



Caracterización Genético Molecular de Familias Mexicanas con Síndrome de QT Largo y Alto Riesgo de Muerte Súbita

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias, desarrolló la alumna

Argelia Medeiros Domingo

*En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México*

Tutora:

Dra. Ma. Teresa Tusié Luna

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Comité Tutoral:

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez

Facultad de Medicina, UNAM

Patrocinadores:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Fundación Mexicana para la Salud



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

En el desarrollo de este trabajo, encontré colegas que me hicieron el camino llevadero, ellos merecen mención especial en esta tesis pues fueron nutrientes clave para la conclusión de este esfuerzo. Desde la concepción del proyecto, hubo gente entusiasta a mi alrededor que brindó su apoyo; en este sentido, quisiera agradecer al Dr. Pedro Iturralde, del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” quien me impulsó a estudiar el Síndrome de QT Largo, me introdujo con todos los pacientes que presento en esta tesis, y pacientemente, discutió conmigo cada caso. Buscando donde aterrizar las ideas, llegué con la Dra. Teresa Tusié Luna en el Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”; ella siempre creyó en este proyecto, aceptó ser mi tutora y desde el primer día me abrió las puertas de su laboratorio donde encontré una privilegiada y extraordinaria plataforma para realizar investigación. Gracias Tere por dejarme pensar y no limitar los caminos en el desempeño de este trabajo. En su laboratorio conocí a gente excepcional, a quienes siempre estaré agradecida, entre ellos el Dr. Samuel Canizales Quinteros quien día con día tuvo la paciencia de sentarse conmigo y explicarme conceptos de Biología Molecular; hizo atinadas sugerencias al proyecto y sin tener la obligación, siempre estuvo al tanto de mis avances. El Técnico Salvador Ramírez, buscó reiteradamente la manera de ayudarme, compartió conmigo su habilidad en las técnicas que necesitaba aprender y en el proceder cotidiano, siempre encontré en él un apoyo. La Dra. Teresa Villarreal compartió conmigo las distintas emociones derivadas de los resultados surgentes, estuvo conmigo los días

buenos y malos; la Secretaria Verónica Martínez fue clave en todos los trámites necesarios para el desarrollo de este trabajo, nadie podría hacerlo mejor que ella, gracias por la buena disposición e invaluable ayuda.

No puedo olvidar a la gente que cada seis meses escuchó pacientemente mis avances, me refiero al Comité Tutoral; integrado por el Dr. Gerardo Gamba y la Dra. Laura Escobar. La aguda crítica del Dr. Gamba me hizo pensar mas profundo y no quedarme con conceptos ya reportados. La Dra. Escobar siempre me hizo ver que no sabía tanto de electrofisiología celular como debiera. Las críticas de ambos permitieron pulir este estudio.

Cuando el proyecto empezó a tomar forma, encontramos que colaborar con algunos laboratorios del extranjero líderes en el tema, sería de gran utilidad. En este sentido fue una gran experiencia trabajar con el Dr. Michael J, Ackerman, director del laboratorio de Genómica de la Muerte Súbita “Windland Smith Rice” de la Clínica Mayo, Rochester MN; quien en forma entusiasta aceptó colaborar con nosotros desde la primera conversación, y su brillante Técnico, David Tester; de ellos he aprendido mas de lo que esperaba.

Finalmente debo agradecer a los 12 pacientes y familiares, motivo de esta tesis, con la esperanza de que los hallazgos derivados de esta investigación pronto repercutan en su bienestar.

Contenido

Introducción	5
Capítulo I	9
<i>El Síndrome de QT Largo</i>	
Capítulo II	31
<i>El Síndrome de QT Largo, estudio en una Cohorte Mexicana</i>	
Capítulo III	41
<i>La subunidad β_4 del canal de sodio (SCN4B), nueva proteína implicada en el Síndrome de QT Largo</i>	
Capítulo IV	59
<i>Fenotipo Clínico y Caracterización Funcional de la delección en región N-terminal (R34Fs/60- SCN5A) del canal de sodio Na_v1.5</i>	
Capítulo V	71
<i>Implicaciones clínicas y biofísicas de la delección en la región C-Terminal (L1821Fs/10-SCN5A) del canal de sodio Na_v1.5</i>	
Discusión General.	85
Agradecimientos	91
Apéndice	93

Introducción

El Síndrome de QT Largo (SQTL) se caracteriza por una grave alteración en la repolarización ventricular, manifestada en el electrocardiograma (ECG) por un alargamiento en el intervalo QT¹ (QTc >44 ms en hombres y >46 ms en mujeres. QTc=QT/√RR) que predispone a arritmias ventriculares malignas –taquicardia helicoidal– y muerte súbita². El corazón en estos pacientes es estructuralmente normal, salvo algunas excepciones. Los afectados tienen un cuadro clínico muy variable: pueden cursar asintomáticos, presentar síncope recurrente o bien muerte súbita como primera manifestación de la enfermedad³. Inicialmente se catalogó como un trastorno raro, y efectivamente, la presentación grave de la enfermedad es esporádica. No obstante, los estudios genéticos han podido estimar una incidencia de mutaciones de 1/3000³; este trastorno presenta mas bien un gran espectro clínico, los casos asintomáticos son quizá los mas frecuentes. Estos casos presentarán síntomas sólo en determinadas situaciones, como exposición a fármacos que interactúan con los canales iónicos cardíacos^{4, 5}, desequilibrio hidroelectrolítico o situaciones de estrés. La presentación mas grave de la enfermedad es la muerte súbita, misma que se define como la ocurrida de forma natural, inesperada y rápida (<1hr) en personas sin datos previos de enfermedad grave hasta el inicio de los síntomas⁶. La principal causa de muerte súbita es la car-

diopatía isquémica, pero en el 5 -10% de los afectados en población general y el 30% en población joven (<35 años), el corazón no muestra alteraciones macroscópicas⁷. En este grupo de individuos hay que descartar una canalopatía arritmogénica como probable causa de la muerte⁸.

Planteamiento del Problema

El SQTL fue identificado como canalopatía arritmogénica en 1995^{9, 10}, representa la primera canalopatía cardíaca en describirse, desde entonces y hasta la fecha, se han descrito 9 genes asociados al SQTL. El entendimiento genético-molecular de este trastorno ha permitido desarrollar tratamiento específico y generar una correlación fenotipo-genotipo¹¹ en la cual se puede pronosticar el canal afectado una vez realizada la evaluación clínica detallada¹². Si bien los avances en la materia en los últimos 10 años han sido sorprendentes, todavía en un 25% de los casos no ha sido posible identificar alteraciones en los genes conocidos, por lo que deben existir otras proteínas implicadas en este síndrome¹³. En forma reciente, se le ha dado especial atención a las proteínas que interactúan y modulan los canales iónicos¹³; también han llamado la atención los polimorfismos en dichos canales que si bien inicialmente se consideraron “benignos”¹⁴, ahora se sabe que desempeñan un papel importante modulando la gravedad del

fenotipo¹⁵. Se ha establecido que estos polimorfismos tienen una distribución étnica diferente, algunos de ellos se encuentran en población negra¹⁶, otros en población asiática o caucásica¹⁷. No sabemos la frecuencia con que cada uno de estos genes y polimorfismos participa en nuestra población; el presente trabajo constituye el primer esfuerzo realizado para explorar este aspecto.

Hipótesis

1. En población mexicana mestiza existen variantes en los canales iónicos diferentes a las observadas en otras poblaciones.
2. El fenotipo grave encontrado en la población seleccionada, se traduce en mutaciones localizadas en sitios o vías funcionales clave del canal iónico afectado.

Objetivos del Estudio

1. Identificar las mutaciones responsables en una cohorte mexicana con SQTl catalogada como de alto riesgo de muerte súbita.
2. Identificar posibles nuevas mutaciones en este grupo.
3. Identificar y estudiar familias donde ninguno de los genes conocidos asociados al SQTl participen.
4. Estudiar el efecto funcional de algunas de las mutaciones nuevas identificadas.

Estrategias y Métodos

Este proyecto se desarrolló en 3 fases:

Fase 1

Caracterización Genético Molecular de 12 familias mexicanas con SQTl.

Entre Junio del 2004 y abril del 2005, 12 casos con SQTl con fenotipo severo fueron

detectados. Posterior a la firma de consentimiento informado, se procedió a realizar: historia clínica, prueba de esfuerzo, monitoreo Holter 24hrs y electrocardiograma. Se obtuvo muestra sanguínea para extracción de DNA de linfocitos periféricos de los casos índice y familiares que aceptaron participar en el proyecto. Se estudiaron las regiones codificantes de los 9 genes asociados a SQTl por medio de PCR y secuenciación directa en las 12 familias. Todos los cambios no sinónimos se buscaron en al menos en 200 controles (400 alelos de referencia).

Fase 2

Consistió en la búsqueda de nuevos genes posiblemente asociados a la enfermedad en los casos con fenotipo positivo pero genotipo negativo: Se identificaron 4 familias con fenotipo positivo pero sin mutaciones en los genes asociados a SQTl hasta la fecha; el abordaje en estos casos fue el siguiente: determinación del probable canal afectado basado en el fenotipo, selección de genes candidatos. Dependiendo del tamaño del gen y el análisis de la estructura familiar, se utilizó secuenciación directa y/o ligamiento genético.

Fase 3

Durante esta fase se realizó la expresión funcional de algunas de las variantes encontradas y no reportadas en la literatura previamente; utilizando un modelo heterólogo de expresión ampliamente aceptado para el estudio de mutaciones que se sospechan generan trastornos en el ritmo y/o conducción cardiaca. Por medio de mutagénesis dirigida se construyeron algunas de las mutaciones encontradas y se expresaron en células HEK293 para el estudio electrofisiológico utilizando de la técnica de *patch clamp*.

La presente tesis está estructurada a manera de capítulos, mismos que representan las conclusiones más importantes derivadas de este trabajo. En el **capítulo I** se expone una revisión amplia del tema, base del desarrollo del proyecto de investigación. El **capítulo II** presenta en detalle los resultados generales iniciales del proyecto

que marcaron la trayectoria a seguir. Los **capítulos III, IV y V** constituyen el análisis detallado de selectos resultados que constituyen quizá las aportaciones más importantes de la tesis (resultados Fase 2 y 3). La metodología específica para abordar cada uno de los planteamientos se detalla en cada capítulo.

Referencias

- Hofman N, Wilde AA, Kaab S, et al. Diagnostic criteria for congenital long QT syndrome in the era of molecular genetics: do we need a scoring system? *Eur Heart J* 2007; 28(5):575-80.
- Kass RS, Moss AJ. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 2003; 112(6):810-5.
- Ackerman MJ. Cardiac channelopathies: it's in the genes. *Nat Med* 2004; 10(5):463-4.
- De Bruin ML, van Puijenbroek EP, Bracke M, et al. Pharmacogenetics of drug-induced arrhythmias: a feasibility study using spontaneous adverse drug reactions reporting data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006; 15(2): 99-105.
- Fenichel RR, Malik M, Antzelevitch C, et al. Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15(4):475-95.
- Rubart M, Zipes DP. Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest* 2005; 115(9):2305-15.
- Zipes DP. Epidemiology and mechanisms of sudden cardiac death. *Can J Cardiol* 2005; 21 Suppl A:37A-40A.
- Lopshire JC, Zipes DP. Sudden cardiac death: better understanding of risks, mechanisms, and treatment. *Circulation* 2006; 114(11):1134-6.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; 80(5):805-11.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996; 12(1):17-23.
- Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; 103(1):89-95.
- Ackerman MJ. Genotype-phenotype relationships in congenital long QT syndrome. *J Electrocardiol* 2005; 38(4 Suppl):64-8.
- Meadows LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 2005; 67(3):448-58.
- Anson BD, Ackerman MJ, Tester DJ, et al. Molecular and functional characterization of common polymorphisms in HERG (KCNH2) potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(6):H2434-41.
- Tan BH, Valdivia CR, Rok BA, et al. Common human SCN5A polymorphisms have altered electrophysiology when expressed in Q1077 splice variants. *Heart Rhythm* 2005; 2(7):741-7.
- Burke A, Creighton W, Mont E, et al. Role of SCN5A Y1102 polymorphism in sudden cardiac death in blacks. *Circulation* 2005; 112(6):798-802.
- Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, et al. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2004; 1(5):600-7.

CAPÍTULO I

El síndrome de QT largo

Publicado en:

Rev Inv Clin 2007;59(2):57-72.

Nuevas Perspectivas en el Síndrome de QT Largo

Definición y Perspectiva Histórica

El síndrome de QT largo (SQTL) se caracteriza por una grave alteración en la repolarización ventricular traducida en el electrocardiograma (ECG) por un alargamiento en el intervalo QT que predispone a arritmias ventriculares malignas -*torsade de pointes*- y muerte súbita. Fue descrito clínicamente y electrocardiográficamente en 1957¹ por los doctores Anton Jervell y Fred Lange Nielsen quienes publicaron sus estudios en una familia de padres no consanguíneos con 6 hijos, cuatro de los cuales tenían sordera congénita y episodios sincopales, tres de ellos tuvieron muerte súbita. El electrocardiograma (ECG) de los casos mostraba un intervalo QT inusualmente largo. Ambos padres cursaban asintomáticos, tenían un ECG normal y no presentaban problemas de audición. En 1964, Romano y Ward publicaron en forma independiente un síndrome cardíaco familiar caracterizado por síncope recurrente, antecedente familiar de muerte súbita, prolongación del intervalo QT sin sordera neuronal². Los estudios genéticos posteriores mostraron que el síndrome descrito por Jervell y Lange

Nielsen, que se acompaña de sordera neuronal congénita, corresponde a mutaciones homocigotas, con fenotipo muy grave y alto riesgo de muerte súbita. Por otro lado, el síndrome conocido como Romano-Ward corresponde a mutaciones generalmente heterocigotas, los pacientes no presentan trastornos en la audición y la gravedad de la enfermedad es muy variable. Después de casi medio siglo, en 1995^{3,4} se describieron los principales genes asociados a la enfermedad; el SQTL se reconoció por primera vez como una canalopatía cardíaca; constituye la primera en ser descrita como tal y es quizá, la canalopatía arritmogénica mejor estudiada hasta la fecha. El cuadro clínico es muy variable: el paciente puede cursar asintomático, presentar síncope recurrente, crisis convulsivas o bien muerte súbita como primera manifestación de la enfermedad. Inicialmente se catalogó como un trastorno raro, y efectivamente, la presentación grave de la enfermedad es esporádica pero la incidencia de las mutaciones se estima en 1/3000 casos⁵, cerca del 32% de los portadores asintomáticos pueden tener un QTc en límites normales, transmiten la enfermedad a un 50% de su descendencia, son

más susceptibles a desarrollar arritmias malignas comparados con el resto de la población y hasta un 20% pueden volverse sintomáticos⁶.

El SQTl presenta gran heterogeneidad genética, se han identificado ya más de 500 mutaciones distribuidas en hasta ahora 9 genes: *KCNQ1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *ANKB*, *KCNJ2*, *CACNA1*, y *CAV3*. A pesar de los avances en la materia, 25-30% de los pacientes, permanecen sin diagnóstico genético^{7,8}. Es una enfermedad de presentación principalmente monogénica⁶, las variedades poligénicas o compuestas suelen dar un fenotipo más grave; la penetrancia es muy variable, entre el 25 y 90%⁹ y ocasionalmente puede haber variaciones en la expresividad de la enfermedad -diversos fenotipos dados por una misma mutación-.

Los estudios genéticos moleculares desarrollados en los últimos 11 años, han permitido realizar una importante correlación genotipo-fenotipo y orientar así el tratamiento; también se han hecho interesantes observaciones en cuanto a susceptibilidad individual a desarrollar arritmias al estudiar los efectos de polimorfismos frecuentes en la población, lo que ha motivado gran interés, sobretodo en el área de fármaco genómica.

Clasificación del Síndrome de QT Largo

Conceptos Generales

La clasificación utilizada en el pasado se basa en la presentación homocigota o heterocigota de la enfermedad, dando lugar a los Síndromes de Jervell-Lange Nielsen (con sordera) y Romano Ward (sin sordera). La clasificación actual enfatiza los hallazgos genéticos, como se ilustra en la tabla 1. En 1995-1996, se describieron los 3 principales genes asociados a la enferme-

dad; codifican para unidades formadoras del poro de los canales de potasio I_{Ks} e I_{Kr} y de sodio $Na_v1.5$; explican cerca del 65% de los casos. Si bien en los años subsecuentes se han añadido 7 genes más a la lista, estos explican tan solo cerca del 5% de los casos, 25% aún permanecen sin diagnóstico genético.

Los canales iónicos son proteínas transmembranales encargadas de transportar iones a través de la membrana celular; los canales implicados en el SQTl son selectivos o especializados en el transporte de un solo ión y dependientes de voltaje. Los fenómenos eléctricos y contráctiles que suceden en el cardiomiocito, son controlados por estas estructuras. Los canales iónicos forman complejos macromoleculares, existe una unidad principal formadora del poro del canal y proteínas auxiliares que lo regulan. La afección en la función de un canal en el SQTl se puede dar en estos dos sitios, en la proteína principal o en las proteínas regulatorias (**Tabla 1.1**).

La afección en la unidad formadora del poro, conocida como alfa, genera los tres subtipos más comunes de SQTl: SQTl1 (afección en canal de potasio I_{Ks}), SQTl2 (afección en canal de potasio I_{Kr}) y SQTl3 (afección en canal de sodio); siendo los más frecuentes, han sido mejor caracterizados clínicamente y genéticamente, en la tabla 2 se describe la correlación fenotipo-genotipo de estas 3 principales formas. El Síndrome llamado Jervell-Lange-Nielsen, corresponde en la actualidad a las variedades de SQTl 1 y 5, característicamente los pacientes cursan con sordera congénita y tienen mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas que afectan la corriente I_{Ks} , el Romano Ward abarca de la variedad SQTl 1 a la 9 y los pacientes no cursan con sordera.

Tabla 1.1 Genes Involucrados en el SQT

Romano-Ward (Autosómico Dominante)

Tipo	Locus	Gen	Proteína	Corriente	Efecto	Frecuencia (%)
SQT1	11p15,5	<i>KCNQ1/KVLQT1</i>	Principal, Subunidad α I_{Ks}	K	↓	30 - 35
SQT2	7q35-36	<i>KCNH2/HERG</i>	Principal, Subunidad α I_{Kr}	K	↓	25 - 30
SQT3	3p21-p24	<i>SCN5A</i>	Principal, Subunidad α I_{Na}	I_{Na}	↑	5 - 10
SQT4	4q25-q27	<i>ANKB</i>	Accesoria, Anquirina B	Na/Ca	↑	< 1
SQT5	21q22.1	<i>KCNE1/minK</i>	Accesoria, Subunidad β I_{Ks}	K	↓	< 1
SQT6	21q22.1	<i>KCNE2/MiRP1</i>	Accesoria, Subunidad β I_{Kr}	K	↓	< 1
SQT7*	17q23	<i>KCNJ8</i>	Principal, Subunidad α Kir 2.1	K	↓	< 1
SQT8**	12p13.3	<i>CACNA1</i>	Principal, Subunidad α $C_v1.2$	Ca tipo L	↑	< 1
SQT9	3p25	<i>CAV3</i>	Accesoria, Caveolina 3	Na	↑	< 1

Jervell-Lange-Nielsen (Autosómico Recesivo)

Tipo	Locus	Gen	Proteína	Corriente	Efecto	Frecuencia (%)
JLN1	11p15,5	<i>KCNQ1/KVLQT1</i>	Principal, Subunidad α I_{Ks}	K	↓	> 90,5
JLN2	21q22.1	<i>KCNE1/minK</i>	Accesoria, Subunidad β I_{Ks}	K	↓	< 0,5

* Síndrome de Andersen-Tawil

** Síndrome de Timothy

Síndrome de QT largo tipo 1 (SQT1):

Los pacientes con SQT1 suelen presentar episodios de arritmia ventricular al realizar ejercicio o al estimular el simpático (68%)¹⁰; la natación se ha descrito como un deporte gatillo de arritmias en el SQT1¹¹. La penetrancia en este subtipo es cercana al 62%. Con frecuencia estos pacientes presentan una onda T de base ancha, con duración muy prolongada^{12,13} (Tabla 1.2).

Es el subtipo más frecuente, explica 30-35% de los casos. El gen afectado es el *KvLQT1* (o *KCNQ1*) localizado en el cromosoma 11 (11p15,5), codifica la subunidad α , del canal de potasio I_{Ks} . El potencial de acción se prolonga por una disminución de la corriente saliente de K^+ durante fase 3 del potencial de acción.

Síndrome de QT largo tipo 2 (SQT2):

Los pacientes con SQT2 suelen presentar arritmias ventriculares en respuesta al estrés emocional (49%) o estímulos auditivos súbitos -ej. reloj despertador- y con menos frecuencia durante el sueño (22%) o al ejercicio (29%)¹⁰. Este subtipo es particularmente susceptible a presentar arritmias en el periodo post-parto¹⁴. La penetrancia estimada es del 79%, significa que hasta un 20% de los casos pueden tener un ECG no diagnóstico. En el SQT2, la onda T suele ser de baja amplitud, bífida, con muescas^{12,13} (Tabla 1.2). El gen afectado es el *KCNH2* o *HERG* localizado en el cromosoma 7 (7q35-36), el cual codifica la subunidad α del canal de potasio I_{Kr} ; explica 25-30% de los casos. La disfunción de este canal, disminuye la corriente saliente de K^+

durante la fase 3 del potencial de acción, prolongando así su duración.

Síndrome de QT largo tipo 3 (SQTL3):

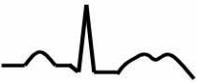
Los casos con SQTL3 tienen un riesgo mayor de presentar arritmias malignas durante el reposo (sueño) o bradicardia¹⁵. La penetrancia de las mutaciones en el gen *SCN5A* es cercana al 90%. El ECG en el SQTL3 suele mostrar onda T acuminada, de aparición tardía que deja observar con claridad el alargamiento del segmento ST^{12,13} (Tabla 1.2). Estos pacientes suelen ser menos sintomáticos que los casos con SQTL1 o SQTL2, pero los eventos son característicamente más letales.

El gen afectado en el SQTL3 es el *SCN5A*, que codifica para la subunidad α del canal de sodio $Na_v1.5$, localizado en el cromosoma 3 (3p21-24); es causante de la enfermedad en 5-10% de los casos. La inactivación defectuosa del canal, permite la entrada sostenida de Na^+ , durante la fase 2 del potencial de acción y prolonga su duración.

Síndrome de QT largo tipo 4 (SQTL4):

Es una variedad rara, explica cerca del 1% de los casos. Condiciona un SQTL muy atípico con un gran espectro de arritmias que incluyen taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, fibrilación auricular, trastornos en la conducción intraventricular, disfunción del nodo sinusal y bradicardia¹⁶⁻¹⁸; con frecuencia los casos tienen incluso el QTc en límites normales. El gen afectado es el *ANKK1*, localizado en el cromosoma 4 (4q25-27); el cual codifica la síntesis de anquirina- β , proteína estructural que vincula proteínas de la membrana del cardiomiocito con proteínas del citoesqueleto, estas proteínas son: la bomba Na/K ATPasa, intercambiador Na/Ca y el receptor a inositol trifosfato ($InsP_3R$). Las mutaciones que causan pérdida de la función de anquirina-b, resultan en un incremento en la concentración de calcio intracelular, así como alteración en la expresión de N/K ATPasa e intercambiador Na/Ca; la elevación de las transientes de calcio da lugar a post-despolarizaciones tempranas

Tabla 1.2. Correlación Genotipo-Fenotipo en los SQTL mas frecuentes

Tipo	Corriente iónica	Efecto Funcional	Frecuencia	ECG ^{12,13}	Desencadenante de evento cardiaco letal ^o	Penetrancia*
SQTL1	Potasio	↓	30 – 35%		Ejercicio (68%) Emociones (14%) Sueño, descanso (9%) Otros (9%)	62%
SQTL2	Potasio	↓	25 – 30%		Ejercicio (29%) Emociones (49%) Sueño, descanso (22%)	79%
SQTL3	Sodio	↑	5 – 10%		Ejercicio (4%) Emociones (12%) Sueño, descanso (64%) Otros (20%)	90%

*Penetrancia se refiere a los casos que tienen la mutación y manifiestan el fenotipo

y tardías, de esta manera, las arritmias ventriculares observadas en las mutaciones del gen de anquirina- β se deben a despolarizaciones espontáneas generalmente en respuesta a la estimulación catecolamínica.

Síndrome de QT largo tipo 5 (SQT15):

Es condicionado por cambios de secuencia del gen *KCNE1* localizado en el cromosoma 21 (21q22.1-p22),¹⁹ codifica la síntesis de la subunidad β del canal I_{Ks} , conocida también como subunidad minK que regula al canal I_{Ks} . Explica menos del 1% de los casos.

Síndrome de QT largo tipo 6 (SQT16):

El gen afectado es el *KCNE2* localizado en el cromosoma 21 (21q22.1).²⁰ Codifica la subunidad β del canal de potasio, conocida también como subunidad MiRP1 que regula al canal I_{Kr} . Explica menos del 1% de los casos.

