, 2010. Brugada syndrome: Controversies in Risk stratification and Management. *Indian Pacing Electrophysiol J* 10: 400-409.
113. O'Donovan, M. C., P. J. Oefner, S. C. Roberts, J. Austin, B. Hoogendoorn et al. 1998. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 52: 44-49.
114. Ogawa R et al. A novel microsatellite polymorphism of sodium channel beta1-subunit gene (SCN1B) may underlie abnormal cardiac excitation manifested by coved-type ST-elevation compatible with Brugada syndrome in Japanese. 2010.
115. Ong, B. H., G. F. Tomaselli, and J. R. Balsler, 2000. A structural rearrangement in the sodium channel pore linked to slow inactivation and use dependence. *J.Gen.Physiol* 116: 653-662.
116. Papadatos, G. A., P. M. Wallerstein, C. E. Head, R. Ratcliff, P. A. Brady et al. 2002. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 6210-6215.
117. Patane, S., F. Marte, F. C. La Rosa, A. Albanese, R. R. La et al. 2010. Revelation of Brugada electrocardiographic pattern during a febrile state. *Int.J Cardiol.* 140: e19-e21.
118. Plant, L. D., P. N. Bowers, Q. Liu, T. Morgan, T. Zhang et al. 2006. A common cardiac sodium channel variant associated with sudden infant death in African Americans, SCN5A S1103Y. *J Clin.Invest* 116: 430-435.

[Referencias]

119. Podrid, P. J., T. Fuchs, and R. Candinas, 1990. Role of the sympathetic nervous system in the genesis of ventricular arrhythmia. *Circulation* 82: I103-I113.
120. Porres JM, Brugada J. & Urbistondo V. Fever unmasking Brugada syndrome. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 25, 1646-1648. 2002.
121. Priori, S. G., C. Napolitano, M. Gasparini, C. Pappone, B. P. Della et al. 2002. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 105: 1342-1347.
122. Probst, V., I. Denjoy, P. G. Meregalli, J. C. Amirault, F. Sacher et al. 2007. Clinical aspects and prognosis of Brugada syndrome in children. *Circulation* 115: 2042-2048.
123. Ramirez JM. et al. Mlpa en el estudio de desórdenes genómicos. *Revista médica Universitaria* . 2009.
124. Roden, D. M., J. R. Balsler, A. L. George, Jr., and M. E. Anderson, 2002. Cardiac ion channels. *Annu.Rev.Physiol* 64: 431-475.
125. Rodriguez-Calvo, M. S., M. Brion, C. Allegue, L. Concheiro, and A. Carracedo, 2008. Molecular genetics of sudden cardiac death. *Forensic Sci.Int.* 182: 1-12.
126. Rudy, Y., and J. R. Silva, 2006. Computational biology in the study of cardiac ion channels and cell electrophysiology. *Q.Rev.Biophys.* 39: 57-116.
127. Samani, K., G. Wu, T. Ai, M. Shuraih, N. S. Mathuria et al. 2009. A novel SCN5A mutation V1340I in Brugada syndrome augmenting arrhythmias during febrile illness. *Heart Rhythm.* 6: 1318-1326.
128. Santana, L. F., A. M. Gomez, and W. J. Lederer, 1998. Ca²⁺ flux through promiscuous cardiac Na⁺ channels: slip-mode conductance. *Science* 279: 1027-1033.
129. Saura D, Garcia-Alberola A & Carrillo P P.D. Brugada-like electrocardiographic pattern induced by fever. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 25, 856-859. 2002.
130. Schulze-Bahr, E., L. Eckardt, G. Breithardt, K. Seidl, T. Wichter et al. 2003. Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada

syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum.Mutat.* 21: 651-652.

131. Schwartz, P. J., S. G. Priori, E. H. Locati, C. Napolitano, F. Cantu et al. 1995. Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation* 92: 3381-3386.

132. Sellner, L. N., and G. R. Taylor, 2004. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum.Mutat.* 23: 413-419.

133. Shang, L. L., A. E. Pfahnl, S. Sanyal, Z. Jiao, J. Allen et al. 2007. Human heart failure is associated with abnormal C-terminal splicing variants in the cardiac sodium channel. *Circ.Res.* 101: 1146-1154.