Síndrome de QT largo tipo 7 o Andersen-Tawil (SQT17):

Los hallazgos dismórficos y las alteraciones electrocardiográficas de este síndrome fueron descritas por primera vez en 1971 por el Dr. Andersen²¹, recapitulados en 1994 por el Dr. Tawil²²; pero la descripción genético-molecular se publicó apenas en el año 2001²³. El ahora conocido síndrome de Andersen-Tawil (SAT), es un desorden autosómico dominante que se caracteriza por parálisis periódica, desarrollo esquelético anormal, arritmias ventriculares del tipo de la extrasistolia ventricular frecuente con susceptibilidad particular a desarrollar fibrilación ventricular, sobre todo en el sexo femenino. Los trastornos del ritmo descritos en el SAT son: extrasístoles ventriculares (41%), taquicardia ventricular polimórfica no sostenida (23%), taquicardia ventricular bidireccional (68%) y *torsades de pointes* (3%).²⁴ Algunos de los rasgos dismórficos observados incluyen: estatura

corta, escoliosis, clinodactilia, hipertelorismo, implantación baja de orejas, micrognatia y frente amplia. La expresividad de la enfermedad es variable, lo que complica el diagnóstico oportuno.^{23,25} 70% de los casos se explican por mutaciones en el gen *KCNJ2* localizado en el cromosoma 17 (17q23) que codifica la síntesis del canal rectificador de potasio Kir 2.1; este canal participa en la fase 4 del potencial de acción. Varios autores cuestionan la inclusión de este gen dentro del grupo causal de SQT17 pues el intervalo QTc en este síndrome se encuentra ligeramente prolongado o incluso normal, pero la onda U suele ser prominente, lo que ha dado lugar a sobrevaloración del intervalo QT. El lector encontrará que algunos autores proponen que las mutaciones en *KCNJ2* generan el SAT y no el SQT17²⁴.

Síndrome de QT largo tipo 8 (SQT18):

Resulta de mutaciones en el gen *CACNA1* que codifica el canal de calcio tipo L $Ca_v1.2$, localizado en el cromosoma 12 (12p13.3). Ocasiona el síndrome de Timothy²⁶, caracterizado por malformaciones cardíacas, deficiencia inmunológica, hipoglucemia intermitente, trastornos cognitivos, incluso autismo; fusiones interdigitales y QT largo que predispone a arritmias cardíacas y muerte súbita²⁷. Explica menos del 0,5% de los casos.

Síndrome de QT largo tipo 9 (SQT19):

Esta variedad resulta de mutaciones en el gen *CAV3*, localizado en el cromosoma 3 (3p25) que codifica la síntesis de Caveolina 3. Caveola es una invaginación de la membrana plasmática implicada en endocitosis, homeostasis de lípidos y transducción de señales; un importante componente de esta estructura es Caveolina de la cual se conocen 3 subtipos; el subtipo 3 es específico de músculo esquelético y cardíaco.

Algunos canales iónicos se co-localizan en caveola, incluido la isoforma cardíaca de canal de sodio $Na_v1.5$; recientemente se describieron diversas mutaciones en esta proteína que alteran las propiedades biofísicas del canal de sodio $Na_v1.5$ in vitro, generando un fenotipo similar al observado en el SQT₃²⁸. Se estima que explica <1% de los casos.

Mutaciones de la Variedad Jervell Lange-Nielsen

Esta grave forma de SQT es causada por mutaciones homocigotas²⁹ o heterocigotas compuestas en los genes *KCNQ1* y/o *KCNE1* que codifican la corriente I_{Ks} , es decir, se trata de una variedad muy grave de las formas SQT₁ o SQT₅. Característicamente se asocia a sordera congénita; los pacientes suelen tener un QTc > 500 ms, síncope recurrente y alto riesgo de muerte súbita. Los padres de los pacientes con esta variedad son generalmente heterocigotos y manifiestan una enfermedad menos grave o incluso pueden ser asintomáticos³⁰.

Diagnóstico del SQT

Índice de Puntuación de Schwartz

En 1985, Schwartz PJ y cols. publicaron los criterios diagnósticos para el SQT, modificados en 1993³¹; representan una importante guía en la evaluación inicial de los casos potenciales; utiliza un puntaje del 1 al 9 según la historia familiar, hallazgos clínicos y electrocardiográficos; si el índice de puntuación es <1 la probabilidad de padecer la enfermedad es baja, 2-3 Intermedia y ≥ 4 alta (Tabla 1.3).

Diagnóstico Prenatal del SQT

La bradicardia fetal puede ser una de las primeras manifestaciones clínicas en el SQT. En series retrospectivas, se ha docu-

mentado que hasta un 70% de los pacientes diagnosticados en la infancia, tienen este antecedente, mismo que suele ir acompañado de *hidrops fetalis*.³² La evaluación de la repolarización cardíaca fetal entre la semana 14 y 39, es un método útil para diagnóstico oportuno del SQT.³³

Mosaicismos gonadales para SQT se han asociado a pérdidas fetales recurrentes durante el tercer trimestre del embarazo.³⁴ Si la sospecha de la enfermedad es muy alta, la amniocentesis a partir de las 16 semanas de gestación puede ser de utilidad para el diagnóstico, que resulta sencillo cuando alguno de los padres es conocido como portador de una mutación determinada.³⁵

Estudio del paciente con SQT

Historia Clínica

Los antecedentes familiares y/o personales de muerte súbita son de crucial importancia tanto para el diagnóstico del SQT, su utilidad para la estratificación de riesgo ha sido controversial. Los factores precipitantes y el contexto del síncope, puede sugerirnos el subtipo de SQT. En la valoración inicial de un caso sospechoso, se debe descartar el uso de fármacos que pudieran prolongar el intervalo QT.

El intervalo QT ¿Cuánto es lo normal?

El intervalo QT se debe medir de preferencia en las derivaciones II o V₅³⁶ donde se ha documentado que tiene mayor poder predictivo³⁷. Traduce la duración de la repolarización ventricular y se mide desde el inicio de la onda Q hasta el final de la onda T. Convencionalmente, se utiliza la fórmula de Bazett³⁸ para corregir la duración del intervalo de acuerdo a la frecuencia cardíaca ($QTc = QT / \sqrt{RR}$, expresado en segundos). Si bien la medición de este intervalo parece sencillo, en un estudio multicén-

Tabla 1.3: Puntaje de Schwartz para el diagnóstico de SQT (1993)

Variable	Puntos
Electrocardiograma	
QTc ms* > 480	3
460 – 470	2
450 (hombres)	1
Torsades de pointes	2
Alternancia en onda T	1
Muecas Onda T 3 derivaciones	1
Bradicardia [‡]	0.5
Historia Clínica	
Sincope [#]	
Con estrés	2
Sin estrés	1
Sordera Congénita	0.5
Historia Familiar[™]	
Familiares con SQT confirmado [†]	1
Muerte Súbita inexplicada en familiares de primera línea <30 años	0.5

* QTc calculado con la fórmula de Bazett's formula ($QTc = QT / \sqrt{RR}$)

Mutuamente excluyentes

‡ Frecuencia Cardíaca en reposo por debajo de la segunda percentila para edad

™ El mismo familiar no debe ser considerado en ambos

† Puntaje Schwartz > 4

<1 punto = Baja probabilidad, 2-3 puntos = Probabilidad intermedia, ≥4 puntos = alta probabilidad

trico realizado por Viskin y cols., <40% de los médicos no cardiólogos, <50% de los cardiólogos y >80% de los arritmiólogos, supieron medirlo correctamente³⁹. Es aconsejable la medición manual por el médico y no confiar en las mediciones automatizadas que si bien son útiles para otros intervalos, suelen ser imprecisos en el cálculo del intervalo QT. Es un intervalo dinámico, los límites normales dependen de varios factores; si bien se ha considerado anormal un intervalo $QTc \geq 440$ ms en los hombres y ≥ 460 ms en las mujeres, en este rango podemos encontrar

tanto portadores de mutaciones, como sujetos sanos (Figura 1.1). Vincent⁴⁰ demostró que en familias con SQT1, ningún caso con genotipo positivo tuvo un $QTc < 410$ ms y ninguno con genotipo negativo tuvo un $QTc > 470$ ms. Mönig y cols. mostraron recientemente que un $QTc > 440$ ms es eficaz para detectar pacientes con mutaciones asociadas SQT, un $QTc > 470$ ms es útil para detectar aquellos en riesgo de desarrollar síntomas y un $QTc > 500$ ms se encontró en pacientes sintomáticos en tratamiento.³⁷

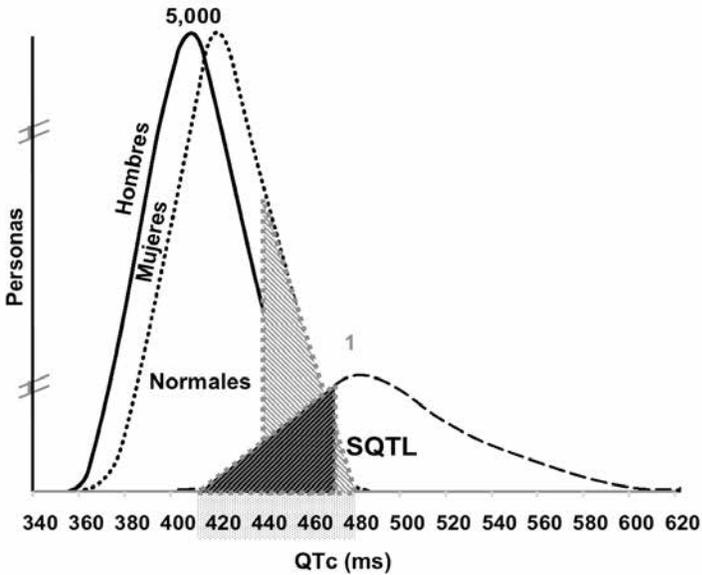


Figura 1.1

Modelo de distribución del intervalo QT corregido por frecuencia (QTc) en pacientes con mutaciones en KVLQT1, HERG o SCN5A y sus familiares no afectados. La curva a la izquierda describe la distribución de los afectados y la derecha de los no afectados.

Otras alteraciones electrocardiográficas asociadas al SQTL:

Los pacientes con SQTL pueden presentar múltiples alteraciones en la onda T:⁴¹alternancia en la polaridad, apariencia bifásica, variaciones en la amplitud, muescas, entre otras. La *alternancia de la onda T* (**Figura 1.2A**) se define como la variación latido a latido de la amplitud, morfología y polaridad de la onda T en ritmo sinusal, sin variaciones en el complejo QRS. Constituye un indicador de inestabilidad eléctrica⁴², refleja dispersión regional en la repolarización ventricular y en ocasiones precede a la fibrilación ventricular⁴³.

Los pacientes con SQTL pueden cursar con signos de disfunción del nodo sinusal, bradicardia y/o pausas⁴⁴. Los subtipos SQTL1 y

SQTL3, particularmente este último, presentan con frecuencia bradicardia sinusal⁴⁵, mientras el SQTL4 ha sido asociado a disfunción del nodo sinusal¹⁸.

Desde los años 70-80's se observó la coexistencia de trastornos en la conducción aurículo-ventricular con el SQTL⁴⁶ (**Figura 1.2B**). El bloqueo AV 2:1 es una manifestación infrecuente pero de mal pronóstico, que puede presentarse desde la etapa fetal en forma de bradicardia persistente. La incidencia ha sido reportada entre 4 y 5%⁴⁷, y se asocia a una alta mortalidad a pesar del tratamiento con beta-bloqueadores y/o marcapaso^{48,49}. Este fenómeno puede explicarse por la exagerada duración del potencial de acción. Al alargarse el período refractario ventricular, el siguiente impulso

procedente de la actividad sinusal, es bloqueado por encontrar a los ventrículos aún en periodo refractario. Esta alteración parece ser particular del SQTL, pues el periodo refractario ventricular es mayor que en el sistema de conducción AV.⁵⁰ El complejo QRS es usualmente angosto y el bloqueo se ha localizado a nivel infrahisiano,^{45,50,51} pero el sitio de bloqueo pudiera depender del genotipo. Hasta el momento 4 genes han sido relacionados a bloqueo 2:1 en el contexto de SQTL: *HERG*(SQTL2)^{52,53}, *SCN5A*(SQTL3)⁵¹ y *CACNA1*(SQTL8)²⁶.

La arritmia ventricular característica del SQTL es la conocida *torsade de pointes* (**Figura 1.2C**); se presenta cuando el intervalo QT se prolonga, independientemente de la etiología. Es una taquicardia ventricular polimórfica por reentrada, caracterizada electrocardiográficamente por un giro continuo del eje del QRS sobre una línea imaginaria; suele ser precedida de

una pausa seguida de una extrasístole - intervalo RR “corto-largo-corto”- como se muestra en la figura 1.2C⁵⁴⁻⁵⁶. Puede culminar en fibrilación ventricular y muerte súbita. Si esto no sucede el paciente puede experimentar sólo un síncope, o incluso, si el episodio es breve, puede pasar desapercibido.

Holter

El monitoreo Holter permite una valoración amplia y dinámica del intervalo QT; en ocasiones, pueden registrarse episodios espontáneos de arritmia ventricular asintomática, así como posibles episodios de disfunción del nodo sinusal o bloqueo AV.

Prueba de Esfuerzo

Los pacientes con SQTL no suelen alcanzar la frecuencia máxima esperada calculada para la edad, así mismo, el intervalo QT al esfuerzo puede tener un comportamiento

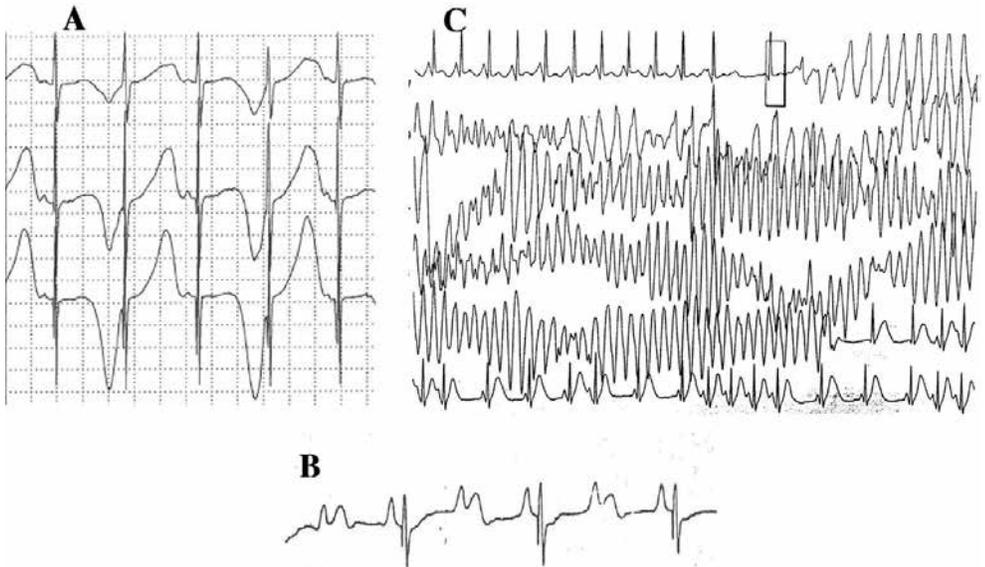


Figura 1.2

Alteraciones electrocardiográficas en el SQTL. **(A)** Alternancia eléctrica de la onda T. **(B)** Bloqueo auriculoventricular 2:1. **(C)** Torsades de pointes autolimitada

paradójico, alargándose en lugar de acortarse.^{57,58} El comportamiento electrocardiográfico durante la prueba de esfuerzo, será diferente según el subtipo SQT. Los pacientes con SQT1 además de no llegar a la frecuencia cardíaca máxima calculada para la edad, frecuentemente alargan el intervalo QT, mientras que aquellos con SQT2, suelen alcanzar la frecuencia cardíaca esperada, y prolongar solo discretamente el intervalo QT, o incluso no prolongarlo^{59,60}. Los pacientes con SQT3 normalmente tienen una respuesta fisiológica al ejercicio, esto es, acortamiento normal del intervalo QT⁶¹. Este estudio también puede ser útil para valorar la respuesta al tratamiento y estratificar el riesgo en los casos asintomáticos o en quienes queda duda de los factores precipitantes de las arritmias.

Tamizaje Genético

El estudio genético en el SQT ha sido limitado en los últimos años a laboratorios de investigación; recientemente se desarrolló un estudio comercial para esta enfermedad. La información derivada del estudio genético es de gran utilidad en el manejo de los enfermos, en particular en los casos de alto riesgo. La principal aplicación es quizá en el consejo genético, pero también tiene importantes implicaciones en el tratamiento que puede orientarse según el canal afectado. La localización precisa de una mutación dada, puede otorgar información adicional en cuanto a la evaluación del riesgo; mutaciones en la región transmembranal de *KCNQ1* (I_{Ks}) tienen mayor probabilidad de presentar eventos arrítmicos que las mutaciones en la región C-terminal⁶²; así mismo, mutaciones en la región del poro de *KCNH2* o *HERG*⁶³ comparadas con mutaciones en la región N o C-terminal⁶⁴.

El escrutinio inicial quizá se pueda limitar a los genes *KCNQ1*, *HERG* y *SCN5A* con posi-

bilidad de encontrar mutaciones en un 65-70% de los casos; en caso de obtener resultados negativos, se puede ampliar el tamizaje a los genes *KCNE1*, *KCNE2*, *ANKB*, *KCNJ2*, *CACNA1*, y *CAV3*, lo que permitirá incrementar la posibilidad de resultados positivos en un 5-10%.

Tamizaje Genético Postmortem

Interesante ha sido el hallazgo de mutaciones en genes que condicionan SQT en casos de niños con muerte de cuna (muerte súbita infantil) y en casos de muerte súbita inexplicable en el adulto joven.

El estudio genético post-mortem en pacientes con muerte súbita y autopsia negativa ha mostrado mutaciones que condicionan SQT en porcentajes variables^{65,66,67} cercanos al 10% en la muerte súbita infantil y al 35% en la muerte súbita del adulto joven⁶⁸⁻⁷⁰. Basados en estos resultados se ha propuesto realizar electrocardiograma de rutina en todos los neonatos^{71,72}.

El estudio genético postmortem, también conocido en la literatura como "autopsia molecular", además de tener repercusiones legales, tiene importantes implicaciones en los familiares de los casos que pudieran estar afectados sin saberlo.

Polimorfismos Regulatorios

Se han descrito diversos polimorfismos frecuentes en la población distribuidos en prácticamente todos los genes asociados al SQT. Si bien estos cambios no son aparentemente patogénicos, algunos pueden tener los siguientes efectos:⁷³⁻⁷⁶

1. Generar susceptibilidad individual para desarrollar arritmias
2. Favorecer el efecto patogénico de otro cambio no sinónimo
3. Disminuir el efecto patogénico de otro cambio no sinónimo

Como el polimorfismo K897T en *KCNH2* (*HERG*), con una frecuencia en la población de hasta un 15%, ha sido asociado no sólo a susceptibilidad a determinados fármacos,⁷⁷ también favorece el efecto patogénico de mutaciones en el mismo gen.⁷⁶ Otro ejemplo es el polimorfismo S1103Y en el gen *SCN5A* encontrado principalmente en población negra con una incidencia cercana al 13%, y asociado a un incremento en el riesgo de muerte súbita infantil.⁷⁸

Interesante también, ha sido la descripción de dos sitios de procesamiento alternativo en el producto del gen *SCN5A* que codifica la isoforma de canal de sodio cardíaco $Na_v1.5$ en el humano, generando dos tipos de canales de sodio, uno con 2016 aminoácidos que contiene una glutamina en la posición 1077 (Q1077) y otro con 2015, que carece de esta glutamina (Q1077del). Transcritos de estos dos procesamiento alternativo están presentes en un mismo corazón humano a razón de 2:1 y diversos polimorfismos frecuentes tendrán un efecto distinto en la función del canal dependiendo del contexto Q1077 o Q1077del. Esto fue demostrado inicialmente con el polimorfismo H558R de *SCN5A*, presente hasta en un 30% de la población; al expresar H558R en el contexto de Q1077 se observó una profunda disminución de la corriente iónica⁷⁹, efecto similar se documentó con el polimorfismo S524Y⁸⁰; estos hallazgos han dado elementos para explicar la variabilidad de la gravedad de la enfermedad así como los distintos fenotipos de una misma mutación observados en algunas familias⁷⁵.

Prueba farmacológica con adrenalina (epinefrina):

La prueba farmacológica con adrenalina a dosis bajas es una alternativa útil y segura para desenmascarar los casos sospechosos de SQT con un QTc limítrofe. Es particular-

mente eficaz en detectar formas asintomáticas de SQT1, con una sensibilidad del 92.5% y especificidad del 86%; valor predictivo positivo del 76% y valor predictivo negativo del 96%; puede ser útil también en el diagnóstico de el SQT2, con menor sensibilidad y especificidad. No es útil para el SQT3 u otras formas de SQT. En condiciones normales, la estimulación simpática induce la fosforilación del canal de potasio I_{Ks} , optimizando su función y dando lugar a un acortamiento del potencial de acción. En pacientes con SQT, en particular el tipo 1, se observa una respuesta paradójica a la administración de dosis bajas de adrenalina (0.025- 0.2mg/kg/min), alargando el intervalo QT más de 30ms⁸¹⁻⁸⁴.

Prolongación del intervalo QT y torsades de pointes inducida por fármacos:

Gran variedad de fármacos utilizados en diversas especialidades médicas pueden ocasionar el alargamiento del intervalo QT en forma iatrogénica (Tabla 1.4). Incluso, algunos medicamentos han sido retirados del mercado por este indeseable efecto (p ej. astemizol, cisaprida, entre otros, para mayor detalles consultar el portal de internet www.qtdrugs.org).^{85,86}

Las arritmias ventriculares secundarias a fármacos no antiarrítmicos, se presentan en menos de un caso por cada 10,000 – 100,000 expuestos. Considerando que los estudios clínicos incluyen entre 2000 y 3000 sujetos, es fácil que este indeseable y fatal efecto secundario escape a la detección como un efecto adverso en la fase clínica del desarrollo de fármacos.⁸⁷ Este punto ha generado enorme interés en lo que se refiere a aspectos de seguridad en el estudio y generación de nuevas drogas.

Los factores relacionados a la susceptibilidad individual son: sexo femenino, hipoka-

Tabla 1.4. Fármacos que prolongan el intervalo QT

Fármacos de Aplicación Cardiológica:

Sotalol, Amiodarona, Disopiramida, Dobutamina, Dopamina, Flecainida, Ibutilide, Efedrina, Norepinefrina, Quinidina, Amrinona, Minrinona

Fármacos de Aplicación Neuropsiquiátrica:

Amitriptilina, Hidrato de Cloral, Citalopram, Cloropromazina, Doxepina, Droperidol, Fluoxetina, Haloperidol, Imipramina, Litio, Metadona, Metilfenidato, Paroxetina, Olanzapina, Risperidona, Tioridazina, Ketanserina

Fármacos de Aplicación Gastroenterológica:

Cisaprida, Domperidona, Octreotide, Ondansetron, Sibutramina, Droperidol

Fármacos de Aplicación Neumológica:

Salbutamol, Salmeterol, Terbutalina.

Fármacos Antimicrobianos:

Azitromicina, Ciprofloxacina, Claritromicina, Eritromicina, Clindamicina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Ofloxacina, Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Fármacos Antivirales:

Amantadina, Foscarnet

Fármacos Antiparasitarios:

Cloroquina, Mefloquina, Pentamidina

Fármacos Antifúngicos:

Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Voriconazol

Otros Fármacos:

Fenilefrina, Pseudoefedrina, Fenilpropanolamina, Tacrolimus, Tamoxifeno, Vardenafil, Astemizol

lemia, hipomagnesemia, bradicardia, insuficiencia cardíaca congestiva, post-cardioversión, fibrilación atrial, hipertrofia ventricular izquierda, SQTL no detectado, polimorfismos predisponentes y altas concentraciones séricas de los fármacos predisponentes⁸⁸.

El canal que por excelencia interacciona con fármacos es el I_{Kr} codificado por el gen *KCNH2* (*HERG*). Esto se debe a la estructura molecular de este canal; mientras que otros canales de potasio tienen 2 residuos prolina que se inclinan en forma angulada hacia el poro del canal disminuyendo su lumen, I_{Kr} carece de ellos, generando un vestíbulo del poro más amplio, lo que facilita su exposición a grandes moléculas; por el contrario, tiene dos residuos aromáticos (tirosina y fenilalanina) que facilitan enlaces con moléculas aromáticas presentes

en diversos fármacos capaces de bloquear el canal⁸⁹.

Como mencionamos anteriormente, el SQTL tiene penetrancia incompleta, existen portadores asintomáticos de mutaciones que pueden manifestar arritmias malignas al recibir alguno de estos fármacos. Por otro lado, polimorfismos considerados frecuentes en la población, confieren susceptibilidad individual a desarrollar *torsades de pointes* con el uso de fármacos, como sucede con el polimorfismo R1047L, el segundo más frecuentemente observado en *KCNH2* y que se ha asociado a *torsades de pointes* con el uso de la droga dofetilide.⁹⁰ Se han descrito por lo menos 20 polimorfismos en sujetos sanos en el gen *KCNH2* y su efecto en la susceptibilidad individual a desarrollar arritmias malignas relacionadas a fármacos está por

determinarse⁹¹. En el canal de sodio $Na_v1.5$, también se han documentado polimorfismos que pueden conferir susceptibilidad a desarrollar arritmias ventriculares, como sucede con el polimorfismo H558R, que se presenta en hasta un 30% de la población; o el S1103Y, frecuente en afro-americanos^{78,79,88,92,93} y cuya implicación en la susceptibilidad a determinadas drogas no ha sido explorada.

El SQTL y embarazo:

El consejo genético es importante en esta enfermedad pero en términos generales no existe contraindicación para el embarazo en las pacientes portadoras de SQTL, aunque cada caso en particular es diferente y debe evaluarse en su apropiado contexto.

Se ha observado que el riesgo de presentar arritmias ventriculares malignas disminuye durante la gestación. Por el contrario, hasta nueve meses después del parto se ha reportado una mayor vulnerabilidad a presentar arritmias malignas, en especial en las pacientes portadoras de SQTL2. Este riesgo disminuye en forma importante con el tratamiento beta-bloqueador⁹⁴.

Estratificación de Riesgo:

La evolución en el SQTL es muy variable, siendo influenciada por la duración del intervalo QTc, factores ambientales, edad, genotipo y respuesta al tratamiento.^{95,96} Las arritmias ventriculares son más frecuentes en SQTL1 y SQTL2, pero son más letales en SQTL3⁹⁷. Como mencionamos, las mujeres en postparto son particularmente susceptibles a arritmias malignas¹⁴.

Debe considerarse de alto riesgo el SQTL asociado a:

1. Sordera congénita (síndrome de Jervell-Lange-Nielsen)

2. Síncope recurrente por taqui-arritmias ventriculares malignas
3. Antecedentes familiares de muerte súbita
4. QTc > 500ms
5. Bloqueo AV 2:1
6. Alternancia eléctrica en la onda T
7. Genotipo de SQTL tipo 3

Los estudios realizados por Priori y cols. en 647 pacientes, mostraron que la probabilidad de presentar un evento mayor (síncope, paro cardíaco, muerte súbita) antes de los 40 años es alto (> 50%) cuando el QTc > 500 msec en SQTL1, SQTL2 o bien en el sexo masculino cuando existe SQTL3⁹⁵. Recientemente, se reportó el análisis del registro internacional de SQTL; se analizó el riesgo de muerte súbita en 2772 adolescentes con la enfermedad; concluyendo que 3 eventos se asocian a mayor riesgo en esta población: QTc>530ms, historia de síncope en los últimos 10 años y sexo; los hombres entre 10-12 años tuvieron mayor riesgo que las mujeres, pero en el rango de edad de 13 a 20 años, el riesgo es el mismo⁹⁸.

Tratamiento

Los pacientes sintomáticos que no reciben tratamiento tienen una mortalidad del 20% al año y del 50% a 10 años después de un primer evento de arritmia ventricular. Si bien es claro que en presencia de síntomas hay que otorgar tratamiento, la conducta a seguir en los pacientes asintomáticos es aún motivo de debate; se ha documentado que la parada cardíaca puede ser la primera manifestación de la enfermedad en el 9% de los casos,⁴⁷ 12% de los casos asintomáticos desarrollarán síntomas, incluso muerte súbita. El tratamiento inicial serán los fármacos betabloqueadores y deben iniciarse en todo paciente con SQTL como medida inicial; la restricción en el ejercicio

será recomendable pero sin duda los marcadores clínicos y electrocardiográficos de riesgo son de gran utilidad en la toma de decisiones. Siempre será importante informar a los pacientes sobre el riesgo que existe en la utilización de los diversos fármacos que como mencionados anteriormente, pueden prolongar el intervalo QT y propiciar así arritmias ventriculares.

El diagnóstico genético además de permitir un apropiado consejo familiar en relación a la enfermedad, ayuda a evaluar el pronóstico y permite orientar en forma específica el tratamiento.

Betabloqueadores

Constituyen la primera línea de tratamiento; todo paciente con diagnóstico de SQT_L debe recibir betabloqueador en forma inicial.⁹⁹ Esta terapia reduce el riesgo de eventos hasta en un 64%.⁹⁸ Son eficaces, en particular, en aquellos pacientes con mutaciones en el canal I_{Ks} (SQT_{L1})¹⁰⁰, regulado en forma importante por el sistema simpático. No modifican el intervalo QT, pero si su dispersión.¹⁰¹

Se ha demostrado que si bien los beta-bloqueadores disminuyen la incidencia de eventos cardiovasculares^{102,103} 10% de los pacientes con SQT_{L1}, 23% con SQT_{L2} y 32% con SQT_{L3} tendrán síntomas a pesar del tratamiento¹⁰⁴. En particular, los pacientes con SQT_{L3} no parecen obtener un beneficio importante; de hecho, este grupo de fármacos deberán usarse con cautela, pues los episodios de arritmia ventricular en el SQT_{L3} son más comunes a frecuencias cardíacas bajas. En términos generales, 32% de los pacientes sintomáticos antes del inicio del tratamiento con betabloqueador, tendrán recurrencia de los síntomas en los primeros 5 años y 14 % de aquellos que fueron rescatados de un episodio de muerte súbita, presentarán otro evento similar en

5 años si solo reciben esta terapia¹⁰⁵.

Se han utilizado diversos betabloqueadores en el tratamiento del SQT_L: nadolol (0.5-1mg/kg/día), propranolol (2-4mg/kg/día), metoprolol (0.5-1mg/kg/día) y atenolol (0.5-1mg/kg/día) principalmente. Este último pudiera no ser benéfico en el SQT_L, pues se ha reportado que al menos 75% de los casos que no respondieron a la terapia con betabloqueadores, recibían atenolol, aunque este hallazgo pudiera estar relacionado al uso de dosis subóptimas.¹⁰²

Para establecer la dosis adecuada, es útil la prueba de esfuerzo. La frecuencia cardíaca máxima no debe superar los 130 lpm bajo tratamiento.

Bloqueadores de canales de sodio

Las mutaciones en el canal de sodio que ocasionan el SQT_{L3} producen una inactivación defectuosa del canal; los bloqueadores de canales de sodio en estos pacientes han mostrado ser de utilidad. Estudios realizados con flecainida muestran que mejora la frecuencia cardíaca, las alteraciones en la onda T y el intervalo QT¹⁰⁶. La mexiletina también ha mostrado mejorar los marcadores electrocardiográficos de riesgo^{61,107,108}. Estudios in vitro con ranolazina, han mostrado que disminuye los efectos deletéreos condicionados por mutaciones reportadas en el humano.¹⁰⁹ Si bien los resultados son alentadores, hay que considerar que no existe un estudio a largo plazo que evalúe esta terapia, ni se ha reportado en un número importante de pacientes. Los bloqueadores de canales de sodio no se deben administrar si no existe un diagnóstico genético confirmado.

Potasio Suplementario y Fármacos que facilitan su disponibilidad

El suplemento de potasio y/o la utilización de fármacos ahorradores de potasio como

espironolactona; pueden disminuir el intervalo QTc hasta en un 24% de los casos^{110,111}. Los fármacos que favorecen la apertura de los canales de potasio como apricalium, leveromakalium, nicornadil y pinacidil, han mostrado ser útiles en el manejo del SQTl; los subtipos que en particular se benefician son el SQTl1 y SQTl2.¹¹²

Marcapaso y Desfibrilador

La estimulación con marcapaso ha sido utilizada en los pacientes con arritmia dependiente de pausa^{113,114}. Aquellos con SQTl3 suelen beneficiarse más de esta terapéutica pues la prevalencia de bradicardia es mayor. Se sugiere estimulación DDD en los casos con arritmia dependiente de pausa o bloqueo AV 2x1 o de alto grado. Frecuencias programadas por debajo de 70 lpm¹¹⁵ no son útiles para prevenir arritmias ventriculares. Se recomienda programar el sensor a una respuesta rápida pues estos pacientes suelen tener una aceleración inapropiada de la frecuencia cardiaca en respuesta al ejercicio. Todas aquellas funciones que impliquen la presencia de pausas, deben ser apagadas como histéresis y la función nocturna. El PVARP (periodo refractario auricular postventricular), debe ser lo mas corto posible. La función de regulación de frecuencia debe ser encendida para prevenir pausa post-extrasistólica. Hay que recordar que el sobresensado de la onda T y las fallas en la captura, también pueden dar lugar a pausas.

El desfibrilador automático implantable (DAI) aunado a la terapia con beta-bloqueador, disminuye en forma importante la incidencia de muerte súbita.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Su indicación es clara en los casos catalogados como de alto riesgo.¹¹⁹ La programación del dispositivo variará según las necesidades del caso pero en general hay que evitar adi-

ministrar terapias a eventos autolimitados asintomáticos; para este fin, se sugiere un tiempo de detección mayor a 15 seg. Una complicación de la terapia con DAI es la tormenta arritmica; se ha reportado que cerca del 15% de los pacientes pueden presentarla y se debe, en buena parte, al incremento del tono simpático después de la descarga del DAI¹¹⁶; este problema puede manejarse incrementando la dosis de betabloqueadores, de no ser útil esta medida se debe considerar realizar resección de la cadena ganglionar simpática.

Simpatectomía Izquierda

Desde 1971, se introdujo la gangliectomía simpática como opción terapéutica útil en estos pacientes¹²⁰. En 1991, Schwartz publicó la primera serie de 85 casos con pobre respuesta al tratamiento betabloqueador, en los que se realizó estelectomía izquierda con resultados alentadores, pues se logró una sobrevida a 5 años del 94%¹²¹. Actualmente se ofrece esta opción terapéutica a pacientes de alto riesgo, cuando a pesar del tratamiento con betabloqueador y/o marcapaso el paciente persiste con síncope, o bien si una vez implantado el desfibrilador, existen descargas frecuentes.

El procedimiento consiste en realizar la resección de la porción inferior del ganglio estrellado y de las cadenas ganglionares torácicas simpáticas izquierdas T2 a T4, ya que la simple estelectomía izquierda ha mostrado no ser suficientemente efectiva. Se ha utilizado la toracoscopia microinvasiva con buenos resultados^{122,123}. Recientemente se publicó la serie más importante de pacientes tratados con este método, la cual mostró una reducción significativa en los episodios de síncope o muerte súbita, así como con una sobrevida a 5 años del 95%. En pacientes con síncope previo, la sobre-

vida a 5 años fue del 97% con un 11% de posibilidades de recurrencia, los cuales fueron en la mayoría un solo evento sincopal aislado. Así mismo se encontró una reducción significativa del segmento QT posterior a la simpatectomía izquierda. A pesar de los buenos resultados, la prevención de muerte súbita no es completa, pero se logra reducir a un 3%. En pacientes portadores de un desfibrilador automático implantable en los que se realizó la cirugía por la presencia de múltiples descargas, la media de eventos fue de 25 a 0 con una reducción del 95%. En el SQT1, se confirmó

el efecto benéfico. Probablemente el beneficio sea menor en pacientes con SQT2. Hasta ahora no se ha logrado establecer su efectividad para el SQT3¹²⁴.

Ablación

Se ha reportado que es posible realizar ablación de la extrasístole que en algunos casos inicia la arritmia ventricular, con mejoría en la incidencia de episodios.¹²⁵ Sin embargo, no existen estudios a largo plazo ni con un número de pacientes apropiado que justifique utilizar esta técnica en forma rutinaria.

Referencias

1. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J.* 1957;54:59-68.
2. Romano C, Gemme G, Pongiglione R. [Rare Cardiac Arrhythmias of the Pediatric Age. I. Repetitive Paroxysmal Tachycardia.]. *Minerva Pediatr.* 1963;15:1155-64.
3. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell.* 1995;80:795-803.
4. Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, et al. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1603-7.
5. Ackerman MJ. The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clin Proc.* 1998;73:250-69.
6. Priori SG. Inherited arrhythmogenic diseases: the complexity beyond monogenic disorders. *Circ Res.* 2004;94:140-5.
7. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2005;2:507-17.
8. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *Jama.* 2005;294:2975-80.
9. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation.* 1999;99:529-33.
10. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001;103:89-95.
11. Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ. Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome. *Mayo Clin Proc.* 1999;74:1088-94.
12. Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Fox J, Giuli LC, et al. Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation.* 2000;102:2849-55.
13. Zareba W. Genotype-specific ECG patterns in long QT syndrome. *J Electrocardiol.* 2006;39:S101-6.
14. Khositseth A, Tester DJ, Will ML, Bell CM, Ackerman MJ. Identification of a common genetic substrate underlying postpartum cardiac events in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2004;1:60-4.

15. Beaufort-Krol GC, van den Berg MP, Wilde AA, van Tintelen JP, Viersma JW, Bezzina CR, et al. 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.* 2005;46:331-7.
16. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 2003;421:634-9.
17. Mohler PJ, Bennett V. Ankyrin-based cardiac arrhythmias: a new class of channelopathies due to loss of cellular targeting. *Curr Opin Cardiol.* 2005;20:189-93.
18. Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, et al. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:9137-42.
19. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet.* 1997;17:338-40.
20. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell.* 1999;97:175-87.
21. Andersen ED, Krasilnikoff PA, Overvad H. Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta Paediatr Scand.* 1971;60:559-64.
22. Tawil R, Ptacek LJ, Pavlakis SG, DeVivo DC, Penn AS, Ozdemir C, et al. Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Ann Neurol.* 1994;35:326-30.
23. Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, et al. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell.* 2001;105:511-9.
24. Zhang L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, et al. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 mutations: characteristic T-U-wave patterns predict the KCNJ2 genotype. *Circulation.* 2005;111:2720-6.
25. Yoon G, Oberoi S, Tristani-Firouzi M, Etheridge SP, Quitania L, Kramer JH, et al. Andersen-Tawil syndrome: Prospective cohort analysis and expansion of the phenotype. *Am J Med Genet A.* 2006;140:312-21.
26. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, et al. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* 2004;119:19-31.
27. Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, et al. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:8089-96; discussion 86-8.
28. Vatta M, Ackerman M, Ye B, Makielski J, Ughanze E, Taylor E, et al. Mutant Caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long QT syndrome. *Circulation.* 2006;En prensa.
29. Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, et al. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet.* 1997;15:186-9.
30. Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, Bathen J, Amlie JP, Timothy K, et al. The Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. Natural History, Molecular Basis, and Clinical Outcome. *Circulation.* 2006.
31. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation.* 1993;88:782-4.
32. Chang IK, Shyu MK, Lee CN, Kau ML, Ko YH, Chow SN, et al. Prenatal diagnosis and treatment of fetal long QT syndrome: a case report. *Prenat Diagn.* 2002;22:1209-12.
33. Zhao H, Strasburger JF, Cuneo BF, Wakai RT. Fetal cardiac repolarization abnormalities. *Am J Cardiol.* 2006;98:491-6.
34. Miller TE, Estrella E, Myerburg RJ, Garcia de Viera J, Moreno N, Rusconi P, et al. Recurrent third-trimester fetal loss and maternal mosaicism for long-QT syndrome. *Circulation.* 2004; 109: 3029-34.
35. Tester DJ, McCormack J, Ackerman MJ. Prenatal molecular genetic diagnosis of congenital long QT syndrome by strategic genotyping. *Am J Cardiol.* 2004;93:788-91.

36. Cowan JC, Yusoff K, Moore M, Amos PA, Gold AE, Bourke JP, et al. Importance of lead selection in QT interval measurement. *Am J Cardiol.* 1988;61:83-7.
37. Monnig G, Eckardt L, Wedekind H, Haverkamp W, Gersch J, Milberg P, et al. Electrocardiographic risk stratification in families with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J.* 2006.
38. Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart.* 1920;7:353-70.
39. Viskin S, Rosovski U, Sands AJ, Chen E, Kistler PM, Kalman JM, et al. Inaccurate electrocardiographic interpretation of long QT: the majority of physicians cannot recognize a long QT when they see one. *Heart Rhythm.* 2005;2:569-74.
40. Vincent GM, Timothy KW, Leppert M, Keating M. The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 1992;327:846-52.
41. Perkiomaki JS, Zareba W, Nomura A, Andrews M, Kaufman ES, Moss AJ. Repolarization dynamics in patients with long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2002;13:651-6.
42. Zareba W, Moss AJ, le Cessie S, Hall WJ. T wave alternans in idiopathic long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 1994;23:1541-6.
43. Narayan SM. T-wave alternans and the susceptibility to ventricular arrhythmias. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:269-81.
44. Beinder E, Grancay T, Menendez T, Singer H, Hofbeck M. Fetal sinus bradycardia and the long QT syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:743-7.
45. Lupoglazoff JM, Denjoy I, Villain E, Fressart V, Simon F, Bozio A, et al. Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:826-30.
46. Scott WA, Dick M, 2nd. Two:one atrioventricular block in infants with congenital long QT syndrome. *Am J Cardiol.* 1987;60:1409-10.
47. Garson A, Jr., Dick M, 2nd, Fournier A, Gillette PC, Hamilton R, Kugler JD, et al. The long QT syndrome in children. An international study of 287 patients. *Circulation.* 1993;87:1866-72.
48. Trippel DL, Parsons MK, Gillette PC. Infants with long-QT syndrome and 2:1 atrioventricular block. *Am Heart J.* 1995;130:1130-4.
49. Gorgels AP, Al Fadley F, Zaman L, Kantoch MJ, Al Halees Z. The long QT syndrome with impaired atrioventricular conduction: a malignant variant in infants. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1998;9:1225-32.
50. Van Hare GF, Franz MR, Roge C, Scheinman MM. Persistent functional atrioventricular block in two patients with prolonged QT intervals: elucidation of the mechanism of block. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1990;13:608-18.
51. Lupoglazoff JM, Cheav T, Baroudi G, Berthet M, Denjoy I, Cauchemez B, et al. Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to-one atrioventricular block. *Circ Res.* 2001;89:E16-21.
52. Hoorntje T, Alders M, van Tintelen P, van der Lip K, Sreeram N, van der Wal A, et al. Homozygous premature truncation of the HERG protein : the human HERG knockout. *Circulation.* 1999;100:1264-7.
53. Piippo K, Laitinen P, Swan H, Toivonen L, Viitasalo M, Pasternack M, et al. Homozygosity for a HERG potassium channel mutation causes a severe form of long QT syndrome: identification of an apparent founder mutation in the Finns. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1919-25.
54. Noda T, Shimizu W, Satomi K, Suyama K, Kurita T, Aihara N, et al. Classification and mechanism of Torsade de Pointes initiation in patients with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J.* 2004;25:2149-54.
55. Liu J, Laurita KR. The mechanism of pause-induced torsade de pointes in long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005;16:981-7.
56. Viskin S, Fish R, Zeltser D, Belhassen B, Heller K, Brosh D, et al. Arrhythmias in the congenital long QT syndrome: how often is torsade de pointes pause dependent? *Heart.* 2000;83:661-6.
57. Walker BD, Krahn AD, Klein GJ, Skanes AC, Yee R. Burst bicycle exercise facilitates diagnosis of latent long QT syndrome. *Am Heart J.* 2005;150:1059-63.
58. Vincent GM, Jaiswal D, Timothy KW. Effects of exercise on heart rate, QT, QTc and QT/QTs2 in the Romano-Ward inherited long QT syndrome. *Am J Cardiol.* 1991;68:498-503.

59. Takenaka K, Ai T, Shimizu W, Kobori A, Ninomiya T, Otani H, et al. Exercise stress test amplifies genotype-phenotype correlation in the LQT1 and LQT2 forms of the long-QT syndrome. *Circulation*. 2003;107:838-44.
60. Swan H, Viitasalo M, Piippo K, Laitinen P, Kontula K, Toivonen L. Sinus node function and ventricular repolarization during exercise stress test in long QT syndrome patients with KvlQT1 and HERG potassium channel defects. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:823-9.
61. Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantu F, Towbin JA, et al. 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*. 1995;92:3381-6.
62. Shimizu W. The long QT syndrome: therapeutic implications of a genetic diagnosis. *Cardiovasc Res*. 2005;67:347-56.
63. Crozier IG, Loughnan A, Dow LJ, Low CJ, Ikram H. Congenital long QT syndrome in adults. *N Z Med J*. 1989;102:340-1.
64. Moss AJ, Zareba W, Kaufman ES, Gartman E, Peterson DR, Benhorin J, et al. Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Circulation*. 2002;105:794-9.
65. Di Paolo M, Luchini D, Bloise R, Priori SG. Postmortem molecular analysis in victims of sudden unexplained death. *Am J Forensic Med Pathol*. 2004;25:182-4.
66. Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ, Edwards WD. Molecular diagnosis of the inherited long-QT syndrome in a woman who died after near-drowning. *N Engl J Med*. 1999;341:1121-5.
67. Chugh SS, Senashova O, Watts A, Tran PT, Zhou Z, Gong Q, et al. Postmortem molecular screening in unexplained sudden death. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1625-9.
68. Tester DJ, Ackerman MJ. The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21:166-72.
69. Tester DJ, Ackerman MJ. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:240-6.
70. Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, et al. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 2007;115:361-7.
71. Schwartz PJ. Pro: Newborn ECG screening to prevent sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 2006;3:1353-5.
72. Quaglini S, Rognoni C, Spazzolini C, Priori SG, Mannarino S, Schwartz PJ. Cost-effectiveness of neonatal ECG screening for the long QT syndrome. *Eur Heart J*. 2006;27:1824-32.
73. Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B, et al. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum Genet*. 2005;13:1213-22.
74. Niu DM, Hwang B, Hwang HW, Wang NH, Wu JY, Lee PC, et al. 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. *J Med Genet*. 2006.
75. Poelzing S, Forleo C, Samodell M, Dudash L, Sorrentino S, Anaclerio M, et al. SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation*. 2006;114:368-76.
76. Crotti L, Lundquist AL, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, De Ferrari GM, et al. KCNH2-K897T is a genetic modifier of latent congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2005;112:1251-8.
77. Yang P, Kanki H, Drolet B, Yang T, Wei J, Viswanathan PC, et al. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation*. 2002;105:1943-8.
78. Plant LD, Bowers PN, Liu Q, Morgan T, Zhang T, State MW, et al. A common cardiac sodium channel variant associated with sudden infant death in African Americans, SCN5A S1103Y. *J Clin Invest*. 2006;116:430-35.
79. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, Pagel MD, Pu J, Tester DJ, et al. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res*. 2003;93:821-8.

80. Tan BH, Valdivia CR, Rok BA, Ye B, Ruwaldt KM, Tester DJ, et al. Common human SCN5A polymorphisms have altered electrophysiology when expressed in Q1077 splice variants. *Heart Rhythm*. 2005;2:741-7.
81. Ackerman MJ, Khositseth A, Tester DJ, Hejlik JB, Shen WK, Porter CB. Epinephrine-induced QT interval prolongation: a gene-specific paradoxical response in congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2002;77:413-21.
82. Khositseth A, Hejlik J, Shen WK, Ackerman MJ. Epinephrine-induced T-wave notching in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2005;2:141-6.
83. Shimizu W, Noda T, Takaki H, Nagaya N, Satomi K, Kurita T, et al. Diagnostic value of epinephrine test for genotyping LQT1, LQT2, and LQT3 forms of congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2004;1:276-83.
84. Vyas H, Hejlik J, Ackerman MJ. Epinephrine QT stress testing in the evaluation of congenital long-QT syndrome: diagnostic accuracy of the paradoxical QT response. *Circulation*. 2006;113:1385-92.
85. Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med*. 2004;350:1013-22.
86. Viskin S, Justo D, Halkin A, Zeltser D. Long QT syndrome caused by noncardiac drugs. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003;45:415-27.
87. Fitzgerald PT, Ackerman MJ. Drug-induced torsades de pointes: the evolving role of pharmacogenetics. *Heart Rhythm*. 2005;2:S30-7.
88. Roden DM. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Intern Med*. 2006;259:59-69.
89. Abriel H, Schlapfer J, Keller DI, Gavillet B, Buclin T, Biollaz J, et al. Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome: an iatrogenic channelopathy. *Swiss Med Wkly*. 2004;134:685-94.
90. Sun Z, Milos PM, Thompson JF, Lloyd DB, Mank-Seymour A, Richmond J, et al. Role of a KCNH2 polymorphism (R1047 L) in dofetilide-induced Torsades de Pointes. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37:1031-9.
91. Ackerman MJ, Tester DJ, Jones GS, Will ML, Burrow CR, Curran ME. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1479-87.
92. Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, Tester DJ, Will ML, Timothy KW, et al. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2004;1:600-7.
93. Ye B, Valdivia CR, Ackerman MJ, Makielski JC. A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiol Genomics*. 2003;12:187-93.
94. Seth R, Moss AJ, McNitt S, Zareba W, Andrews ML, Qi M, et al. Long QT syndrome and pregnancy. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1092-8.
95. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, et al. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348:1866-74.
96. Locati EH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Lehmann MH, et al. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. *Circulation*. 1998;97:2237-44.
97. Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Priori SG, et al. Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group. *N Engl J Med*. 1998;339:960-5.
98. Hobbs J, Peterson D, Moss A, McNitt S, Zareba W, Goldenberg I, et al. Risk of aborted cardiac arrest or sudden death during adolescence in the long-QT syndrome. *JAMA*. 2006;En prensa.
99. Schwartz PJ. The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications. *J Intern Med*. 2006;259:39-47.
100. Itoh T, Kikuchi K, Odagawa Y, Takata S, Yano K, Okada S, et al. Correlation of genetic etiology with response to beta-adrenergic blockade among symptomatic patients with familial long-QT syndrome. *J Hum Genet*. 2001;46:38-40.