134. Shimizu, W., T. Aiba, and C. Antzelevitch, 2005. Specific therapy based on the genotype and cellular mechanism in inherited cardiac arrhythmias. Long QT syndrome and Brugada syndrome. *Curr.Pharm.Des* 11: 1561-1572.

135. Shimizu, W., and S. Kamakura, 2001. Catecholamines in children with congenital long QT syndrome and Brugada syndrome. *J Electrocardiol.* 34 Suppl: 173-175.

136. Smits, J. P., L. Eckardt, V. Probst, C. R. Bezzina, J. J. Schott et al. 2002. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am.Coll.Cardiol.* 40: 350-356.

137. Song M, Helgera G & Eghbali M et al. Remodeling of Kv 4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol.Chem.* 276, 31883-31890. 2001.

138. Spurdle, A. B., F. J. Couch, F. B. Hogervorst, P. Radice, and O. M. Sinilnikova, 2008. Prediction and assessment of splicing alterations: implications for clinical testing. *Hum Mutat.* 29: 1304-1313.

139. Sugai, M., 1959. A pathological study on sudden and unexpected death, especially on the cardiac death autopsied by medical examiners in Tokyo. *Acta Pathol.Jpn.* 9(Suppl): 723-752.

140. Syrris, P., A. Murray, N. D. Carter, W. M. McKenna, and S. Jeffery, 2001. Mutation detection in long QT syndrome: a comprehensive set of primers and PCR conditions. *J Med.Genet.* 38: 705-710.
141. Takahata, T., N. Yasui-Furukori, S. Sasaki, T. Igarashi, K. Okumura et al. 2003. Nucleotide changes in the translated region of SCN5A from Japanese patients with Brugada syndrome and control subjects. *Life Sci.* 72: 2391-2399.
142. Takigawa, M., T. Noda, W. Shimizu, K. Miyamoto, H. Okamura et al. 2008. Seasonal and circadian distributions of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* 5: 1523-1527.
143. Tan, B. H., C. R. Valdivia, B. A. Rok, B. Ye, K. M. Ruwaldt et al. 2005. Common human SCN5A polymorphisms have altered electrophysiology when expressed in Q1077 splice variants. *Heart Rhythm.* 2: 741-747.
144. Tan, B. H., C. R. Valdivia, C. Song, and J. C. Makielski, 2006. Partial expression defect for the SCN5A missense mutation G1406R depends on splice variant background Q1077 and rescue by mexiletine. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 291: H1822-H1828.
145. Tan, H. L., 2006. Sodium channel variants in heart disease: expanding horizons. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1: S151-S157.
146. Tan, H. L., M. T. Bink-Boelkens, C. R. Bezzina, P. C. Viswanathan, G. C. Beaufort-Krol et al. 2001. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 409: 1043-1047.
147. Tan, H. L., S. Kupersmidt, R. Zhang, S. Stepanovic, D. M. Roden et al. 2002. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* 415: 442-447.
148. Tanaka, H., O. Kinoshita, S. Uchikawa, H. Kasai, M. Nakamura et al. 2001. Successful prevention of recurrent ventricular fibrillation by intravenous isoproterenol in a patient with Brugada syndrome. *Pacing Clin.Electrophysiol* 24: 1293-1294.
149. Tavtigian, S. V., M. S. Greenblatt, F. Lesueur, and G. B. Byrnes, 2008. In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum Mutat.* 29: 1327-1336.