101. Shimizu W, Tanabe Y, Aiba T, Inagaki M, Kurita T, Suyama K, et al. Differential effects of beta-blockade on dispersion of repolarization in the absence and presence of sympathetic stimulation between the LQT1 and LQT2 forms of congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1984-91.
102. Chatrath R, Bell CM, Ackerman MJ. Beta-blocker therapy failures in symptomatic probands with genotyped long-QT syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2004;25:459-65.
103. Dorostkar PC, Eldar M, Belhassen B, Scheinman MM. Long-term follow-up of patients with long-QT syndrome treated with beta-blockers and continuous pacing. *Circulation*. 1999;100: 2431-6.
104. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Grillo M, Bloise R, Ronchetti E, et al. Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *Jama*. 2004;292:1341-4.
105. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, et al. Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2000;101:616-23.
106. Benhorin J, Taub R, Goldmit M, Kerem B, Kass RS, Windman I, et al. Effects of flecainide in patients with new SCN5A mutation: mutation-specific therapy for long-QT syndrome? *Circulation*. 2000;101:1698-706.
107. Schulze-Bahr E, Fenge H, Etrrodt D, Haverkamp W, Monnig G, Wedekind H, et al. Long QT syndrome and life threatening arrhythmia in a newborn: molecular diagnosis and treatment response. *Heart*. 2004;90:13-6.
108. Kehl HG, Haverkamp W, Rellensmann G, Yelbuz TM, Krasemann T, Vogt J, et al. Images in cardiovascular medicine. Life-threatening neonatal arrhythmia: successful treatment and confirmation of clinically suspected extreme long QT-syndrome-3. *Circulation*. 2004;109:e205-6.
109. Fredj S, Sampson KJ, Liu H, Kass RS. Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *Br J Pharmacol*. 2006;148:16-24.
110. Shimizu W, Kurita T, Matsuo K, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, et al. Improvement of repolarization abnormalities by a K+ channel opener in the LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 1998;97:1581-8.
111. Etheridge SP, Compton SJ, Tristani-Firouzi M, Mason JW. A new oral therapy for long QT syndrome: long-term oral potassium improves repolarization in patients with HERG mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1777-82.
112. Khan IA, Gowda RM. Novel therapeutics for treatment of long-QT syndrome and torsade de pointes. *Int J Cardiol*. 2004;95:1-6.
113. Viskin S. Cardiac pacing in the long QT syndrome: review of available data and practical recommendations. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2000;11:593-600.
114. Moss AJ, Liu JE, Gottlieb S, Locati EH, Schwartz PJ, Robinson JL. Efficacy of permanent pacing in the management of high-risk patients with long QT syndrome. *Circulation*. 1991;84:1524-9.
115. Pinski SL, Eguia LE, Trohman RG. What is the minimal pacing rate that prevents torsades de pointes? Insights from patients with permanent pacemakers. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2002;25:1612-5.
116. Monnig G, Kobe J, Loher A, Eckardt L, Wedekind H, Scheld HH, et al. Implantable cardioverter-defibrillator therapy in patients with congenital long-QT syndrome: a long-term follow-up. *Heart Rhythm*. 2005;2:497-504.
117. Zareba W, Moss AJ, Daubert JP, Hall WJ, Robinson JL, Andrews M. Implantable cardioverter defibrillator in high-risk long QT syndrome patients. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:337-41.
119. Goel AK, Berger S, Pelech A, Dhala A. Implantable cardioverter defibrillator therapy in children with long QT syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2004;25:370-8.
120. Moss AJ, McDonald J. Unilateral cervicothoracic sympathetic ganglionectomy for the treatment of long QT interval syndrome. *N Engl J Med*. 1971;285:903-4.
121. Schwartz PJ, Locati EH, Moss AJ, Crampton RS, Trazzi R, Ruberti U. Left cardiac sympathetic denervation in the therapy of congenital long QT syndrome. A worldwide report. *Circulation*. 1991;84:503-11.
122. Wang LX. Role of left cardiac sympathetic denervation in the management of congenital long QT syndrome. *J Postgrad Med*. 2003;49:179-81.

123. Wang L, Feng G. Left cardiac sympathetic denervation as the first-line therapy for congenital long QT syndrome. *Med Hypotheses*. 2004;63:438-41.
124. Schwartz PJ, Priori SG, Cerrone M, Spazzolini C, Odero A, Napolitano C, et al. Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation*. 2004;109:1826-33.
125. Haissaguerre M, Extramiana F, Hocini M, Cauchemez B, Jais P, Cabrera JA, et al. Mapping and ablation of ventricular fibrillation associated with long-QT and Brugada syndromes. *Circulation*. 2003;108:925-8.

CAPÍTULO II

El Síndrome de QT Largo, estudio en una Cohorte Mexicana

Publicado en:

Circulation 2006; 114:18(11-505) Suplemento, Presentado en *American Heart* 2006.

Sodium Current Impairment is prevalent in a cohort of Mexican patients referred for long QT syndrome and/ or mixed phenotype.

Resumen

Se han descrito hasta ahora nueve genes que generan fenotipo de Síndrome de QT largo (SQTl). En población Caucásico-Europea, el análisis genético es positivo en el 75% de los casos, con mutaciones en *KCNQ1* (SQTl1) en el 30-35%, *KCNH2* (SQTl2) 25-30%, *SCN5A* (SQTl3) 5-10%. El espectro y prevalencia de mutaciones en otras razas ha sido pobremente explorada. Entre junio 2004 y abril 2005, 12 probandos de origen Mexicano (8 hombres, edad promedio 16 ± 15 años, promedio de QTc = 566 mseg) con un fenotipo severo de SQTl, fueron referidos para estudio genético. Una vez obtenido el consentimiento informado de todos los participantes, se realizó análisis mutacional de los exones y uniones exon-intron de los genes *KCNQ1* (SQTl1), *KCNH2* (SQTl2), *SCN5A* (SQTl3), *KCNE1* (SQTl5), Y *KCNE2* (SQTl6) utilizando cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC) y secuenciación directa. Los casos negativos a este primer panel, fueron sometidos al análisis mutacional de los genes *ANKB* (SQTl4), *KCNJ2* (SQTl7), *CACNA1C* (SQTl8) y *CAV3* (SQTl9). Todas las

variantes no sinónimas fueron buscadas en 400 alelos de referencia de origen mexicano y 2600 alelos provenientes de población caucásica, negra y asiática. Identificamos 7 variantes no sinónimas y 2 deleciones en 8 de 12 pacientes. Dos casos con Síndrome de Jervell Lange-Nielssen, 5 casos con SQTl3 y un caso con SQTl4. Estas mutaciones comprometen residuos conservados en diferentes especies y ninguna de ellas se encontró en 3000 alelos de referencia. Conclusiones: En contraste al 5-10% de prevalencia de mutaciones en *SCN5A* en población Caucásico-Europea; en esta población, la afección a canal de sodio codificado por *SCN5A*, fue el substrato principal causante de la enfermedad.

Introducción

El síndrome de QT largo (SQTl) se caracteriza por una repolarización ventricular anormal, prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma (ECG) y susceptibilidad a muerte súbita por arritmias ventriculares graves, en particular del tipo *torsades de pointes*. Es una canalopatía cuya base molecular se ha podido conocer en

las últimas dos décadas. Se han descrito 9 genes relacionados con la enfermedad que explican cerca del 75% de los casos. Cinco de estos genes codifican para las unidades formadoras del poro del canal y son: *KCNQ1* (SQTL1) causando 30-35% de los casos, *KCNH2* (SQTL2) 25-30%, *SCN5A* (SQTL3) 5-10%, *KCNJ2* (SQTL7) <1% y *CACNA1C* (SQTL8). Cuatro genes codifican proteínas regulatorias del canal iónico: *ANKK* (SQTL4)¹, *KCNE1*(SQTL5)², *KCNE2*(SQTL6);³ y *CAV3*(SQTL9)⁴; estas proteínas explican menos del 5% de los casos. El entendimiento de los procesos moleculares subyacentes en las canalopatías cardíacas nos permite realizar una mejor estratificación de riesgo, correlación genotipo-fenotipo y guiar el tratamiento.^{6,7}

Los fenotipos mixtos, son mas frecuentes en las mutaciones del canal de sodio, pero los mecanismos moleculares implicados en este fenómeno, no son bien entendidos aún. Se han identificado polimorfismos que tienen propiedades regulatorias, capaces de deteriorar o mejorar el fenotipo; estos polimorfismos no confieren un fenotipo eléctrico característico pero modulan los efectos de las mutaciones^{6,7}. Estos hallazgos han sido importantes para explicar la expresividad variable y la penetrancia incompleta encontrada en la enfermedad⁸. Los estudios en canalopatías arritmogénicas se han realizado principalmente en población caucásica, europea y áfrico-americana, el espectro y prevalencia de las mutaciones en otros grupos étnicos es pobremente entendida. Ciertos polimorfismos regulatorios que confieren susceptibilidad a arritmias, prevalecen en determinados grupos étnicos; por ejemplo, se ha identificado un polimorfismo frecuente en raza negra en el canal de sodio codificado por el gen *SCN5A*, este polimorfismo es el S1103Y; se asocia un riesgo mayor a desarrollar arritmias. Otra variante que se pensó condicionaba

Síndrome de Brugada tipo 1 (SB1), V1915L, se encontró en el 6.7% de la población hispánica de Estados Unidos⁶. Desgraciadamente, dentro del grupo de "Hispanos" en este estudio, se encuentran incluidos las diversas razas que hablan español, principalmente originarios de Latinoamérica, desde amerindios de México, Perú o centro-América a caucásicos de Sudamérica.

En el presente trabajo presentamos el análisis mutacional de una cohorte de 12 pacientes Mexicanos-Mestizos, portadores de formas severas de SQTL aislado o con fenotipo mixto.

Métodos

Población Estudiada

El presente estudio fue realizado de acuerdo a los términos y condiciones establecidos por el Comité de Ética del *Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"*. Entre Junio 2004 y Abril 2005, 12 pacientes Mexicanos Mestizos (8 varones, edad promedio 16 ± 15 años, QTc (QT corregido por fórmula de Bazett = 566 ms) con fenotipo de SQTL o mixto severo, fueron referidos a la unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" para su evaluación. Se catalogó como "alto riesgo de muerte súbita" aquellos casos que presentaran al menos una de las siguientes condiciones⁹: QTc > 500 mseg, edad temprana al diagnóstico (<5 años), antecedente de arritmia ventricular, SQTL asociado a sordera (Síndrome de Jervell-Lange-Nielsen)¹⁰ o SQTL asociado a sindactilia¹¹.

Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes. Se colectaron además 200 muestras de ADN de sujetos controles de raza Mexicano-Mestiza. El

Mexicano-Mestizo resulta de la mezcla de Americanos nativos y Europeos (principalmente Españoles), con mínima contribución de grupos asiáticos y africanos. 1300 muestras control adicionales provenientes de población Caucásica, Africo-Americanos y Asiáticos; facilitados por *Windland Smith Rice, Sudden Death Genomics Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, MN USA*, fueron también evaluadas.

Análisis Mutacional

Se obtuvo ADN genómico de linfocitos periféricos de los casos índice y familiares que aceptaron participar en el estudio. Por medio de cromatografía líquida desnaturalizante (DHPLC), seguida de secuenciación directa de los perfiles anormales, se realizó análisis mutacional de las regiones codificadoras y uniones exon-intron de los genes que con mayor frecuencia se asocian a SQT, estos son: *KCNQ1* (SQT1), *KCNH2* (SQT2), *SCN5A* (SQT3), *KCNE1* (SQT5), Y *KCNE2* (SQT6). Los casos negativos a este primer escaneo genético, fueron sometidos a análisis mutacional de los genes que en forma rara se asocian a SQT, estos son: *ANKB* (SQT4), *KCNJ2* (SQT7), *CACNA1C* (SQT8) y *CAV3* (SQT9). Debido a la necesidad de descartar todos los genes conocidos en cada uno de los probandos, parte del análisis mutacional se realizó en el laboratorio de Genómica de la Muerte Súbita, dirigida por el Dr. Michael Ackerman, en la Clínica Mayo, Rochester MN, a través de un estancia de investigación realizada con apoyo y autorización del posgrado. Todas las variaciones no sinónimas no reportadas en la literatura, fueron buscadas en 3000 alelos de referencia, derivados de población mexicana-mestiza, caucásicos, áfrico-americanos y asiáticos.

Resultados

Fueron identificadas 7 variantes no sinónimas y 2 deleciones en 8 de 12 probandos

(**Tabla 2.1**). 2 variantes homocigotas en el gen *KCNQ1* (SQT1) que en forma esperada, condicionaron el fenotipo Sx de Jervell-Lange-Nielsen, (sordera congénita en presencia SQT, **Figura 2.1**), 6 variantes en *SCN5A*, 2 en un mismo paciente (SQT3, **Figura 2.2**) y una variante en *ANKB* (SQT4, **Figura 2.3**). Estas mutaciones involucraron residuos conservados en diferentes especies y ninguna de las mutaciones se documentó en 3000 alelos de referencia, a excepción de R1450W-*ANKB* que se encontró en un control de origen Caucásico.

Discusión y Conclusiones

En el presente estudio encontramos una predominancia de mutaciones en canal de sodio. Mientras que en otras poblaciones, las mutaciones en canal de sodio abarcan 10% de los pacientes con SQT, en este grupo selecto superó el 50%. Es probable que el motivo de esta discrepancia sea la selección de los casos, pues todos presentaban un fenotipo muy grave, pero queda abierta la posibilidad de que en población mexicano-mestiza las mutaciones en canal de sodio sean mas frecuentes que en otras poblaciones, para confirmar esto será necesario el estudio de un número mayor de pacientes.

Mutaciones en el gen *KCNQ1*

Las variantes G272D y R518X se encontraron en forma homocigota condicionando el Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen (SJLN), variante severa del SQT; se asocia a sordera congénita y alto riesgo de muerte súbita por arritmias ventriculares malignas¹². Se sabe que el síndrome es causado por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en los genes *KCNQ1* y *KCNE1* que codifican el canal de potasio IKS, subunidades α y β respectivamente. Este canal juega un papel crucial en la

Tabla 1. Hallazgos Clínicos y Genéticos

Caso	Sexo	Gen	Exon	Cambio Nucleótido	Cambio Aminoácido	Localización	QTc (ms)*	Otro hallazgo clínico	Primer Síntoma	Edad al primer Síntoma	Historia Familiar de MS
1	M	KCNQ1 KCNF1	6 3	815 G>A 112 G>A	G272D [†] G38S [§]	S5	660	JLN, TP	Síncope	1 semana	NEG
2	M	KCNQ1 KCNF1	12 3	1552 C>T 112 G>A	R518X [†] G38S	C-Terminal	629	JLN, TP	Convulsiones	6 meses	NEG
3	M	SCN5A SCN5A KCNF2	2 20 2	del G-104 3884 G>A 22 A>G	R34F/s/60 [‡] R1195H [‡] T8A [§]	N-Terminal DII S3-DIII S1	603	Flutter Atrial, TV	Taquicardia	3 meses	NEG
4	M	SCN5A SCN5A KCNF1 KCNF2	7 12 3 2	718 G>A 1673 A>G 112 G>A 22 A>G	V240M [‡] H558R [§] G38S T8A	DI, S4-S5	475	DNS, TV	Bradicardia	4 años	NEG
5	M	SCN5A	16	2678 G>A	R893H [‡]	DII, Poro	447	FV	Paro Cardíaco	21 años	NEG
6	M	SCN5A SCN5A KCNF1	28 12 3	5123 C>A 1673 A>G 112 G>A	T1708N [‡] H558R G38S	DIV, Poro	490	Bloqueo AV I°, DCC, TV	Taquicardia	5 años	POS
7	M	SCN5A KCNF1	28 3	del 5464-5467 112 G>A	L1821 F [‡] /I0 [‡] G38S	C-Terminal	550	DCC DNS, TV	Bradicardia	Fetal	NEG
8	F	ANKB SCN5A KCNF1	38 12 3	4348 C>T 1673 A>G 112 G>A	R1450W R558R G38S	Sitio de Unión a Espectra D	471	VF	Paro Cardíaco	39 años	NEG
9	F	SCN5A	12	1673 A>G	H558R		712	Bloqueo AV 2:1	Bradicardia	Fetal	POS
10	F	SCN5A KCNF1	12 3	1673 A>G 112 G>A	H558R G38S		648	Bloqueo AV 2:1	Bradicardia	Fetal	POS
11	F	KCNH2 KCNF1	11 3	2690 A>C 112 G>A	K897T [§] G38S		490	TP	Síncope	50 años	NEG
12	F						481	TP	Convulsiones	11 años	POS

*Corregido con fórmula de Bazett; MS: Muerte Súbita; M masculino; F femenino; Mutaciones en negritas; †homocigoto; ‡mutación no reportada; § Polimorfismo; POS positivo; NEG negativo; D: dominio; S: segmento; TP: torsades de pointes; JLN: Jervell Lange-Nielsen; TV: taquicardia ventricular; FV: fibrilación ventricular; DNS: Disfunción nodo sinusal; DCC: Defectos en la conducción cardíaca intraventricular.

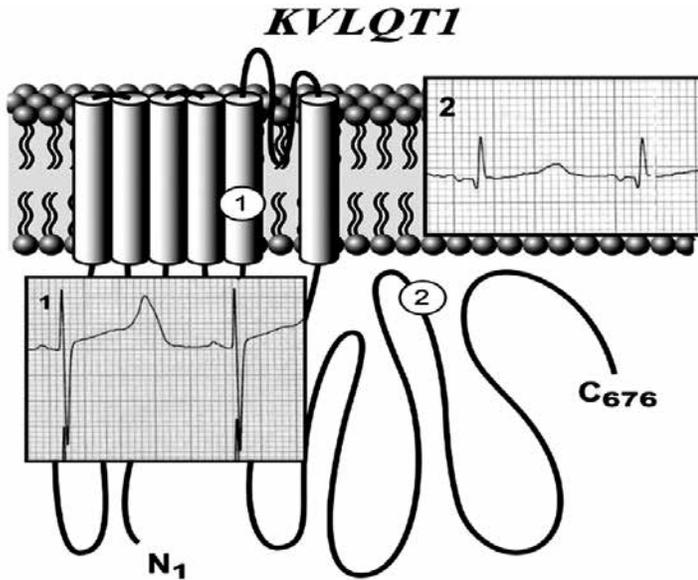


Figura 2.1

Topología lineal del canal IKS de potasio codificado por KCNQ1, se muestran los sitios correspondientes a las mutaciones encontradas así como los respectivos electrocardiogramas representativos.

repolarización ventricular y en el funcionamiento del oído interno. G272D se localiza en el segmento 5 del canal IKS (**Figura 2.1**), esta mutación ha sido reportada previamente en forma heterocigota¹³ en pacientes con SQT, pero no ha sido reportada en forma homocigota condicionando el SJLN. La mutación R518X, trunca prematuramente la región carboxilo Terminal del canal IKS, ha sido reportada previamente, tanto en SQT aislado como en la forma de SJLN¹⁴.

Mutaciones en el gen SCN5A

En población Caucásica, las mutaciones en el gen *SCN5A* que codifica la isoforma $Na_v1.5$ del canal de sodio, son responsables de cerca del 10% de los casos con SQT, 20% de los casos con Síndrome de Brugada y 2-5% de los casos que presentan muerte

súbita infantil; también genera otros fenotipos: disfunción de nodo sinusal, fibrilación ventricular idiopática, defectos en la conducción cardiaca, fibrilación atrial y miocardiopatía dilatada¹⁵. Las mutaciones que dan lugar a SQT generan un incremento en la conductancia al ión sodio, mientras que los demás fenotipos resultan de la pérdida de función del canal de sodio. Ninguna de las mutaciones encontradas en canal de sodio en esta cohorte mexicana (**Figura 2.2**) fue encontrada en controles (3000 alelos de referencia).

La mutación **SCN5A-R34Fs/60** se encontró en una paciente que presentaba también la mutante **R1195H**. R34Fs/60 determina un truncamiento prematuro de la proteína en el residuo 34, cuando normalmente el canal de sodio esta constituido de 2016 o

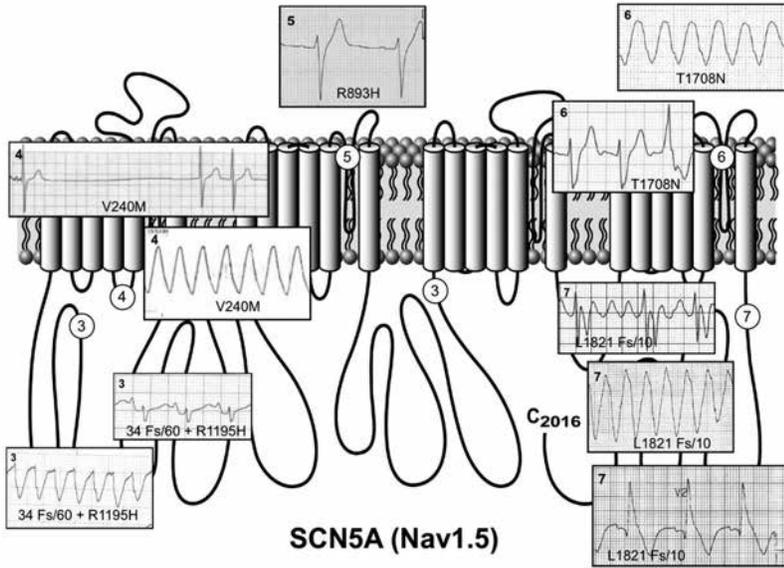


Figura 2.2

Topología lineal del canal $Na_{v1.5}$ de sodio codificado por SCN5A, se muestran los sitios correspondientes a las mutaciones encontradas así como los respectivos electrocardiogramas representativos.

2015 aminoácidos. El último residuo que se codifica en forma apropiada es una Arginina (R) en la posición 34; la delección de una Glicina genera un cambio en el marco de lectura; se adicionan 60 aminoácidos que no existen en la proteína original y finalmente, al encontrar un codón de paro, la proteína se trunca, en la región amino-terminal. A pesar de la importante disrupción del canal por parte de un alelo, el progenitor portador de esta variante, tiene un fenotipo normal. Esto sugiere que el alelo normal es capaz de compensar en forma apropiada la ausencia de la proteína. El caso índice, desgraciadamente heredó un segundo alelo enfermo por parte del otro progenitor, R1195H, la asociación de R34Fs/60 con R1195H, resultó en un fenotipo mixto muy severo, caracterizado

por aleteo auricular, taquicardia ventricular y SQT/L manifestado en los primeros meses de vida. La mutante R1195H no condicionó un fenotipo severo en el progenitor con el otro alelo sano.

R1195H se localiza en el asa intracelular entre los dominios DIII-DIV. 60% de las variantes encontradas en sujetos sanos, se encuentran en esta región⁶, por lo que en principio esta variante pudiera no dar un fenotipo molecular severo. Este caso en particular es motivo de amplia discusión en el Capítulo IV.

V240M fue encontrada en un paciente con fenotipo mixto, enfermedad del nodo sinusal, taquicardia ventricular y SQT/L. Se localiza en el dominio I, en el asa citoplasmática que conecta los segmentos 4 y 5. Si

bien V240M no ha sido reportada previamente, existe una mutación muy cercana a este residuo, Q245K, que ha sido asociada previamente al SQT¹⁶.

R893H se localiza en la región del poro del canal del dominio 2, el fenotipo de este caso fue muy severo, el paciente, varón, tenía un QTc limitrofe, presentó 2 episodios sincopales a la edad de 18 años y finalmente muerte súbita a la edad de 22 años.

T1708N también se localiza en la región del poro, pero del dominio 4. Esta mutación se encontró en un caso de 11 años de edad con antecedente de muerte súbita en dos familiares, madre y hermano. El fenotipo en este caso consistió en trastornos en la conducción ventricular, prolongación del intervalo QT, taquicardia ventricular.

Las mutaciones en el poro de Na_v1.5 han sido asociadas con fenotipo de pérdida de la función¹⁷⁻²¹. Cerca de 30 mutaciones en el poro han sido descritas (<http://www.fsm.it/cardmoc/>) 25 de ellas muestran un fenotipo clínico y biofísico de pérdida o disminución en la función del canal⁶.

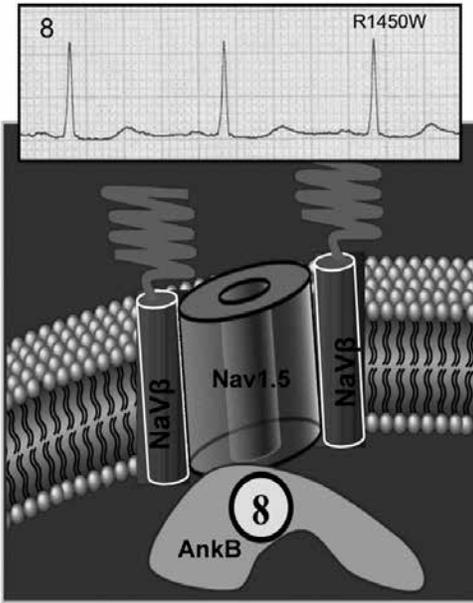
L1821Fs/10 genera un canal de sodio que carece de los últimos 195 aminoácidos de la región carboxilo terminal. Esta región va del aminoácido 1773 al 2016. En la mutante L1821Fs/10, los primeros 48 residuos de la región carboxilo terminal son codificados normalmente. La delección de 4 bases genera cambio en el marco de lectura, se adicionan 10 aminoácidos que no son parte de la proteína original y finalmente la proteína se trunca. La región carboxilo-terminal del canal de sodio participa en la inactivación del canal, se sabe que el complejo molecular de inactivación se forma al asociarse el motivo IFM del asa entre los segmentos III-IV y la región carboxilo terminal²²⁻²³. Se ha demostrado por medio de

mutagénesis dirigida, que el truncamiento de la proteína en la posición 1885 desacopla la región CT del asa II-IV, reduce la densidad de corriente y favorece corriente tardía. El paciente con la delección L1821Fs/10, presentó un fenotipo mixto, prolongación del intervalo QT, taquicardia ventricular, disfunción del nodo sinusal y trastornos en la conducción intraventricular; constituye el primer caso en la literatura con delección en esta región y es motivo de amplia discusión en el capítulo V de esta tesis.

Es de notar que 4 de 5 pacientes con mutaciones en canal de sodio en esta cohorte, presentaron taquicardia ventricular monomórfica. Este es un hallazgo infrecuente en las canalopatías arritmogénicas, se han descrito casos aislados en el contexto de pérdida de la función del canal de sodio, en particular el síndrome de Brugada, pero no se había descrito antes en el contexto de fenotipos mixtos. Esta arritmia es sensible a la estimulación ventricular, lo que sugiere un mecanismo de re-entrada²⁴. Interesante es que se ha reportado en modelos animales, que la disrupción heterocigota de *SCN5A* en ratones, genera una disminución en la conductancia al sodio y los animales presentan arritmias ventriculares por re-entrada²⁵.

Mutaciones en el gen *AnkB*

R1450W se localiza en el “Dominio Muerto” de la proteína Anquirina B. Esta variante fue encontrada también en un control de origen Caucásico. Desconocemos el fenotipo electrocardiográfico del control. Esta variante fue caracterizada recientemente, se encontró una discreta pérdida de la función comparada con la ANKB silvestre²⁸. Basados en estos estudios, es probable que la variante R1450W no produzca muchos síntomas por sí misma, pero el caso en



ANKB (Ankirina B)

cuestión tiene otra variante en canal de sodio, codificado por *SCN5A*, H558R de hecho es homocigoto al alelo menor (Arginina); este polimorfismo se encuentra en el 30% de los sujetos normales⁶ y produce una marcada reducción de la corriente de sodio en presencia del producto resultante de un procesamiento alternativo del canal que contiene una Glicina en la posición (Q₁₀₇₇, 35% de los transcritos)²⁹. Los estudios in vitro no han evaluado el efecto del polimorfismo H558R en presencia de mutaciones en Anquirina B, pero sospechamos que ambas variantes contribuyen al fenotipo del caso. Por otro lado, otras variantes en ANKB documentadas en pacientes y con anomalías in vitro, también se han encontrado en controles²⁷; estas variantes muestran diversos grados de pérdida de la función en ANKB y pueden conferir un riesgo subclínico al desarrollo de muerte súbita. Un ejemplo es la

Figura 2.3

Esquema que ilustra la subunidad alfa o principal del canal de sodio, las subunidades auxiliares o beta, la proteína Anquirina B donde se encontró la variante R1450W y el trazo electrocardiográfico representativo del caso.

variante L1622I en ANKB, encontrada en una familia con SQT_L atípico²⁶, se ha documentado que es una variante común en población Africo-Americana²⁷ y muestra una discreta disminución en la función en estudios in vitro²⁸.

R1450W-ANKB (**Figura 2.3**) se encontró en una mujer de 36 años de edad con un QT_c límite que tuvo un evento de fibrilación ventricular, se le implantó un desfibrilador después de haber sido reanimada de un evento de Muerte Súbita. Posteriormente cursó con tormenta arritmica, disparada por una extrasístole ventricular. Los pacientes con mutaciones en ANKB frecuentemente muestran un fenotipo de SQT_L atípico, el intervalo QT no suele prolongarse significativamente y pueden documentarse otras arritmias como bradicardia, fibrilación ventricular y taquicardia ventricular polimórfica^{26,27}.

En contraste al 10% en prevalencia de mutaciones encontradas en *SCN5A* en población Caucásico/Europea, las alteraciones en el complejo macromolecular de canal de sodio, fue el substrato patogénico predominante en esta cohorte Mexicano-Mestiza con SQTl severo y/o fenotipo mixto. La identificación de variantes en

canales iónicos en los diferentes grupos étnicos será de utilidad para determinar la susceptibilidad genética al desarrollo de arritmias malignas y muerte súbita en los diferentes grupos étnicos.

Referencias

- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*. 2003;421:634-639.
- Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the *hminK* gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet*. 1997;17:338-340.
- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999;97:175-187.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, et al. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*. 2006;114:2104-2112.
- Medeiros A, Kaku T, Tester DJ, et al. Sodium channel β_4 subunit mutation causes congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2006;3:534.
- Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, et al. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2004;1:600-607.
- Ackerman MJ, Tester DJ, Jones GS, Will ML, Burrow CR, Curran ME. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1479-1487.
- Poelzing S, Forleo C, Samodell M, et al. *SCN5A* polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation*. 2006;114:368-376.
- Monnig G, Eckardt L, Wedekind H, et al. Electrocardiographic risk stratification in families with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J*. 2006.
- Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W, et al. Clinical Course and Risk Stratification of Patients Affected with the Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006.
- Hobbs JB, Peterson DR, Moss AJ, et al. Risk of aborted cardiac arrest or sudden cardiac death during adolescence in the long-QT syndrome. *Jama*. 2006;296:1249-1254.
- Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, et al. The Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. Natural History, Molecular Basis, and Clinical Outcome. *Circulation*. 2006.
- Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *Jama*. 2005;294:2975-2980.
- Wei J, Fish FA, Myerburg RJ, Roden DM, George AL, Jr. Novel *KCNQ1* mutations associated with recessive and dominant congenital long QT syndromes: evidence for variable hearing phenotype associated with R518X. *Hum Mutat*. 2000;15:387-388.
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, et al. *SCN5A* mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*. 2004;110:2163-2167.
- Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005;2:507-517.

17. Pfahnl AE, Viswanathan PC, Weiss R, et al. A sodium channel pore mutation causing Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2007;4:46-53.
18. Rossenbacker T, Carroll SJ, Liu H, et al. Novel pore mutation in SCN5A manifests as a spectrum of phenotypes ranging from atrial flutter, conduction disease, and Brugada syndrome to sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 2004;1:610-615.
19. Itoh H, Shimizu M, Takata S, Mabuchi H, Imoto K. A novel missense mutation in the SCN5A gene associated with Brugada syndrome bidirectionally affecting blocking actions of antiarrhythmic drugs. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2005;16:486-493.
20. Valdivia CR, Tester DJ, Rok BA, et al. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res*. 2004;62:53-62.
21. Kyndt F, Probst V, Potet F, et al. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081-3086.
22. Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem*. 2002;277:9233-9241.
23. Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol*. 2004;123:155-165.
24. Bertomeu-Gonzalez V, Ruiz-Granell R, Garcia-Civera R, Morell-Cabedo S, Ferrero A. Syncopal monomorphic ventricular tachycardia with pleomorphism, sensitive to antitachycardia pacing in a patient with Brugada syndrome. *Europace*. 2006;8:1048-1050.
25. Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, et al. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:6210-6215.
26. Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, et al. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9137-9142.
27. Sherman J, Tester DJ, Ackerman MJ. Targeted mutational analysis of ankyrin-B in 541 consecutive, unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing and 200 healthy subjects. *Heart Rhythm*. 2005;2:1218-1223.
28. Mohler PJ, Le Scouarnec S, Denjoy I, et al. Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes. *Circulation*. 2007;115:432-441.
29. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, et al. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res*. 2003;93:821-828.
30. Zareba W. Genotype-specific ECG patterns in long QT syndrome. *J Electrocardiol*. 2006; 39: S101-106.
31. Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, et al. Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. 32. Wang DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL, Jr., Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block.

CAPÍTULO II

El Síndrome de QT Largo, estudio en una Cohorte Mexicana

Publicado en:

Circulation 2006; 114:18(11-505) Suplemento, Presentado en *American Heart* 2006.

Sodium Current Impairment is prevalent in a cohort of Mexican patients referred for long QT syndrome and/ or mixed phenotype.

Resumen

Se han descrito hasta ahora nueve genes que generan fenotipo de Síndrome de QT largo (SQTl). En población Caucásico-Europea, el análisis genético es positivo en el 75% de los casos, con mutaciones en *KCNQ1* (SQTl1) en el 30-35%, *KCNH2* (SQTl2) 25-30%, *SCN5A* (SQTl3) 5-10%. El espectro y prevalencia de mutaciones en otras razas ha sido pobremente explorada. Entre junio 2004 y abril 2005, 12 probandos de origen Mexicano (8 hombres, edad promedio 16 ± 15 años, promedio de QTc = 566 mseg) con un fenotipo severo de SQTl, fueron referidos para estudio genético. Una vez obtenido el consentimiento informado de todos los participantes, se realizó análisis mutacional de los exones y uniones exon-intron de los genes *KCNQ1* (SQTl1), *KCNH2* (SQTl2), *SCN5A* (SQTl3), *KCNE1* (SQTl5), Y *KCNE2* (SQTl6) utilizando cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC) y secuenciación directa. Los casos negativos a este primer panel, fueron sometidos al análisis mutacional de los genes *ANKB* (SQTl4), *KCNJ2* (SQTl7), *CACNA1C* (SQTl8) y *CAV3* (SQTl9). Todas las

variantes no sinónimas fueron buscadas en 400 alelos de referencia de origen mexicano y 2600 alelos provenientes de población caucásica, negra y asiática. Identificamos 7 variantes no sinónimas y 2 deleciones en 8 de 12 pacientes. Dos casos con Síndrome de Jervell Lange-Nielssen, 5 casos con SQTl3 y un caso con SQTl4. Estas mutaciones comprometen residuos conservados en diferentes especies y ninguna de ellas se encontró en 3000 alelos de referencia. Conclusiones: En contraste al 5-10% de prevalencia de mutaciones en *SCN5A* en población Caucásico-Europea; en esta población, la afección a canal de sodio codificado por *SCN5A*, fue el substrato principal causante de la enfermedad.

Introducción

El síndrome de QT largo (SQTl) se caracteriza por una repolarización ventricular anormal, prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma (ECG) y susceptibilidad a muerte súbita por arritmias ventriculares graves, en particular del tipo *torsades de pointes*. Es una canalopatía cuya base molecular se ha podido conocer en

las últimas dos décadas. Se han descrito 9 genes relacionados con la enfermedad que explican cerca del 75% de los casos. Cinco de estos genes codifican para las unidades formadoras del poro del canal y son: *KCNQ1* (SQTL1) causando 30-35% de los casos, *KCNH2* (SQTL2) 25-30%, *SCN5A* (SQTL3) 5-10%, *KCNJ2* (SQTL7) <1% y *CACNA1C* (SQTL8). Cuatro genes codifican proteínas regulatorias del canal iónico: *ANKK* (SQTL4)¹, *KCNE1*(SQTL5)², *KCNE2*(SQTL6);³ y *CAV3*(SQTL9)⁴; estas proteínas explican menos del 5% de los casos. El entendimiento de los procesos moleculares subyacentes en las canalopatías cardíacas nos permite realizar una mejor estratificación de riesgo, correlación genotipo-fenotipo y guiar el tratamiento.^{6,7}

Los fenotipos mixtos, son mas frecuentes en las mutaciones del canal de sodio, pero los mecanismos moleculares implicados en este fenómeno, no son bien entendidos aún. Se han identificado polimorfismos que tienen propiedades regulatorias, capaces de deteriorar o mejorar el fenotipo; estos polimorfismos no confieren un fenotipo eléctrico característico pero modulan los efectos de las mutaciones^{6,7}. Estos hallazgos han sido importantes para explicar la expresividad variable y la penetrancia incompleta encontrada en la enfermedad⁸. Los estudios en canalopatías arritmogénicas se han realizado principalmente en población caucásica, europea y áfrico-americana, el espectro y prevalencia de las mutaciones en otros grupos étnicos es pobremente entendida. Ciertos polimorfismos regulatorios que confieren susceptibilidad a arritmias, prevalecen en determinados grupos étnicos; por ejemplo, se ha identificado un polimorfismo frecuente en raza negra en el canal de sodio codificado por el gen *SCN5A*, este polimorfismo es el S1103Y; se asocia un riesgo mayor a desarrollar arritmias. Otra variante que se pensó condicionaba

Síndrome de Brugada tipo 1 (SB1), V1915L, se encontró en el 6.7% de la población hispanica de Estados Unidos⁶. Desgraciadamente, dentro del grupo de "Hispanos" en este estudio, se encuentran incluidos las diversas razas que hablan español, principalmente originarios de Latinoamérica, desde amerindios de México, Perú o centro-América a caucásicos de Sudamérica.

En el presente trabajo presentamos el análisis mutacional de una cohorte de 12 pacientes Mexicanos-Mestizos, portadores de formas severas de SQTL aislado o con fenotipo mixto.

Métodos

Población Estudiada

El presente estudio fue realizado de acuerdo a los términos y condiciones establecidos por el Comité de Ética del *Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"*. Entre Junio 2004 y Abril 2005, 12 pacientes Mexicanos Mestizos (8 varones, edad promedio 16 ± 15 años, QTc (QT corregido por fórmula de Bazett = 566 ms) con fenotipo de SQTL o mixto severo, fueron referidos a la unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" para su evaluación. Se catalogó como "alto riesgo de muerte súbita" aquellos casos que presentaran al menos una de las siguientes condiciones⁹: QTc > 500 msec, edad temprana al diagnóstico (<5 años), antecedente de arritmia ventricular, SQTL asociado a sordera (Síndrome de Jervell-Lange-Nielsen)¹⁰ o SQTL asociado a sindactilia¹¹.

Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes. Se colectaron además 200 muestras de ADN de sujetos controles de raza Mexicano-Mestiza. El

Mexicano-Mestizo resulta de la mezcla de Americanos nativos y Europeos (principalmente Españoles), con mínima contribución de grupos asiáticos y africanos. 1300 muestras control adicionales provenientes de población Caucásica, Africo-Americanos y Asiáticos; facilitados por *Windland Smith Rice, Sudden Death Genomics Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, MN USA*, fueron también evaluadas.

Análisis Mutacional

Se obtuvo ADN genómico de linfocitos periféricos de los casos índice y familiares que aceptaron participar en el estudio. Por medio de cromatografía líquida desnaturalizante (DHPLC), seguida de secuenciación directa de los perfiles anormales, se realizó análisis mutacional de las regiones codificadoras y uniones exon-intron de los genes que con mayor frecuencia se asocian a SQT, estos son: *KCNQ1* (SQT1), *KCNH2* (SQT2), *SCN5A* (SQT3), *KCNE1* (SQT5), Y *KCNE2* (SQT6). Los casos negativos a este primer escaneo genético, fueron sometidos a análisis mutacional de los genes que en forma rara se asocian a SQT, estos son: *ANKB* (SQT4), *KCNJ2* (SQT7), *CACNA1C* (SQT8) y *CAV3* (SQT9). Debido a la necesidad de descartar todos los genes conocidos en cada uno de los probandos, parte del análisis mutacional se realizó en el laboratorio de Genómica de la Muerte Súbita, dirigida por el Dr. Michael Ackerman, en la Clínica Mayo, Rochester MN, a través de un estancia de investigación realizada con apoyo y autorización del posgrado. Todas las variaciones no sinónimas no reportadas en la literatura, fueron buscadas en 3000 alelos de referencia, derivados de población mexicana-mestiza, caucásicos, áfrico-americanos y asiáticos.

Resultados

Fueron identificadas 7 variantes no sinónimas y 2 deleciones en 8 de 12 probandos

(**Tabla 2.1**). 2 variantes homocigotas en el gen *KCNQ1* (SQT1) que en forma esperada, condicionaron el fenotipo Sx de Jervell-Lange-Nielsen, (sordera congénita en presencia SQT, **Figura 2.1**), 6 variantes en *SCN5A*, 2 en un mismo paciente (SQT3, **Figura 2.2**) y una variante en *ANKB* (SQT4, **Figura 2.3**). Estas mutaciones involucraron residuos conservados en diferentes especies y ninguna de las mutaciones se documentó en 3000 alelos de referencia, a excepción de R1450W-*ANKB* que se encontró en un control de origen Caucásico.

Discusión y Conclusiones

En el presente estudio encontramos una predominancia de mutaciones en canal de sodio. Mientras que en otras poblaciones, las mutaciones en canal de sodio abarcan 10% de los pacientes con SQT, en este grupo selecto superó el 50%. Es probable que el motivo de esta discrepancia sea la selección de los casos, pues todos presentaban un fenotipo muy grave, pero queda abierta la posibilidad de que en población mexicano-mestiza las mutaciones en canal de sodio sean mas frecuentes que en otras poblaciones, para confirmar esto será necesario el estudio de un número mayor de pacientes.

Mutaciones en el gen *KCNQ1*

Las variantes G272D y R518X se encontraron en forma homocigota condicionando el Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen (SJLN), variante severa del SQT; se asocia a sordera congénita y alto riesgo de muerte súbita por arritmias ventriculares malignas¹². Se sabe que el síndrome es causado por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en los genes *KCNQ1* y *KCNE1* que codifican el canal de potasio IKS, subunidades α y β respectivamente. Este canal juega un papel crucial en la

Tabla 1. Hallazgos Clínicos y Genéticos

Caso	Sexo	Gen	Exon	Cambio Nucleótido	Cambio Aminoácido	Localización	QTc (ms)*	Otro hallazgo clínico	Primer Síntoma	Edad al primer Síntoma	Historia Familiar de MS
1	M	KCNQ1 KCNF1	6 3	815 G>A 112 G>A	G272D [†] G38S [§]	S5	660	JLN, TP	Síncope	1 semana	NEG
2	M	KCNQ1 KCNF1	12 3	1552 C>T 112 G>A	R518X [†] G38S	C-Terminal	629	JLN, TP	Convulsiones	6 meses	NEG
3	M	SCN5A SCN5A KCNF2	2 20 2	del G-104 3884 G>A 22 A>G	R34F/s/60 [‡] R1195H [‡] T8A [§]	N-Terminal DII S3-DIII S1	603	Flutter Atrial, TV	Taquicardia	3 meses	NEG
4	M	SCN5A SCN5A KCNF1 KCNF2	7 12 3 2	718 G>A 1673 A>G 112 G>A 22 A>G	V240M [‡] H558R [§] G38S T8A	DI, S4-S5	475	DNS, TV	Bradicardia	4 años	NEG
5	M	SCN5A	16	2678 G>A	R893H [‡]	DII, Poro	447	FV	Paro Cardíaco	21 años	NEG
6	M	SCN5A SCN5A KCNF1	28 12 3	5123 C>A 1673 A>G 112 G>A	T1708N [‡] H558R G38S	DIV, Poro	490	Bloqueo AV I ^o , DCC, TV	Taquicardia	5 años	POS
7	M	SCN5A KCNF1	28 3	del 5464-5467 112 G>A	L1821 F/I0 [‡] G38S	C-Terminal	550	DCC DNS, TV	Bradicardia	Fetal	NEG
8	F	ANKB SCN5A KCNF1	38 12 3	4348 C>T 1673 A>G 112 G>A	R1450W R558R G38S	Sitio de Unión a Espectra D	471	VF	Paro Cardíaco	39 años	NEG
9	F	SCN5A	12	1673 A>G	H558R		712	Bloqueo AV 2:1	Bradicardia	Fetal	POS
10	F	SCN5A KCNF1	12 3	1673 A>G 112 G>A	H558R G38S		648	Bloqueo AV 2:1	Bradicardia	Fetal	POS
11	F	KCNH2 KCNF1	11 3	2690 A>C 112 G>A	K897T [§] G38S		490	TP	Síncope	50 años	NEG
12	F						481	TP	Convulsiones	11 años	POS

*Corregido con fórmula de Bazett; MS: Muerte Súbita; M masculino; F femenino; Mutaciones en negritas; †homocigoto; ‡mutación no reportada; § Polimorfismo; POS positivo; NEG negativo; D: dominio; S: segmento; TP: torsades de pointes; JLN: Jervell Lange-Nielsen; TV: taquicardia ventricular; FV: fibrilación ventricular; DNS: Disfunción nodo sinusal; DCC: Defectos en la conducción cardíaca intraventricular.

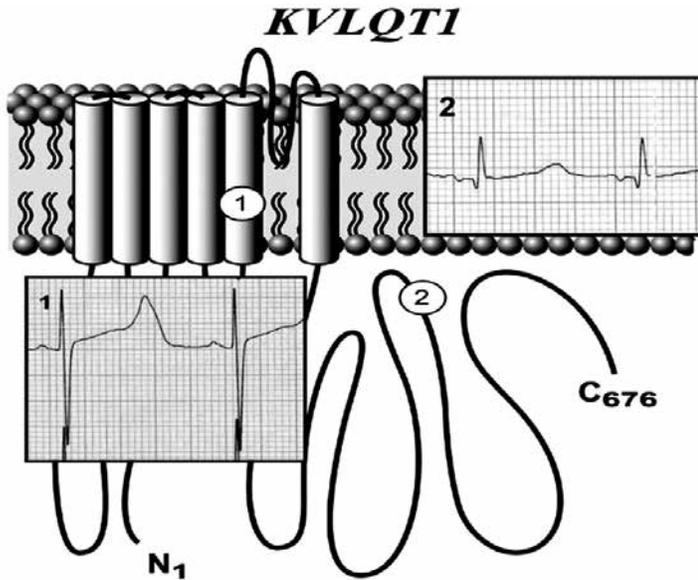


Figura 2.1

Topología lineal del canal IKS de potasio codificado por KCNQ1, se muestran los sitios correspondientes a las mutaciones encontradas así como los respectivos electrocardiogramas representativos.

repolarización ventricular y en el funcionamiento del oído interno. G272D se localiza en el segmento 5 del canal IKS (**Figura 2.1**), esta mutación ha sido reportada previamente en forma heterocigota¹³ en pacientes con SQT, pero no ha sido reportada en forma homocigota condicionando el SJLN. La mutación R518X, trunca prematuramente la región carboxilo Terminal del canal IKS, ha sido reportada previamente, tanto en SQT aislado como en la forma de SJLN¹⁴.

Mutaciones en el gen SCN5A

En población Caucásica, las mutaciones en el gen *SCN5A* que codifica la isoforma Na_v1.5 del canal de sodio, son responsables de cerca del 10% de los casos con SQT, 20% de los casos con Síndrome de Brugada y 2-5% de los casos que presentan muerte

súbita infantil; también genera otros fenotipos: disfunción de nodo sinusal, fibrilación ventricular idiopática, defectos en la conducción cardiaca, fibrilación atrial y miocardiopatía dilatada¹⁵. Las mutaciones que dan lugar a SQT generan un incremento en la conductancia al ión sodio, mientras que los demás fenotipos resultan de la pérdida de función del canal de sodio. Ninguna de las mutaciones encontradas en canal de sodio en esta cohorte mexicana (**Figura 2.2**) fue encontrada en controles (3000 alelos de referencia).

La mutación **SCN5A-R34Fs/60** se encontró en una paciente que presentaba también la mutante **R1195H**. R34Fs/60 determina un truncamiento prematuro de la proteína en el residuo 34, cuando normalmente el canal de sodio esta constituido de 2016 o

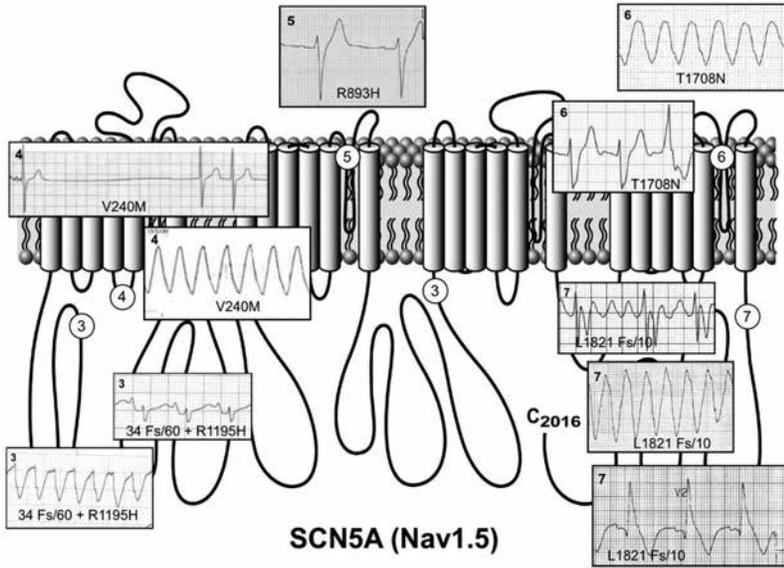


Figura 2.2

Topología lineal del canal $Na_{v1.5}$ de sodio codificado por SCN5A, se muestran los sitios correspondientes a las mutaciones encontradas así como los respectivos electrocardiogramas representativos.

2015 aminoácidos. El último residuo que se codifica en forma apropiada es una Arginina (R) en la posición 34; la delección de una Glicina genera un cambio en el marco de lectura; se adicionan 60 aminoácidos que no existen en la proteína original y finalmente, al encontrar un codón de paro, la proteína se trunca, en la región amino-terminal. A pesar de la importante disrupción del canal por parte de un alelo, el progenitor portador de esta variante, tiene un fenotipo normal. Esto sugiere que el alelo normal es capaz de compensar en forma apropiada la ausencia de la proteína. El caso índice, desgraciadamente heredó un segundo alelo enfermo por parte del otro progenitor, R1195H, la asociación de R34Fs/60 con R1195H, resultó en un fenotipo mixto muy severo, caracterizado

por aleteo auricular, taquicardia ventricular y SQT/L manifestado en los primeros meses de vida. La mutante R1195H no condicionó un fenotipo severo en el progenitor con el otro alelo sano.

R1195H se localiza en el asa intracelular entre los dominios DIII-DIV. 60% de las variantes encontradas en sujetos sanos, se encuentran en esta región⁶, por lo que en principio esta variante pudiera no dar un fenotipo molecular severo. Este caso en particular es motivo de amplia discusión en el Capítulo IV.