150. Tavtigian, S. V., P. B. Samollow, S. D. de, and A. Thomas, 2006. An analysis of unclassified missense substitutions in human BRCA1. *Fam.Cancer* 5: 77-88.
151. Tchernitchko, D., M. Goossens, and H. Wajcman, 2004. In silico prediction of the deleterious effect of a mutation: proceed with caution in clinical genetics. *Clin.Chem* 50: 1974-1978.
152. Tester, D. J., and M. J. Ackerman, 2009. Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children. *Annu.Rev.Med.* 60: 69-84.
153. Toshihisa Miyazakia. Autonomic and Antiarrhythmic Drug Modulation of ST Segment Elevation in Patients With Brugada Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* Volume 27, Issue 5, April 1996. Pages 1061-1070.
154. Ueda K. et al. Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia. *J Hum Genet.*2009 Feb;54(2):115-21.Epub 2009 Jan 23.
155. Valdivia, C. R., M. J. Ackerman, D. J. Tester, T. Wada, J. McCormack et al. 2002. A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cardiovasc.Res.* 55: 279-289.
156. Valdivia, C. R., D. J. Tester, B. A. Rok, C. B. Porter, T. M. Munger et al. 2004. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc.Res.* 62: 53-62.
157. Vatta, M., R. Dumaine, G. Varghese, T. A. Richard, W. Shimizu et al. 2002. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum.Mol.Genet* 11: 337-345.
158. Vaughn, C. P., E. Lyon, and W. S. Samowitz, 2008. Confirmation of single exon deletions in MLH1 and MSH2 using quantitative polymerase chain reaction. *J Mol.Diagn.* 10: 355-360.
159. Veldkamp, M. W., P. C. Viswanathan, C. Bezzina, A. Baartscheer, A. A. Wilde et al. 2000. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel. *Circ.Res.* 86: E91-E97.
160. Viswanathan, P. C., D. W. Benson, and J. R. Balser, 2003. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin.Invest* 111: 341-346.

[Referencias]

161. Viswanathan, P. C., C. R. Bezzina, A. L. George, Jr., D. M. Roden, A. A. Wilde et al. 2001. Gating-dependent mechanisms for flecainide action in SCN5A-linked arrhythmia syndromes. *Circulation* 104: 1200-1205.
162. Wang, Li & Shen. Genomic Organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* 34[0236], 9-16. 1996.
163. Wang, D. W., R. R. Desai, L. Crotti, M. Arnestad, R. Insolia et al. 2007. Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115: 368-376.
164. Watanabe, H., T. T. Koopmann, S. S. Le, T. Yang, C. R. Ingram et al. 2008. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin. Invest* 118: 2260-2268.
165. Weiss, R., M. M. Barmada, T. Nguyen, J. S. Seibel, D. Cavlovich et al. 2002. Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation* 105: 707-713.
166. Wilde, A. A., C. Antzelevitch, M. Borggrefe, J. Brugada, R. Brugada et al. 2002. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation* 106: 2514-2519.
167. Wolpert, C., C. Echternach, C. Veltmann, C. Antzelevitch, G. P. Thomas et al. 2005. Intravenous drug challenge using flecainide and ajmaline in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2: 254-260.
168. Xiao Z. et al. Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem* . 1999.
169. Xiong, W., Y. Z. Farukhi, Y. Tian, D. Disilvestre, R. A. Li et al. 2006. A conserved ring of charge in mammalian Na⁺ channels: a molecular regulator of the outer pore conformation during slow inactivation. *J Physiol* 576: 739-754.
170. Yamaki, M., N. Sato, M. Okada, S. Fujita, K. Go et al. 2009. A case of Brugada syndrome in which diurnal ECG changes were associated with circadian rhythms of sex hormones. *Int. Heart J* 50: 669-676.
171. Yang GX A.C. Celular basis for the brugada syndrome and other mechanism arritmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* 100, 1660-1666. 1999.

172. Yang, P., H. Kanki, B. Drolet, T. Yang, J. Wei et al. 2002. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation* 105: 1943-1948.
173. Yap, Y. G., E. R. Behr, and A. J. Camm, 2009. Drug-induced Brugada syndrome. *Europace*. 11: 989-994.
174. Ye, B., C. R. Valdivia, M. J. Ackerman, and J. C. Makielski, 2003. A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiol Genomics* 12: 187-193.
175. Yu, F. H., and W. A. Catterall, 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4: 207.
176. Zhang, Y., H. A. Hartmann, and J. Satin, 1999. Glycosylation influences voltage-dependent gating of cardiac and skeletal muscle sodium channels. *J Membr.Biol.* 171: 195-207.
177. Zhou, Z., Q. Gong, and C. T. January, 1999. Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects. *J Biol.Chem.* 274: 31123-31126.
178. Zimmer, T., C. Biskup, C. Bollensdorff, and K. Benndorf, 2002. The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr.Biol.* 186: 13-21.