V240M fue encontrada en un paciente con fenotipo mixto, enfermedad del nodo sinusal, taquicardia ventricular y SQT/L. Se localiza en el dominio I, en el asa citoplasmática que conecta los segmentos 4 y 5. Si

bien V240M no ha sido reportada previamente, existe una mutación muy cercana a este residuo, Q245K, que ha sido asociada previamente al SQT¹⁶.

R893H se localiza en la región del poro del canal del dominio 2, el fenotipo de este caso fue muy severo, el paciente, varón, tenía un QTc limitrofe, presentó 2 episodios sincopales a la edad de 18 años y finalmente muerte súbita a la edad de 22 años.

T1708N también se localiza en la región del poro, pero del dominio 4. Esta mutación se encontró en un caso de 11 años de edad con antecedente de muerte súbita en dos familiares, madre y hermano. El fenotipo en este caso consistió en trastornos en la conducción ventricular, prolongación del intervalo QT, taquicardia ventricular.

Las mutaciones en el poro de Na_v1.5 han sido asociadas con fenotipo de pérdida de la función¹⁷⁻²¹. Cerca de 30 mutaciones en el poro han sido descritas (<http://www.fsm.it/cardmoc/>) 25 de ellas muestran un fenotipo clínico y biofísico de pérdida o disminución en la función del canal⁶.

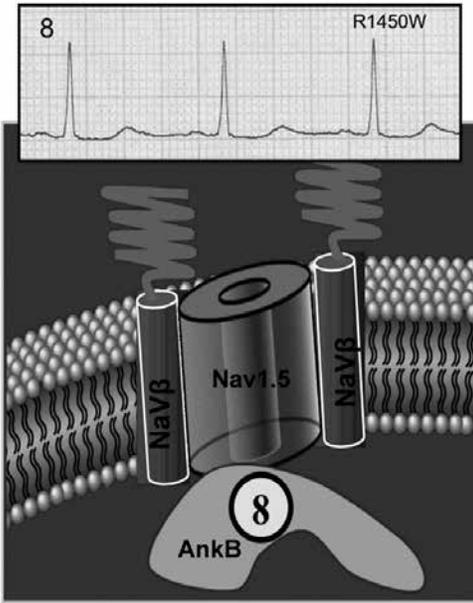
L1821Fs/10 genera un canal de sodio que carece de los últimos 195 aminoácidos de la región carboxilo terminal. Esta región va del aminoácido 1773 al 2016. En la mutante L1821Fs/10, los primeros 48 residuos de la región carboxilo terminal son codificados normalmente. La delección de 4 bases genera cambio en el marco de lectura, se adicionan 10 aminoácidos que no son parte de la proteína original y finalmente la proteína se trunca. La región carboxilo-terminal del canal de sodio participa en la inactivación del canal, se sabe que el complejo molecular de inactivación se forma al asociarse el motivo IFM del asa entre los segmentos III-IV y la región carboxilo terminal²²⁻²³. Se ha demostrado por medio de

mutagénesis dirigida, que el truncamiento de la proteína en la posición 1885 desacopla la región CT del asa II-IV, reduce la densidad de corriente y favorece corriente tardía. El paciente con la delección L1821Fs/10, presentó un fenotipo mixto, prolongación del intervalo QT, taquicardia ventricular, disfunción del nodo sinusal y trastornos en la conducción intraventricular; constituye el primer caso en la literatura con delección en esta región y es motivo de amplia discusión en el capítulo V de esta tesis.

Es de notar que 4 de 5 pacientes con mutaciones en canal de sodio en esta cohorte, presentaron taquicardia ventricular monomórfica. Este es un hallazgo infrecuente en las canalopatías arritmogénicas, se han descrito casos aislados en el contexto de pérdida de la función del canal de sodio, en particular el síndrome de Brugada, pero no se había descrito antes en el contexto de fenotipos mixtos. Esta arritmia es sensible a la estimulación ventricular, lo que sugiere un mecanismo de re-entrada²⁴. Interesante es que se ha reportado en modelos animales, que la disrupción heterocigota de *SCN5A* en ratones, genera una disminución en la conductancia al sodio y los animales presentan arritmias ventriculares por re-entrada²⁵.

Mutaciones en el gen *AnkB*

R1450W se localiza en el “Dominio Muerto” de la proteína Anquirina B. Esta variante fue encontrada también en un control de origen Caucásico. Desconocemos el fenotipo electrocardiográfico del control. Esta variante fue caracterizada recientemente, se encontró una discreta pérdida de la función comparada con la ANKB silvestre²⁸. Basados en estos estudios, es probable que la variante R1450W no produzca muchos síntomas por sí misma, pero el caso en



ANKB (Ankirina B)

cuestión tiene otra variante en canal de sodio, codificado por *SCN5A*, H558R de hecho es homocigoto al alelo menor (Arginina); este polimorfismo se encuentra en el 30% de los sujetos normales⁶ y produce una marcada reducción de la corriente de sodio en presencia del producto resultante de un procesamiento alternativo del canal que contiene una Glicina en la posición (Q₁₀₇₇, 35% de los transcritos)²⁹. Los estudios in vitro no han evaluado el efecto del polimorfismo H558R en presencia de mutaciones en Anquirina B, pero sospechamos que ambas variantes contribuyen al fenotipo del caso. Por otro lado, otras variantes en ANKB documentadas en pacientes y con anomalías in vitro, también se han encontrado en controles²⁷; estas variantes muestran diversos grados de pérdida de la función en ANKB y pueden conferir un riesgo subclínico al desarrollo de muerte súbita. Un ejemplo es la

Figura 2.3

Esquema que ilustra la subunidad alfa o principal del canal de sodio, las subunidades auxiliares o beta, la proteína Anquirina B donde se encontró la variante R1450W y el trazo electrocardiográfico representativo del caso.

variante L1622I en ANKB, encontrada en una familia con SQT_L atípico²⁶, se ha documentado que es una variante común en población Africo-Americana²⁷ y muestra una discreta disminución en la función en estudios in vitro²⁸.

R1450W-ANKB (**Figura 2.3**) se encontró en una mujer de 36 años de edad con un QT_c límite que tuvo un evento de fibrilación ventricular, se le implantó un desfibrilador después de haber sido reanimada de un evento de Muerte Súbita. Posteriormente cursó con tormenta arritmica, disparada por una extrasístole ventricular. Los pacientes con mutaciones en ANKB frecuentemente muestran un fenotipo de SQT_L atípico, el intervalo QT no suele prolongarse significativamente y pueden documentarse otras arritmias como bradicardia, fibrilación ventricular y taquicardia ventricular polimórfica^{26,27}.

En contraste al 10% en prevalencia de mutaciones encontradas en *SCN5A* en población Caucásico/Europea, las alteraciones en el complejo macromolecular de canal de sodio, fue el substrato patogénico predominante en esta cohorte Mexicano-Mestiza con SQTl severo y/o fenotipo mixto. La identificación de variantes en

canales iónicos en los diferentes grupos étnicos será de utilidad para determinar la susceptibilidad genética al desarrollo de arritmias malignas y muerte súbita en los diferentes grupos étnicos.

Referencias

- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*. 2003;421:634-639.
- Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the *hminK* gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet*. 1997;17:338-340.
- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999;97:175-187.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, et al. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*. 2006;114:2104-2112.
- Medeiros A, Kaku T, Tester DJ, et al. Sodium channel β_4 subunit mutation causes congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2006;3:534.
- Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, et al. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2004;1:600-607.
- Ackerman MJ, Tester DJ, Jones GS, Will ML, Burrow CR, Curran ME. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2003;78:1479-1487.
- Poelzing S, Forleo C, Samodell M, et al. *SCN5A* polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation*. 2006;114:368-376.
- Monnig G, Eckardt L, Wedekind H, et al. Electrocardiographic risk stratification in families with congenital long QT syndrome. *Eur Heart J*. 2006.
- Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W, et al. Clinical Course and Risk Stratification of Patients Affected with the Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006.
- Hobbs JB, Peterson DR, Moss AJ, et al. Risk of aborted cardiac arrest or sudden cardiac death during adolescence in the long-QT syndrome. *Jama*. 2006;296:1249-1254.
- Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, et al. The Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. Natural History, Molecular Basis, and Clinical Outcome. *Circulation*. 2006.
- Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *Jama*. 2005;294:2975-2980.
- Wei J, Fish FA, Myerburg RJ, Roden DM, George AL, Jr. Novel *KCNQ1* mutations associated with recessive and dominant congenital long QT syndromes: evidence for variable hearing phenotype associated with R518X. *Hum Mutat*. 2000;15:387-388.
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, et al. *SCN5A* mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*. 2004;110:2163-2167.
- Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005;2:507-517.

17. Pfahnl AE, Viswanathan PC, Weiss R, et al. A sodium channel pore mutation causing Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2007;4:46-53.
18. Rossenbacker T, Carroll SJ, Liu H, et al. Novel pore mutation in SCN5A manifests as a spectrum of phenotypes ranging from atrial flutter, conduction disease, and Brugada syndrome to sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 2004;1:610-615.
19. Itoh H, Shimizu M, Takata S, Mabuchi H, Imoto K. A novel missense mutation in the SCN5A gene associated with Brugada syndrome bidirectionally affecting blocking actions of antiarrhythmic drugs. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2005;16:486-493.
20. Valdivia CR, Tester DJ, Rok BA, et al. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res*. 2004;62:53-62.
21. Kyndt F, Probst V, Potet F, et al. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081-3086.
22. Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem*. 2002;277:9233-9241.
23. Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol*. 2004;123:155-165.
24. Bertomeu-Gonzalez V, Ruiz-Granell R, Garcia-Civera R, Morell-Cabedo S, Ferrero A. Syncopal monomorphic ventricular tachycardia with pleomorphism, sensitive to antitachycardia pacing in a patient with Brugada syndrome. *Europace*. 2006;8:1048-1050.
25. Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, et al. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:6210-6215.
26. Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, et al. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9137-9142.
27. Sherman J, Tester DJ, Ackerman MJ. Targeted mutational analysis of ankyrin-B in 541 consecutive, unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing and 200 healthy subjects. *Heart Rhythm*. 2005;2:1218-1223.
28. Mohler PJ, Le Scouarnec S, Denjoy I, et al. Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes. *Circulation*. 2007;115:432-441.
29. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, et al. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res*. 2003;93:821-828.
30. Zareba W. Genotype-specific ECG patterns in long QT syndrome. *J Electrocardiol*. 2006; 39: S101-106.
31. Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, et al. Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. 32. Wang DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL, Jr., Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block.

CAPÍTULO III

La subunidad β_4 del canal de sodio (SCN4B) en el Síndrome de QT Largo

Publicado en:

Circulation 2007;116:134-142.

SCN4B-Encoded Sodium Channel β_4 Subunit in Congenital Long QT Syndrome.

Resumen

El Síndrome de QT Largo (SQTL) es potencialmente letal secundario a arritmias ventriculares malignas. Es causado por mutaciones en canales iónicos encargados de generar y mantener el potencial de acción de la célula miocárdica. Cerca del 25% de los casos con este padecimiento, no tienen mutaciones en los 9 genes descritos hasta la fecha. Los genes que codifican proteínas regulatorias de los canales iónicos son genes candidatos a ser estudiados en esta enfermedad.

Presentamos un caso del sexo femenino de 21 meses de edad con bloqueo AV 2:1 intermitente y un QTc de 712mseg. El análisis de los 9 genes asociados a SQTL descritos hasta la fecha, fue negativo. Se realizó análisis mutacional de los exones y sitios de unión intron-exon de las 4 subunidades $\text{Na}_v\beta$. Se encontró una mutación L179F (C535T) en el gen *SCN4B* que co-segrega con la enfermedad en un árbol familiar de 3 generaciones; dicha variante no se encontró en 800 alelos de referencia. Por medio de mutagénesis dirigida se construyó la mutante L179F y se expresó en

células embrionarias de riñón humano (HEK293) expresando en forma estable la subunidad alfa de canal de sodio, isoforma cardíaca ($\text{hNa}_v1.5$) codificado por *SCN5A*. La mutante L179F- β_4 mostró un incremento en la corriente tardía de sodio 8 veces mayor cuando comparada con *SCN5A* y 3 veces mayor cuando comparada con *SCN5A* + β_4 -variante silvestre. Este incremento en la corriente tardía es consistente con el fenotipo electrofisiológico molecular reportado previamente en mutaciones primarias de canal de sodio que condicionan SQTL3.

Identificamos una nueva mutación (L179F) en el gen *SCN4B* que codifica para la subunidad $\text{Na}_v\beta_4$; cosegrega con la enfermedad, afecta la función del canal de sodio in Vitro, por lo que constituye un nuevo gen causal del SQTL.

Introducción

El Síndrome de QT Largo (SQTL) representa el prototipo de las canalopatías cardíacas; afecta 1/3000 personas y se caracteriza por prolongación del intervalo QT, repolarización ventricular anormal y riesgo a presen-

tar muerte súbita condicionada por taquicardia ventricular helicoidal o *torsade de pointes*. Desde el descubrimiento de mutaciones en canales iónicos en pacientes con SQT_L en 1995^{1,2}, cientos de mutaciones se han descrito en los 9 genes que hasta la fecha se sabe que generan la enfermedad, sin embargo, un 25% de los casos permanece con genotipo negativo^{3,4}.

Los genes que codifican proteínas auxiliares del canal afectan profundamente el desempeño del mismo y son candidatos atractivos para el estudio de otras causas genéticas del SQT_L. Un grupo de proteínas auxiliares de gran interés pertenece a la familia de las subunidades β del canal de sodio ($\text{Na}_v\beta$), estas subunidades juegan un papel crucial en la adhesión celular, transducción de señales, expresión del canal en la membrana celular y modulación de la

apertura dependiente de voltaje⁶⁻⁹. Se han descrito a la fecha cuatro diferentes subunidades $\text{Na}_v\beta$, codificadas por los genes *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* y *SCN4B*¹⁰⁻¹⁴. Todas son detectables en el tejido cardíaco¹⁵ pero ninguna ha sido ligada a enfermedad arritmica.

Reporte de Caso

Presentamos un caso que a pesar de tener un fenotipo severo, resultó negativo a mutaciones en los genes asociados a SQT_L.

Se trata de una niña de 21 meses de edad a la primera evaluación, referida por bradicardia asintomática. El electrocardiograma de 12 derivaciones mostró una profunda prolongación del intervalo QT, con un QT_c (Intervalo QT corregido con fórmula de Bazett de 712 mseg y bloqueo aurículoventricular (AV) 2:1 intermitente (**Figura 3.1**).

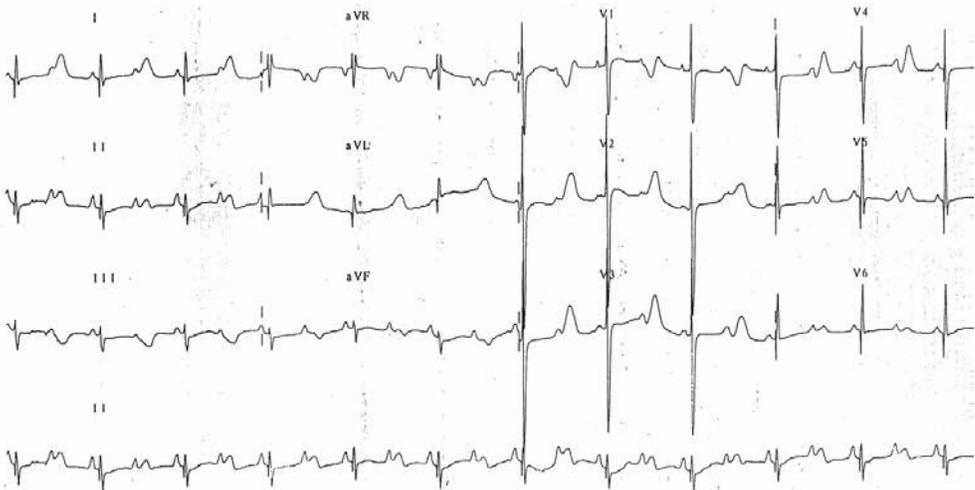


Figura 3.1

Electrocardiograma de 12 derivaciones del caso índice donde se observa un QT_c = 712 mseg y bloqueo aurículo-ventricular 2:1.



Figura 3.2

Holter de 24 horas del caso índice, se observa alternancia eléctrica de la onda T durante la conducción AV 1:1.

Durante la conducción 1:1 se observó alternancia eléctrica de la onda T, este evento se considera marcador de inestabilidad eléctrica ventricular con alto riesgo de arritmias ventriculares malignas (**Figura 3.2**).

La historia médica reveló bradicardia fetal desde las 24 semanas de gestación y un pequeño defecto septal ventricular que cerró espontáneamente a la edad de 6 meses. Desde el diagnóstico, se implantó un marcapaso bicameral y a pesar del severo fenotipo electrocardiográfico, la paciente se ha permanecido asintomática durante los primeros 5 años de su vida. La historia familiar reveló antecedente de muerte súbita prematura en 2 tíos abuelos por línea paterna; una tía falleció a la edad de 35 años durante el puerperio de un parto general y otro falleció a los 8 años durante ejercicio –bicicleta– (**Figura 3.3**).

El electrocardiograma (ECG) del caso muestra un fenotipo descrito previamente en los casos con mutaciones en el gen *SCN5A* que codifica la isoforma cardiaca de canal de sodio o $Na_v1.5$ y que condiciona el SQT1 tipo 3 (**Figura 3.1**); este fenotipo se caracteriza por un segmento ST largo, inicio tardío de la onda T y en ocasiones puede observarse bloqueo AV 2:1 AV¹⁶⁻¹⁸.

Métodos

Casos

El estudio se realizó de acuerdo a los términos requeridos por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México DF. Previa obtención de consentimiento informado de todos los participantes, se extrajo DNA de linfocitos periféricos utilizando las

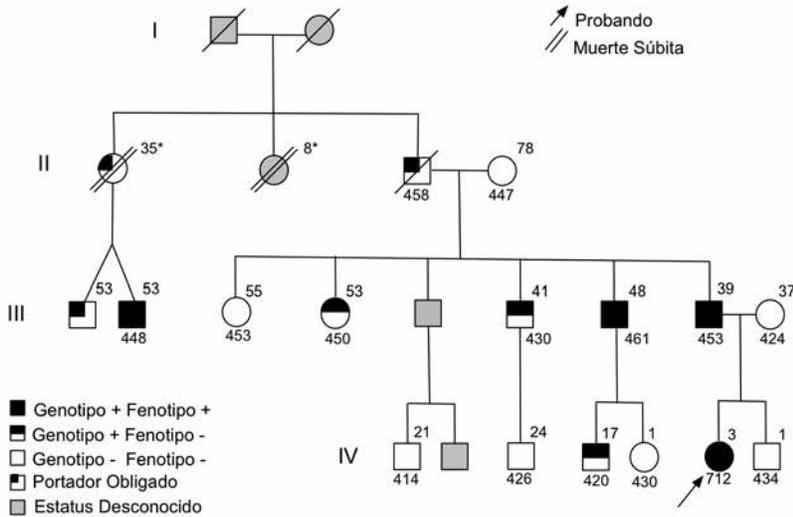


Figura 3.3

Arbol Familiar; se definió como “afectado” los casos con QT corregido por fórmula de Bazett (QTc) > 440 mseg en hombres y > 460 mseg en mujeres. Los valores de QTc de cada individuo se muestran debajo del símbolo. La edad al momento de estudio se ilustra arriba. * Edad al momento de la muerte.

técnicas estandarizadas. Se obtuvo además DNA control de 200 Mexicanos-Mestizos del acervo de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ciudad de México. Se obtuvieron 200 controles adicionales, 100 caucásicos y 100 áfrico-americanos de los repositorios celulares Coriell.

Se estudiaron además 262 casos con sospecha diagnóstica de SQT, negativos para mutaciones en los genes conocidos hasta la fecha (180 mujeres, 96% caucásicos, edad al diagnóstico 25 ± 16 años, y QTc promedio de 470 ± 60 mseg) referidos al laboratorio de Genómica de Muerte Súbita “Windland Smith Rice” de la Clínica Mayo, Rochester Minnesota para estudio Genético.

Análisis Mutacional

Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC), se realizó análisis mutacional del caso para todos los genes conocidos hasta la fecha que condicionan SQT (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *ANKB*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *CACNA1C*, y *CAV3*) usando los seadores publicados con anterioridad. Posteriormente se realizó análisis mutacional de las cuatro subunidades auxiliares β del canal de sodio, codificadas por *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* y *SCN4B*. Los seadores utilizados para la amplificación por PCR de las subunidades β , fueron diseñados utilizando el programa Oligo™; las condiciones de PCR y DHPLC se muestran en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1

Sebadores, condiciones de PCR y DHPLC para el análisis mutacional de las subunidades $\text{Na}_v\beta$.

Exon	Sebador (5'-3')	Sebador (5'-3')	(pb)	MgCl (mM)	Método RCP	Gradiente 1 (%B; Temp°C)	Gradiente 2 (%B; Temp°C)
SCN1B-1	CGC CTC TCG CCC CGC TAT TA	CTC CCG CCG CCC CGG CAG TG	164	1mM*	2	50.5-51.5%, 67	48-58%; 72
SCN1B-2	CCT GAC CTG AGC CTG CTG TC	TGC CCT CCC ATG CCG TTC C	227	1mM*	2	56.6-66.6%, 65	
SCN1B-3	CCT TCC CCT CCC TGG CTA C	GGC AGG CAG CAC CCG ACT CA	287	1mM*	2	56.3-66.3%, 63	52.6-62.6%, 65
SCN1B-4	CAG CCT GGG CTA CCC CCT TA	CCC TGG GTG CCC TCC CAC CT	220	1mM*	2	53.7-63.7%, 62.5	
SCN1B-5	CGG TCT GAT GAT GGG GTG AC	TTA CCG CTG GCT CTT CCT TG	243	1mM*	2	54.8-64.8%, 63	
SCN2B-1	CCA TTC CTC CCT TGT AGT TCT	CCC CAT CCT CTT CAC ATT GC	216	2mM	1	53.6-63.6%, 61.5	
SCN2B-2	CCA ACA CTC CCA GGC ACA G	GAC CAG GGG CTT CAT GCC A	316	2mM	1	57.2-67.2%, 62	57.2-67.2%, 63.5
SCN2B-3	GGC ATC CTC ACT GTC CTT G	AGG TGG GTG GGA AAG GTC A	329	2mM	1	57.5-67.5%, 63	57.5-67.5%, 64
SCN2B-4	CAC GGG TAG TGG GGT GAT G	CGA GCA GGC AGG GTC ACT G	346	2mM	1	57.9-67.9%, 63.5	
SCN3B-2	GCA GTC CTT GAC CGA GGG A	AGA GGC AAG CCA GCC AGA G	223	2mM	1	53.9-63.9%, 59.5	53.9-63.9%, 61.5
SCN3B-3	CCT CCC TCC TTC TTC TCC AA	CAG GAG CCA GGC TGG GAA C	316	2mM	1	57.2-67.2%, 63.5	
SCN3B-4	CTG CCC TGT CCC TAA CTG G	TTC CCT GTC CAC AGA GAG C	358	2mM	1	57.2-67.2%, 63.5	
SCN3B-5	TCC AAT GAC GGC TCT AGG T	GAG CAA GCA TTC TGA AGG TG	258	2mM	1	55.3-65.3%, 59.5	
SCN3B-6	CTC CTG TGC CCT GCT CTT	ACA ACC TGC CAT CCA CAT TC	219	2mM	1	53.7-63.7%, 61.5	
SCN4B-1	GCT GTG CCC AGT ATC CCA T	CCA CCA TCC TCA TTC CGT G	241	2mM*	1	47.2-57.2%, 64	54.7-64.7%, 67
SCN4B-2	CCC GAG GTT GGC ACT GAG G	GGA CCA GAG CGT AGG AGG C	373	2mM*	1	58.5-68.5%, 62	
SCN4B-3	TCT CGG CTA CTT TCT CAC CC	CCT CCC AAG TCC TTC CCA C	320	2mM	2	57.3-67.3%, 61	
SCN4B-4	GCT CCA GGT TGA CTC TTG CT	GCT GCT GGG AGG ACA GGA G	326	2mM	2	57.4-67.4%, 61.5	
SCN4B-5	TCC CCC TAC TCT TGC TCC T	GGA CTC TGG TTT CTT GTG CC	294	2mM	2	56.5-66.5%, 63	

*DMSO 8%

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen de 20 μL utilizando 50ng de ADN, 16pmol de cada sebador, 200 μM de cada dNTP, 50mMol/L KCl, 10mMol/L Tris-HCl (pH 8.3) y 1.0 U de Amplitaq Gold (ABI, Fosterr City, CA). La amplificación por PCR se realizó utilizando el ciclador térmico DNA Engine Tetrad (MJ Research, Waltham, MA). PCR Método 1: 94°C 5 min, seguido de 5 ciclos a 94°C por 20 seg, 64°C por 20 seg y 72°C por 30 seg; seguidos de 35 ciclos de 94°C por 20 seg, 62°C por 20 seg, 72°C por 30 seg, y extensión final a 72°C por 10 min. PCR Método 2: 94°C por 15 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 30 seg y extensión final a 72°C por 10min. El DHPLC se realizó utilizando solución amortiguadora B al 5% /minuto gradiente. El inicio y término de la solución amortiguadora B seguida de la temperatura a la cual se efectuó el gradiente, se indica en la tabla 3.1.

Análisis Funcional

Se realizó clonación y mutagénesis dirigida siguiendo las técnicas reportadas previa-

mente que describimos a continuación:¹⁹ Para la clonación del canal de sodio (hH1b) se utilizaron los sebadores 5'GATGAGAA-GATGGCAAACCTTCC 3' y 5'GCTCTG-GATCCCCGGGGGTGCC 3' para ~3kb de 5'Na_v1.5 y 5'CACCCCCGGGGATCCAGAGC 3' y 5'TTCAGTGTCTCCTGGCCAG 3' fueron usados para clonar ~3kb de 3' mRNA de corazón humano (Clontech, Palo Alto, CA), RETRscript (Ambios, Austin, TX), y pfu ADN polimerasa se utilizó para realizar transcripción reversa mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El protocolo para la transcripción reversa se efectuó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para el PCR se programó el termociclador de la siguiente manera: un primer ciclo para desnaturalización de 94°C por un minuto, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94°C por un minuto 50°C por un minuto y 72°C por 8 minutos, al finalizar se programó un ciclo de extensión a 72°C por 20 minutos. Los productos del PCR fueron clonados en el vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y secuenciados con polimerasas termoestables, y dideoxi- terminadores con marca-

door fluorescente. Se utilizó un secuenciador automático (modelo ABI 377XL y 377-96). La secuencia fue publicada con anterioridad en GenBank (No. Acceso AF482988). La clona completa se analizó en dos piezas y se secuenció en tres ocasiones para verificar su integridad. Para la clonación de la subunidad β_4 silvestre de cDNA obtenido por RT-PCR, de corazón humano; se utilizaron los cebadores 5'-AGAGAACAGGACTATGCCCG-3' y 5'-TTTCATCATCAGAAAGGGGG-3'. La subunidad β_4 silvestre fue subclonada en pcDNA3 y secuenciada para checar la integridad de la clona. La mutante L179F- β_4 se construyó por mutagenesis dirigida utilizando los siguientes cebadores 5'-ATCGGGCTCCTCATCTTCATCCTGCTGATCAAG-3' y 5'-CTTGATCAGCAGGATGAAGATGAGGAGCCCGAT-3'. La subunidad β_4 silvestre y la mutante L179F- β_4 fueron subclonadas en el vector de expresión mamífero pIRGFP1, (amablemente orogado por el Dr. David Johns, Johns Hopkins University) que contiene IRES y GFP. Las construcciones β_4 -silvestre y la mutante L179F- β_4 fueron heterológicamente expresadas en células embrionarias de riñón humano HEK 293 conteniendo en forma estable la subunidad α de canal de sodio, isoforma cardiaca (hNa_v1.5, hH1c, codificada por el gen *SCN5A* GeneBank #AY148488). Las corrientes de sodio macroscópicas fueron registradas por medio de las técnicas estandarizadas utilizando la metodología de Patch Clamp en la configuración de célula completa, utilizando un amplificador Axopatch y pClamp8.0 software (Axon Instruments, Foster City, CA). La solución extracelular contuvo los siguientes elementos (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 0.75 MgCl₂ y 5 HEPES (pH 7.4 ajustado con NaOH). La solución intracelular (contenida en la pipeta) estuvo compuesta de: (concentraciones en mM) 120 CsF, 15 CsCl, 2 EGTA, 5

HEPES y 5 NaCl (pH 7.4 con CsOH.) El análisis de la activación, inactivación y recuperación de inactivación se realizó por medio de técnicas reportadas previamente y se describen en cada gráfica.^{19,20} La activación e inactivación fueron ajustadas por medio de la función de Boltzmann utilizando Clampfit 8 (Axon Instrument). La corriente pico y corriente tardía de I_{Na} se obtuvieron después de la substracción pasiva de la fuga. El tiempo de recuperación y el decaimiento de la corriente fueron ajustadas utilizando una función bi-exponencial. Los resultados se muestran como promedios del error estándar de la media, para el análisis estadístico se utilizó la prueba t-student.

Análisis Bioquímico

Se realizó co-inmunoprecipitación de la subunidad α de canal de sodio codificada por *SCN5A* y la subunidad β_4 , utilizando un marcador HA para *SCN5A* y Myc para la subunidad β_4 , coexpresadas en células embrionarias de riñón humano (HEK293). La preparación se inmunoprecipitó con 1 μ g de anticuerpo monoclonal anti-HA (laboratorios Zymed, San Francisco, CA) y separadas posteriormente por electroforesis por 12% SDS-PAGE. Posteriormente se realizó inmunoblot con 0.5 μ g/ml de anticuerpo policlonal anti-Myc (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), los complejos inmunes se desarrollaron utilizando el kit ECL-plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Resultados

El estudio genético de los 9 genes que condicionan SQTLD descritos hasta la fecha, fue negativo. El análisis mutacional de las subunidades β mostró la sustitución de una Citosina por una Timina en la posición 535 en el gen *SCN4B*, dando lugar a un cambio de aminoácido en la posición 179:

L179F (leucina, L, por fenilalanina, F) (Figura 3.4). Este cambio no se encontró en 800 alelos de referencia. El análisis mutacional de *SCN4B* en 262 casos con sospecha de SQT y genotipo negativo, no mostró otras variaciones.

L179 se localiza en la región transmembranal (Figura 3.5), y es un aminoácido relativamente conservado a través de diferentes especies (Figura 3.6).

L179F co-segrega con la enfermedad, con penetrancia incompleta en un árbol familiar de tres generaciones. Los valores de QTc y las edades se muestran en la Figura 3.3. Otros familiares afectados muestran una prolongación discreta del intervalo QTc, el caso índice es el único que presenta un fenotipo severo. No se contó con ECG de los casos que fallecieron en forma súbita.

Al ser transfectados en forma transitoria

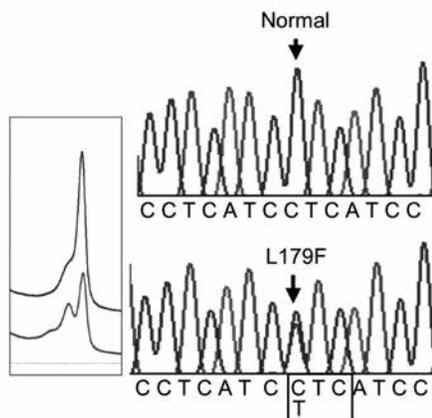


Figura 3.4

Perfil obtenido mediante DHPLC y secuencia. El perfil anormal se muestra abajo, el normal arriba. Se observan los cromatogramas obtenidos al secuenciar el caso índice, condicionando el cambio de una Leucina (L) a Fenilalanina (F) en la posición 179.

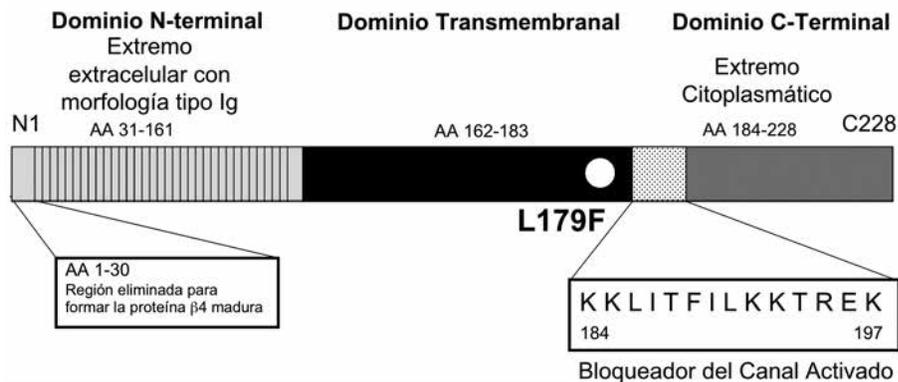


Figura 3.5. Localización de la mutante L179F en la subunidad β_4

Topología lineal de la subunidad β_4 . La numeración de aminoácidos es relativa al producto completo del gen.

L179F	
Homo sapiens	GLLILILLIKK
Xenopus tropicalis	GLLILILIMKK
Gallus gallus	GLLILFMLVKK
Macaca mulatta	GLLILILLIKK
Rattus norvegicus	GLLVCILLKK
Mus musculus	GLLVCILLKK

Figura 3.6

Conservación de L179F en algunas especies

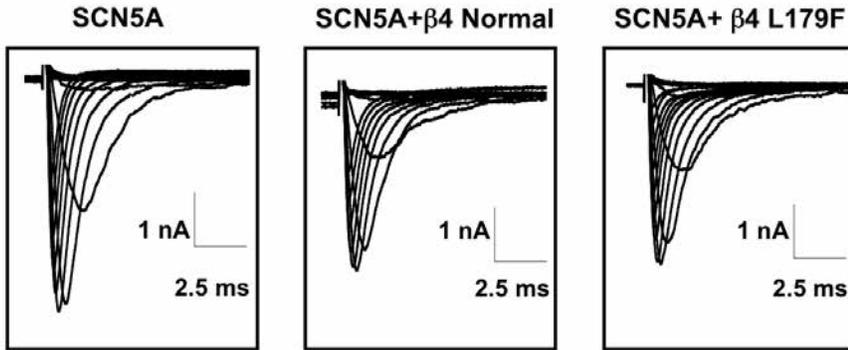


Figura 3.7 Caracterización funcional de la mutante L179F en células HEK293, expresando en forma estable la subunidad α del canal de sodio $\text{Na}_v1.5$ codificado por SCN5A.

Trazos representativos de la corriente de sodio registrada por medio de parche perforado con la técnica de patch-clamp, con variaciones en el potencial como se muestra en la figura comenzando a -140 mV. La amplitud de corriente y el tiempo se muestra en cada panel para el canal de sodio, canal de sodio + subunidad β_4 silvestre y canal de sodio + β_4 mutante. No se observaron diferencias significativas en la amplitud de corriente/ tiempo (ver también Tabla 3.2).

SCN4B silvestre y la mutante L179F-SCN4B en células HEK293 con expresión estable del transcrito más común de SCN5A en humanos (H558/Q1077del)²⁰, se obtuvieron corrientes pico robustas sin diferencias significativas en la amplitud de corriente/tiempo (Figura 3.7 y Tabla 3.2).

Las mediciones para activación e inactivación dependientes de voltaje del canal de sodio fueron analizadas utilizando proto-

colos estándar y ajustados con la función de Boltzmann. La inactivación dependiente de voltaje pero no la activación, fueron modificadas por la mutante L179F (Figura 3.8 y 3.9C). Esta pequeña, pero significativa variación en dirección positiva de la inactivación (WT- β_4 , -82.52 ± 0.74 n=9 L179F- β_4 , -79.10 ± 0.59 n=9, $p < 0.05$) incrementa la corriente de ventana y puede contribuir en la génesis de arritmias. Quizá

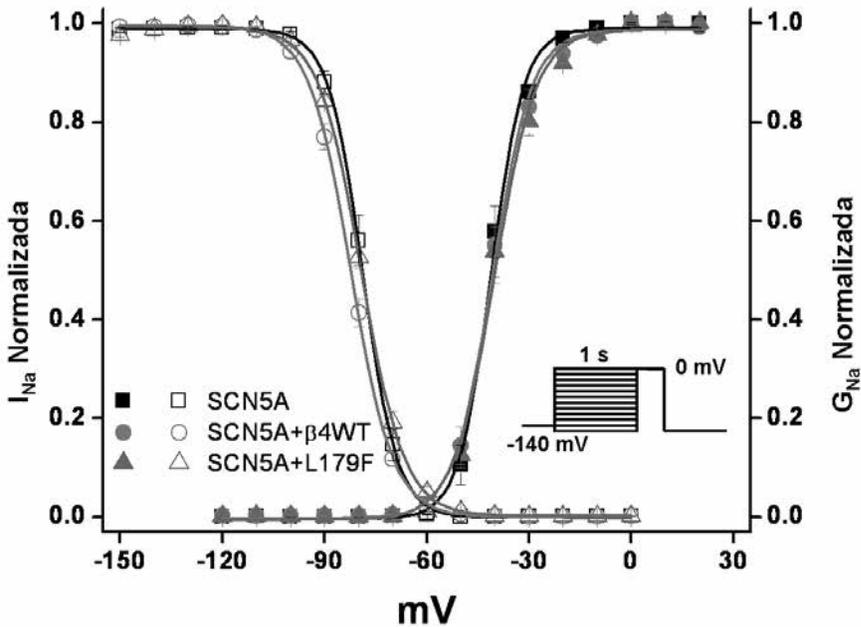


Figura 3.8 Caracterización funcional de la mutante L179F en células HEK293, expresando en forma estable la subunidad α del canal de sodio $\text{Na}_v1.5$ codificado por *SCN5A*.

Activación dependiente de voltaje (derecha) e inactivación (izquierda) del canal de sodio $\text{Na}_v1.5$ en presencia de la subunidad β_4 silvestre y mutante L179F. Los resultados promediados fueron ajustados con la función de Boltzmann (ver también Tabla 3.2). El protocolo de estimulación se muestra a un lado de la gráfica.

mas importante es que este cambio en la inactivación indica una clara interacción de la subunidad α del canal de sodio con la subunidad β_4 en los sistemas heterólogos de expresión.

La mutante L179F- β_4 mostró una corriente tardía a -60mV, 8 veces mayor que el canal de sodio solo, suficiente para prolongar la repolarización terminal y el intervalo QT, efecto similar se ha reportado previamente en mutaciones en *SCN5A* que condicionan el SQT3. De hecho, el incremento en la corriente tardía excede a la reportada en la clásica mutación en *SCN5A*, ΔKPQ , en

la región del poro de la subunidad α de canal de sodio, codificada por *SCN5A* (Figura 3.10).²¹

En la Tabla 3.2 se muestran los datos de la densidad de corriente y demás parámetros de apertura. Se observaron cambios significativos en la cinética de recuperación, particularmente un incremento significativo en la Tau lenta de recuperación.

Los experimentos de Co-inmunoprecipitación (Figura 3.11) mostraron que la subunidad β_4 silvestre y la mutante L179F- β_4 inmunoprecipitan con *SCN5A*.

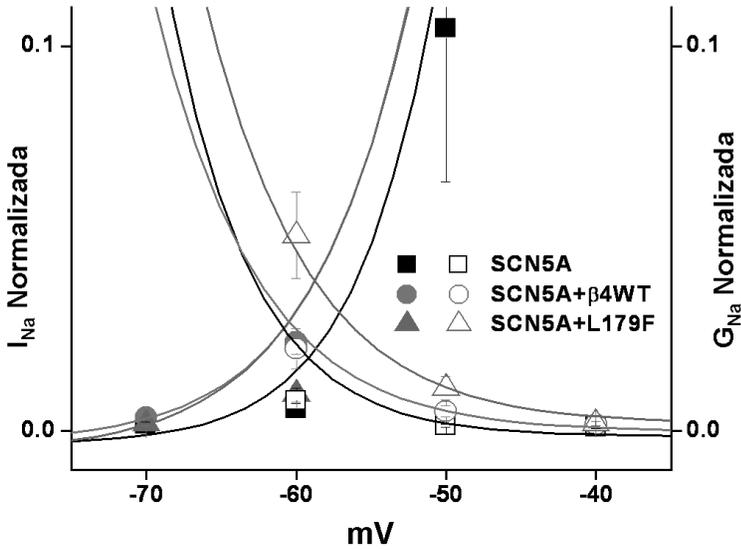


Figura 3.9 Caracterización funcional de la mutante L179F en células HEK293, expresando en forma estable la subunidad α del canal de sodio $Na_{v1.5}$ codificado por SCN5A.

Detalle de la corriente de ventana al sobreponer las curvas de activación e inactivación. La mutante L179F incrementa la corriente de ventana.

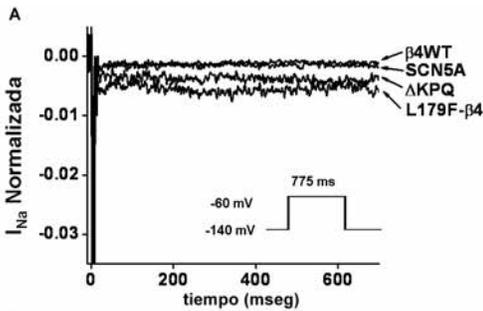
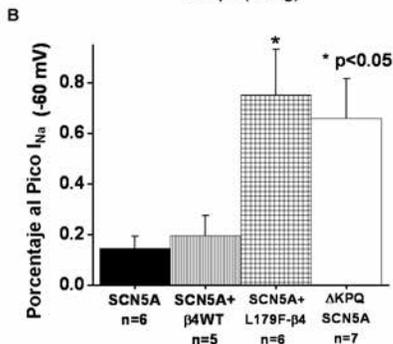


Figura 3.10. Corriente Tardía obtenida con la mutante L179F- β_4

(A). Trazos representativos de la corriente tardía de sodio en respuesta al cambio de voltaje. Se inicia con un voltaje basal de -140mV a -60mV de 700-mseg de duración (el protocolo se muestra en la figura). La corriente tardía se normalizó al pico de corriente, enfatizando el componente tardío, de manera que la corriente pico se encuentra fuera de la escala.

WT= variante silvestre



(B). Gráfica que muestra el incremento de la corriente tardía durante la repolarización, obtenida con la mutante L179F- β_4 , la magnitud de la corriente tardía supera incluso a la observada con la mutante primaria en canal de sodio, caracterizada previamente y que condiciona SQT13 (ΔKPQ)²¹.

WT= variante silvestre

Tabla 3.2 Resumen de la densidad de corriente y parámetros de apertura.

	SCN5A	SCN5A + β_4 -Silvestre	SCN5A + β_4 -L179F
Densidad I_{Na}			
pA/pF	-425.70 ± 25.58 (n=5)	-378.43 ± 61.81 (n=7)	-341.56 ± 35.30 (n=8)
Activación			
$V_{1/2}$ (mV)	-43.78 ± 1.28 (n=5)	-43.69 ± 1.61 (n=7)	-43.37 ± 1.13 (n=8)
Slope factor	3.12 ± 0.10 (n=5)	3.63 ± 0.16* (n=7)	3.85 ± 0.23* (n=8)
Inactivación			
$V_{1/2}$ (mV)	-78.77 ± 1.11 (n=10)	-82.28 ± 0.74* (n=9)	-79.10 ± 0.59† (n=9)
Slope factor	4.72 ± 0.09 (n=10)	6.03 ± 0.23* (n=9)	6.03 ± 0.35* (n=9)
Recuperación de la Inactivación			
τ rápida (ms)	1.52 ± 0.14 (n=12)	1.48 ± 0.10 (n=18)	1.80 ± 0.18 (n=22)
Amp rápida (%)	0.83 ± 0.02 (n=12)	0.82 ± 0.02 (n=18)	0.75 ± 0.02*† (n=22)
τ lenta (ms)	37.28 ± 3.93 (n=12)	24.50 ± 4.01* (n=18)	47.95 ± 7.51† (n=22)
Amp lenta (%)	0.18 ± 0.01 (n=12)	0.19 ± 0.01 (n=18)	0.20 ± 0.01 (n=22)
Decay (-20 mV)			
τ rápida (ms)	0.68 ± 0.02 (n=5)	0.77 ± 0.04 (n=6)	0.80 ± 0.04 (n=8)
τ lenta (ms)	2.85 ± 0.26 (n=5)	3.16 ± 0.31 (n=6)	3.66 ± 0.27 (n=8)

Promedio ± Error estándar

* $p < 0.05$ vs SCN5A, † $p < 0.05$, vs β_4 -silvestre

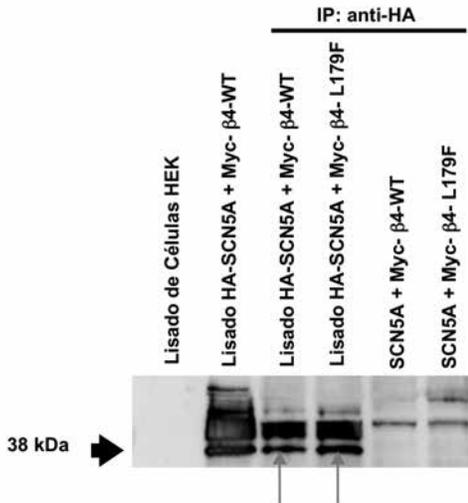


Figura 3.11 Co-Imunoprecipitación de SCN5A y la subunidad β_4 .

Se muestran los lisados obtenidos de las células HEK293 no transfectadas (columna 1) y células transfectadas con HA-SCN5A y Myc- β_4 (columna 2). Las Columnas 3-6 muestran inmunoprecipitación de complejos proteicos derivados de la co-transfección de HA-SCN5A y Myc- β_4 - silvestre; HA-SCN5A y Myc- β_4 -L179F; HA-SCN5A y β_4 -silvestre no marcada respectivamente. La banda que muestra 38 kDa reconoce la subunidad β_4 , las bandas por arriba son uniones inespecíficas. La columna 1 muestra no reconocimiento control, la columna 2 muestra reconocimiento del marcado con Myc. La columna 3 y 4, muestra que la subunidad β_4 -fue reconocida por el precipitado de SCN5A tanto Silvestre como por la mutante L179F (flecha roja). En las columnas 5 y 6 no se observa precipitado, la subunidad β_4 no fue reconocida por el complejo no marcado SCN5A y Myc- β_4 .

Discusión y Conclusiones

En el presente trabajo mostramos que *SCN4B* es un nuevo gen asociado al SQT, basado en la identificación de una nueva mutación (L179F) que 1) co-segrega apropiadamente con la enfermedad, 2) ausente en 800 alelos de referencia, y 3) produce un “incremento en la función” de $Na_v1.5$, en un caso en donde no se encontraron mutaciones en los genes descritos hasta la fecha.

L179F co-segrega apropiadamente con penetrancia incompleta, hecho que es típico para las arritmias transmitidas genéticamente. Hasta un 40% de los portadores de una mutación que condiciona SQT, tienen un QTc en límites normales^{4, 22}. La

penetrancia, expresividad y fenotipo, son influenciadas por genes con propiedades moduladoras¹⁹. Sin embargo, en el caso en estudio, no identificamos ningún polimorfismo modulador descrito que explique la severa prolongación del intervalo QT del caso y el bloqueo AV 2:1.

El bloqueo AV 2:1 en el contexto del SQT, tiene una incidencia del 4-5% en series pediátricas²³, es usualmente un evento aislado, se asocia a una alta mortalidad, >50% sin importar el tratamiento^{24, 25}. Los síntomas suelen aparecer a temprana edad, la bradicardia fetal paroxística y el “hydrops fetalis” son hallazgos comunes. El fenómeno ocurre en el contexto de un largo periodo refractario efectivo dependiente de frecuencia²⁶. El complejo QRS

es usualmente angosto, a pesar de esto, el bloqueo se ha reportado de localización infrahisiana; ²⁶⁻²⁸ sin embargo, el bloqueo suprahisiano no se encuentra completamente descartado y de hecho el sitio del bloqueo pudiera depender del genotipo. Hasta ahora, 3 genes han sido asociados al bloqueo AV 2:1: *SCN5A*, *KCNH2* y *CACNA17*.²⁷⁻³⁸ Nuestros resultados sugieren que la subunidad β_4 codificada por *SCN4B*, constituye otro gen que puede condicionar bloqueo AV 2:1 en pacientes con SQT.

De acuerdo a la historia familiar del caso, las dos muertes súbitas que ocurrieron en la familia, fueron en el contexto de ejercicio y en el postparto. Estos gatillos han sido asociados previamente a mutaciones en los genes *KCNQ1* y *KCNH2* respectivamente, pero no se encontraron mutaciones en estos genes en el caso en estudio. A pesar de que el síncope al ejercicio sugiere un fenotipo de SQT1 y los eventos cardiacos postparto son mas comunes en el SQT2, 44% de los pacientes referidos para estudio genético por síncope al ejercicio y 25% con historia familiar de un evento arrítmico fatal en el postparto, no tendrán mutaciones en los genes que condicionan SQT1-6³⁹; es importante enfatizar que la correlación genotipo-fenotipo para los subtipos raros de SQT, principalmente los que involucran proteínas auxiliares, no ha sido aún determinado.

Los canales iónicos existen en complejos macromoleculares, asociados con diversas proteínas auxiliares con propiedades regulatorias del canal; estas proteínas se encuentran o forman parte de la membrana celular, matriz extracelular, intracelular, citoesqueleto o sistema de transducción de señales⁵. En principio, cualquier perturbación en algún componente de este complejo, afectará la función del

canal. Los canales de sodio dependientes de voltaje tienen un subunidad formadora del poro o α y una o mas subunidades auxiliares β ⁴⁰. En la actualidad se han descrito en el humano nueve subunidades funcionales α ($\text{Na}_v1.1-1.9$)⁴¹ y cuatro subunidades β . Numerosas mutaciones en las $\text{Na}_v\alpha$ han sido asociadas a enfermedades hereditarias, las mutaciones en el gen *SCN5A* que codifica la isoforma cardiaca del canal de sodio o $\text{Na}_v1.5$ dan lugar al SQT3 y Síndrome de Brugada tipo 1, sin embargo, de las 4 subunidades β , solo la β_1 ha sido asociada a enfermedad en el humano, mutaciones en esta subunidad se han descrito en casos con crisis convulsivas febriles⁴².

Las subunidades $\text{Na}_v\beta$ son proteínas con topología tipo I, caracterizadas por una región amino terminal extracelular, un segmento transmembranal y un dominio citoplasmático carboxilo-terminal. Muestran una morfología extracelular tipo Ig, que con frecuencia se encuentra en moléculas de adhesión⁴³ que posicionan el canal iónico en la membrana celular y median interacciones con otras moléculas. $\text{Na}_v\beta_1$ y β_3 son similares en secuencia y se asocian en forma no-covalente con las subunidades α . $\text{Na}_v\beta_2$ y β_4 son proteínas similares ligadas por puente disulfuro a las subunidades α ^{13,14}. Estudios inmunocitoquímicos realizados en corazón de ratón muestran que el canal de sodio del miocito ventricular de estos animales es compuesto por subunidades $\text{Na}_v1.5 + \beta_2$ y/o β_4 en los discos intercalares, mientras que otras isoformas de canal de sodio $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.6$, se encuentran en los túbulos transversos junto con subunidades β_1 y/o β_3 ¹⁵. No existen modelos Knock-out para las subunidades $\text{Na}_v\beta_2$ y β_4 , pero los ratones que carecen de la proteína $\text{Na}_v\beta_1$ presentan crisis convulsivas y ataxia⁴⁴, mientras

que los ratones que carecen de $\text{Na}_v\beta_2$ tienen una susceptibilidad incrementada a presentar crisis convulsivas⁴⁵.

La subunidad β_4 se distingue por tener un extremo citoplasmático que va del aminoácido 184 al 197, considerando el producto completo del gen, o del aminoácido 154 a 167 considerando la proteína madura (KKLITFILKKTREK **Figura 3.5**); conteniendo Lisinas y residuos hidrofóbicos; dicho segmento ha sido postulado como bloqueador del estado abierto del canal¹³ y en forma recientemente, implicado en las transientes resurgentes en la conducción de sodio que contribuyen al periodo refractario corto observado en el canal de sodio codificado por *SCN8A* encontrado en las células de Purkinje⁴⁶. La eliminación enzimática de este bloqueador endógeno, genera un retardo en la recuperación del canal. Esta corriente resurgente inducida por el extremo citoplasmático de la subunidad β_4 ha sido reproducida también in vitro en la isoforma cardiaca, codificada por *SCN5A*, se ha sugerido incluso un sitio putativo de unión en el sitio de unión de S6, en la cavidad del canal⁴⁷. Este mecanismo es análogo al observado en pacientes portadores de SQT3, con mutaciones en el gen *SCN5A*; y sugiere que la mutación en β_4 , L179F, representa una pérdida primaria en la función del producto de *SCN4B* que en forma secundaria precipita un incremento en la función de $\text{Na}_v1.5$. De hecho, la magnitud de la corriente tardía inducida por la mutante L179F en β_4 , es mayor que la observada en mutaciones primarias en el gen *SCN5A* que codifica la subunidad principal alfa. A diferencia de las mutaciones observadas en *SCN5A*, el mecanismo involucrado en el incremento en la función del canal de sodio en estos experimentos, se confina a la corriente de ventana probablemente enlenteciendo la

repolarización terminal, en vez de la clásica acentuación de la corriente tardía a potenciales de membrana más despolarizantes que prolongan la fase 2 del potencial de acción. Es importante resaltar que los experimentos fueron realizados en un sistema heterólogo de expresión, que si bien es una técnica considerada estándar para caracterizar mutaciones en el estudio del SQT, carece del ambiente nativo de las células cardiacas, no incluyen las otras subunidades β_1 , β_2 , o β_3 , ni otros componentes del complejo macromolecular del canal de sodio, como caveolina, sintrofina, etc. Los efectos observados pudieran ser más evidentes y severos en un ambiente nativo completo. Sin embargo no necesariamente existe una concordancia entre el grado de disfunción del canal in vitro con la severidad de los síntomas clínicos. En este caso en particular, el fenotipo molecular concuerda con el fenotipo clínico (afcción de canal de sodio), y existe cosegregación de la enfermedad, hechos que sustentan a la mutación L179F en la subunidad β_4 como influyente o causante del fenotipo de SQT.

En el presente trabajo mostramos que las mutaciones en el gen *SCN4B* pueden contribuir al substrato patológico de algunos casos con SQT, alterando la corriente de sodio del canal de sodio ($\text{Na}_v1.5$). Este estudio muestra la primera mutación humana en la subunidad $\text{Na}_v\beta_4$ asociada a enfermedad. De esta forma, las mutaciones en *SCN4B*, se unen a la reciente descripción de mutaciones en *CAV3* (SQT19)⁴⁸ como causas raras de el SQT que afectan los genes que codifican las proteínas regulatorias de canales iónico; en este caso en particular, del canal de sodio, dando un fenotipo molecular y clínico similar al observado en el SQT3.

Referencias

- 1 Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 795-803.
- 2 Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 805-11.
- 3 Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of Cardiac Channel Mutations in 541 Consecutive Unrelated Patients Referred for Long QT Syndrome Genetic Testing. *Heart Rhythm* 2005; 2: 507-517
- 4 Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, Bottelli G, Cerrone M, Leonardi S. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice.[see comment]. *JAMA* 2005; 294: 2975-80
- 5 Meadows LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 448-58
- 6 Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom LL. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 11383-8
- 7 Meadows L, Malhotra JD, Stetzer A, Isom LL, Ragsdale DS. The intracellular segment of the sodium channel beta 1 subunit is required for its efficient association with the channel alpha subunit. *Journal of Neurochemistry* 2001; 76: 1871-8
- 8 Patton DE, Isom LL, Catterall WA, Goldin AL. The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 17649-55
- 9 Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 2001; 7: 42-54
- 10 McClatchey AI, Cannon SC, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. The cloning and expression of a sodium channel beta 1-subunit cDNA from human brain. *Human Molecular Genetics* 1993; 2: 745-9
- 11 Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL, Catterall WA. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 1992; 256: 839-42
- 12 Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 1995; 83: 433-42
- 13 Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferreira H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* 2003; 23: 7577-85
- 14 Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP. beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 2308-13
- 15 Maier SK, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* 2004; 109: 1421-7
- 16 Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Fox J, Giuli LC, Shen J, Splawski I, Priori SG, Compton SJ, Yanowitz F, Benhorin J, Moss AJ, Schwartz PJ, Robinson JL, Wang Q, Zareba W, Keating MT, Towbin JA, Napolitano C, Medina A. Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation* 2000; 102: 2849-55
- 17 Wang DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL, Jr, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation* 2002; 105: 341-6
- 18 Lupoglazoff JM, Denjoy I, Cheav T, Berthet M, Extramiana F, Cauchemez B, Villain E, Leenhardt A, Guicheney P. [Homozygous mutation of the SCN5A gene responsible for congenital long QT syndrome with 2/1 atrioventricular block]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2002; 95: 440-6

- 19 Ye B, Valdivia CR, Ackerman MJ, Makielski JC. A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiological Genomics* 2003; 12: 187-193
- 20 Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, Pagel MD, Pu J, Tester DJ, Ackerman MJ. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res* 2003; 93: 821-8
- 21 Nagatomo T, Fan Z, Ye B, Tonkovich GS, January CT, Kyle JW, Makielski JC. Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPO Na+ channels. *Am J Physiol* 1998; 275: H2016-24
- 22 Schwartz PJ. Clinical applicability of molecular biology: the case of the long QT syndrome. *Curr Control Trials Cardiovasc med* 2000; 1: 88-91
- 23 Garson A, Jr., Dick M, 2nd, Fournier A, Gillette PC, Hamilton R, Kugler JD, van Hare GF, 3rd, Vetter V, Vick GW, 3rd. The long QT syndrome in children. An international study of 287 patients. *Circulation* 1993; 87: 1866-72
- 24 Trippel DL, Parsons MK, Gillette PC. Infants with long-QT syndrome and 2:1 atrioventricular block. *Am Heart J* 1995; 130: 1130-4
- 25 Gorgels AP, Al Fadley F, Zaman L, Kantoch MJ, Al Halees Z. The long QT syndrome with impaired atrioventricular conduction: a malignant variant in infants. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998; 9: 1225-32
- 26 Van Hare GF, Franz MR, Roge C, Scheinman MM. Persistent functional atrioventricular block in two patients with prolonged QT intervals: elucidation of the mechanism of block. *Pacing Clin Electrophysiol* 1990; 13: 608-18
- 27 Lupoglazoff JM, Denjoy I, Villain E, Fressart V, Simon F, Bozio A, Berthet M, Benammar N, Hainque B, Guicheney P. Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 826-30
- 28 Lupoglazoff JM, Cheav T, Baroudi G, Berthet M, Denjoy I, Cauchemez B, Extramiana F, Chahine M, Guicheney P. Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to-one atrioventricular block. *Circ Res* 2001; 89: E16-21
- 29 Hoorntje T, Alders M, van Tintelen P, van der Lip K, Sreeram N, van der Wal A, Mannens M, Wilde A. Homozygous premature truncation of the HERG protein : the human HERG knockout. *Circulation* 1999; 100: 1264-7
- 30 Piippo K, Laitinen P, Swan H, Toivonen L, Viitasalo M, Pasternack M, Paavonen K, Chapman H, Wann KT, Hirvela E, Sajantila A, Kontula K. Homozygosity for a HERG potassium channel mutation causes a severe form of long QT syndrome: identification of an apparent founder mutation in the Finns. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1919-25
- 31 Wehrens XH, Rossenbacker T, Jongbloed RJ, Gewillig M, Heidebuchel H, Doevendans PA, Vos MA, Wellens HJ, Kass RS. A novel mutation L619F in the cardiac Na+ channel SCN5A associated with long-QT syndrome (LQT3): a role for the I-II linker in inactivation gating. *Hum Mutat* 2003; 21: 552
- 32 Valdivia CR, Ackerman MJ, Tester DJ, Wada T, McCormack J, Ye B, Makielski JC. A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 279-89
- 33 Schulze-Bahr E, Fenge H, Etrrodt D, Haverkamp W, Monnig G, Wedekind H, Breithardt G, Kehl HG. Long QT syndrome and life threatening arrhythmia in a newborn: molecular diagnosis and treatment response. *Heart* 2004; 90: 13-6
- 34 Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 805-11
- 35 Viswanathan PC, Benson DW, Balsler JR. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest* 2003; 111: 341-6
- 36 Chang CC, Acharfi S, Wu MH, Chiang FT, Wang JK, Sung TC, Chahine M. A novel SCN5A mutation manifests as a malignant form of long QT syndrome with perinatal onset of tachycardia/bradycardia. *Cardiovasc Res* 2004; 64: 268-78
- 37 Johnson WH, Jr., Yang P, Yang T, Lau YR, Mostella BA, Wolff DJ, Roden DM, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of a homozygous HERG mutation causing severe neonatal long QT syndrome. *Pediatr Res* 2003; 53: 744-8

- 38 Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Ca(V)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004; 119: 19-31
- 39 Ackerman MJ. Genotype-phenotype relationships in congenital long QT syndrome. *J Electrocardiol* 2005; 38: 64-8
- 40 Dhar Malhotra J, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei LN, Brosius FC, Kass RS, Isom LL. Characterization of sodium channel alpha- and beta-subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* 2001; 103: 1303-10
- 41 Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 28: 365-8

CAPÍTULO IV

Fenotipo Clínico y Caracterización Funcional de la deleción en la región N-terminal (R34fs/6o) en el canal de sodio Na_v1.5

Publicado en:

Heart Rhythm 2007;(5): S145-S145 Suplemento, Presentado en Heart Rhythm 2007

Clinical phenotype and functional characterization of N-terminal frame-shift/deletion (R34fs/6o) mutation in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel Na_v1.5.

Resumen

La caracterización funcional de las mutaciones en el gen *SCN5A* que codifica la isoforma cardiaca del canal de sodio, han sido de utilidad para entender la relación estructura-función del canal. Presentamos las implicaciones clínicas y biofísicas de deleción en la región N-terminal R34fs/6o.

Un lactante de 7 meses de edad con historia de flutter neonatal, acudió al servicio de urgencias con fiebre y taquicardia ventricular. A pesar de restablecer el ritmo normal, el lactante mostró profundo daño cerebral y falleció. Se observó en el electrocardiograma prolongación del intervalo QT. Por medio de PCR, DHPLC y secuenciación directa, se realizó análisis mutacional de los principales genes asociados al síndrome de QT largo. Se detectaron dos mutaciones en el gen *SCN5A*: R34fs/6o heredado por línea materna y R1195H heredado por línea paterna. Las mutaciones fueron creadas por mutagénesis dirigida y expresadas en células HEK293. R34fs/6o no mostró corriente, R1195H mos-

tró corriente pico normal pero parámetros de activación e inactivación anormales. La co-expresión de R34fs/6o-*SCN5A* y R1195H-*SCN5A* dió lugar a un incremento en la corriente tardía, comparado con R1195H-*SCN5A* solo.

En conclusión, se documentó un fenotipo severo en un lactante con 2 mutaciones en el canal de sodio cardiaco: R34fs/6o y R1195H. Los estudios de expresión heteróloga mostraron que la deleción (R34fs/6o) no genera corriente, pero en forma inesperada, este péptido de 94 aminoácidos, confiere un incremento en la corriente tardía en los canales conteniendo la mutante R1195H, sugiriendo un importante papel de esta región en la inactivación del canal.

Introducción

El gen *SCN5A* codifica la formación de la subunidad α del canal de sodio humano o Na_v1.5; este canal juega un papel predominante en la electrofisiología cardiaca y génesis de arritmias. Las mutaciones en *SCN5A* que generan incremento de la fun-

ción del canal, dan lugar al Síndrome de QT Largo tipo 3 (SQTL3)¹, mientras que las mutaciones que generan pérdida de función del canal, dan lugar a diversos síndromes: Síndrome de Brugada tipo 1 (SB1)², disfunción del nodo sinusal (DNS), defectos en la conducción cardiaca (DCC)^{3, 4} y miocardiopatía dilatada (MCD)⁵. Las mutaciones que incrementan la función del canal, afectan la inactivación rápida la repolarización se prolonga y esto favorece la presencia de arritmias ventriculares malignas, en particular la conocida como *torsades de pointes* o taquicardia helicoidal, que frecuentemente degenera en fibrilación ventricular y muerte súbita. Las mutaciones que generan pérdida de la función, normalmente condicionan cambios en los parámetros de apertura del canal y reducción en la densidad de corriente. El mecanismo por el cual se observan diversos fenotipos clínicos cuando existe pérdida de la función del canal, no es bien entendido, se ha sugerido que la desviación a la derecha en la curva de activación del canal dependiente de voltaje es un hallazgo común en el fenotipo de DCC⁶. El fenotipo de SB1 es probablemente una de las formas más severas de pérdida de la función del canal, con riesgo importante de muerte súbita por fibrilación ventricular. En cambio el fenotipo de DNS tiene baja probabilidad de muerte súbita.

El análisis funcional de las variantes encontradas en el humano ha provisto de elementos importantes en el entendimiento de la función de los dominios y regiones clave del canal. El conocimiento de la relación estructura-función, es crucial para el desarrollo de nuevos fármacos y tratamiento óptimo de los enfermos. En los últimos años se han publicado diversos estudios que describen la función de la

región COOH-terminal, misma que es crucial para la inactivación del canal⁷, pero poco se sabe del papel funcional del dominio NH₃ terminal.

Métodos

Análisis Mutacional

El estudio fue realizado de acuerdo a los lineamientos establecidos por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México DF. Después de la obtención de consentimiento informado de todos los participantes, se obtuvo muestra sanguínea para extracción de DNA de linfocitos periféricos. Por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (DHPLC) y secuenciación directa, se estudiaron las regiones codificantes y sitios de unión exon-intron de los 5 principales genes asociados a SQTL: *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* y *KCNE2* los seadores y parámetros de la reacción en cadena de la polimerasa, fueron publicados previamente^{10,11}.

Mutagenesis Dirigida y Expresión Funcional

Las mutantes R34fs/60 y R1195H fueron creadas por mutagénesis dirigida (kit para mutagénesis de Stratagene[®]) por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Ambas mutantes fueron construidas en la variante resultante del procesamiento alternativo de canal de sodio cardiaco (*SCN5A/h Na_v1.5*) mas frecuente en el humano, en el vector pcDNA3 (Invitrogen; Carlsbad, CA); dicha variante carece de una glutamina en la posición 1077 (Q1077del)⁸ Para la clonación del canal de sodio (hH1b) se utilizaron los seadores 5'GATGAGAAGATGGCAAACCTCC 3' y 5'GCTCTGGATCCCCGGGGTGCC 3' para ~3kb de 5'Na_v1.5 y 5'CACCCCCGGGGATCCAGAGC 3' y 5'TTCAGTGTGCTCTGGCCAG 3'

fueron usados para clonar ~3kb de 3' mRNA de corazón humano (Clontech, Palo Alto, CA), RETRscript (Ambios, Austin, TX), y pfu ADN polimerasa se utilizó para realizar transcripción reversa mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El protocolo para la transcripción reversa se efectuó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para el PCR se programó el termociclador de la siguiente manera: un primer ciclo para desnaturalización de 94°C por un minuto, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94°C por un minuto 50°C por un minuto y 72°C por 8 minutos, al finalizar se programó un ciclo de extensión a 72°C por 20 minutos. Los productos del PCR fueron clonados en el vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y secuenciados con polimerasas termoestables, y dideoxi-terminadores con marcador fluorescente. Se utilizó un secuenciador automático (modelo ABI 377XL y 377-96). La secuencia fue publicada con anterioridad en GenBank (No. Acceso AF482988). La clona completa se analizó en dos piezas y se secuenció en tres ocasiones para verificar la integridad de las construcciones. Los canales de sodio silvestre (normales) y con la mutante, fueron expresados en forma transitoria en células HEK-293 para estudio funcional^{14,15}.

Caracterización Funcional y Mediciones Electrofisiológicas

Las corrientes de sodio macroscópicas fueron registradas por medio de la técnica de parche perforado por medio de registro zonal (Patch Clamp) a una temperatura entre 22-24°C, utilizando una solución extracelular constituida por (unidades en mmol/L): NaCl 140, KCl 4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.75 y HEPES 5 (pH 7.4, utilizando CsOH). Se utilizaron pipetas con una resistencia entre 1.0 y 2.0 MΩ con solución compuesta de: (concentraciones en mM) 120 CsF, 15

CsCl, 2 EGTA, 5 HEPES y 5 NaCl (pH 7.4 con CsOH.). Los datos fueron adquiridos utilizando pClamp 8.2 (Axon Instruments Inc. Union City, CA) y analizados utilizando Clampfit (Axon instruments Inc.). El análisis de la activación, inactivación y recuperación de inactivación se realizó por medio de técnicas reportadas previamente y se describen en cada gráfica.¹⁶ La activación e inactivación fueron ajustadas por medio de la función de Boltzmann utilizando Clampfit 8 (Axon Instrument). La corriente pico y corriente tardía de I_{Na} se obtuvieron después de la substracción pasiva de la fuga. El tiempo de recuperación y el decaimiento de la corriente fueron ajustadas utilizando una función bi-exponencial.

Análisis Estadístico

Los resultados se muestran como símbolos con error estándar del promedio. La significancia estadística fue determinada utilizando ANOVA para comparación de dos grupos. Una p<0.05 se consideró como estadísticamente significativa. Las curvas ajustadas se realizaron utilizando pClamp 8.2 (Axon Instruments). Las curvas no lineales ajustadas fueron realizadas con Origin 6.0 (Microcal Software).

Resultados

Caso Clínico

Se trata de un paciente varón evaluado por el especialista por primera vez a los 3 meses de edad por cursar con arritmia supraventricular del tipo del flutter auricular. Se le realizó estudio ecocardiográfico el cual mostró un corazón estructuralmente normal, recibió tratamiento médico con lo que se controló la arritmia. A los 7 meses presentó evento de taquicardia ventricular monomórfica durante episodio febril (**Figura 4.1B**), acudió al servicio de urgencias donde recibió tratamiento médico,

llamó la atención durante ritmo sinusal una prolongación del intervalo QT, con un QTc 603 mseg (**Figura 4.1A**). La arritmia ventricular recidivó repetidamente durante el internamiento, condicionó paro cardiorrespiratorio y si bien el paciente fue reanimado y se logró restablecer el ritmo normal, hubo daño cerebral profundo y el paciente falleció a los 7 días de haber sido internado.

Caracterización Molecular

El análisis genético de los 5 principales genes asociados al SQT, mostró dos mutaciones en el gen *SCN5A* que codifica para el canal de sodio isoforma cardiaca o $Na_v1.5$; el primer cambio consistió en la delección de una Guanina (G) en la posición 104 del exón 2 (**Figura 4.2**), heredado por línea materna que genera un cambio en el marco de lectura, R34fs/60, indicando que el último aminoácido codificado apropiadamente es una Arginina (R) en posición 34, seguido de 60 aminoácidos, no relacio-

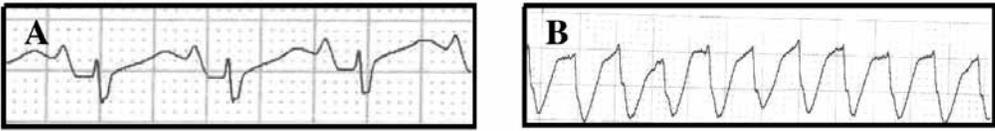


Figura 4.1

- (A). Trazo electrocardiográfico de la derivación DII que muestra prolongación del intervalo QT, con un QTc de 603mseg.
(B). Trazo electrocardiográfico que muestra episodio de taquicardia ventricular monomórfica sostenida.

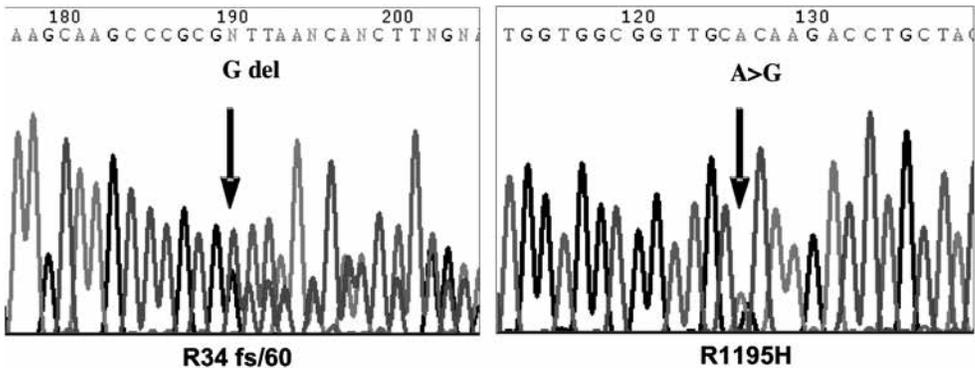


Figura 4.2

- (A). Delección de una Guanina, después del codon 34, dando lugar a cambio en el marco de lectura y truncamiento prematuro de la proteína después de añadirse 60 residuos mas.
(B). Substitución de una Adenina por una Guanina en el codon 1195, resultando en cambio de aminoácido, una Arginina "R" es remplazada por una Histidina "H".

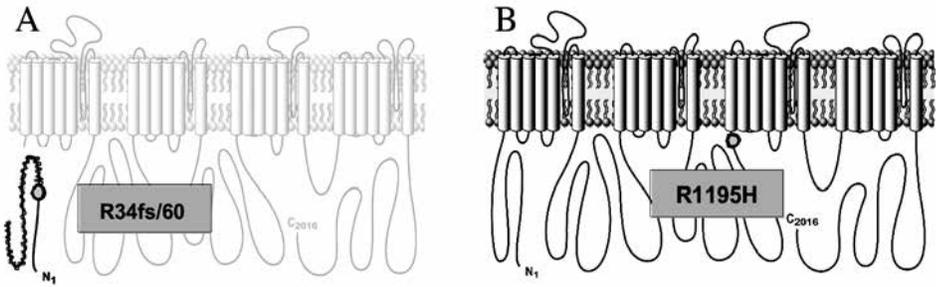


Figura 4.3

- (A). Diagrama topológico del canal de sodio Na_v1.5 que ilustra la severa delección R34fs/60 heredada por línea materna.
 (B). Diagrama topológico que ilustra la mutación R1195H heredada por línea paterna.

nados con la proteína original posterior a los cuales la proteína se trunca en forma prematura. El péptido final tiene 94 aminoácidos, de los cuales tan solo 34 se encuentran en la proteína original y cuya longitud original es de 2015 a 2016 residuos. Este truncamiento se localiza en la región amino-terminal y no permite el esbozo de alguno de los dominios del canal de sodio (**Figura 4.3A**). El segundo cambio, heredado por línea paterna, consiste en la sustitución de una Guanina por una Adenina, en la posición 3584; exon 20 del gen *SCN5A*, sustituyendo una Arginina (R) por una Histidina (H) en el aminoácido 1195 (R1195H), como se ilustra en la figura 4.3B. Ninguno de estos cambios fue encontrado en 3000 alelos de referencia.

Es de llamar la atención que la madre del caso, a pesar de portar el severo truncamiento temprano de la proteína que codifica la isoforma cardíaca del canal de sodio; tiene un electrocardiograma normal y hasta la fecha se encuentra asintomática. El padre, portador de la mutante R1195H, cursa también asintomático aunque desafortunadamente no sabemos que

fenotipo presenta pues no fue posible obtener su electrocardiograma.

Expresión Funcional de R34fs/60

Las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con los canales portadores de la mutante R34Fs/60 no mostraron corriente; mientras que las células conteniendo la mutante R1195H mostraron corriente pico normal (**Figura 4.4**), pero activación e inactivación alteradas (**Figuras 4.4 - 4.8**).

La activación dependiente de voltaje e inactivación se registraron a potenciales más negativos para las mutantes R1195H y R1195H + R34fs/60, comparadas con la variante silvestre y le recuperación de la inactivación de las mutantes R1195H y R1195H + R34fs/60 fue más lenta (**Figuras 4.5-4.8**).

Interesante es que la variante silvestre y la mutante R1195H, no presentaron corriente tardía, pero al expresar ambas mutantes R1195H + R34fs/60 se registró una clara corriente tardía (**Figura 4.9**)

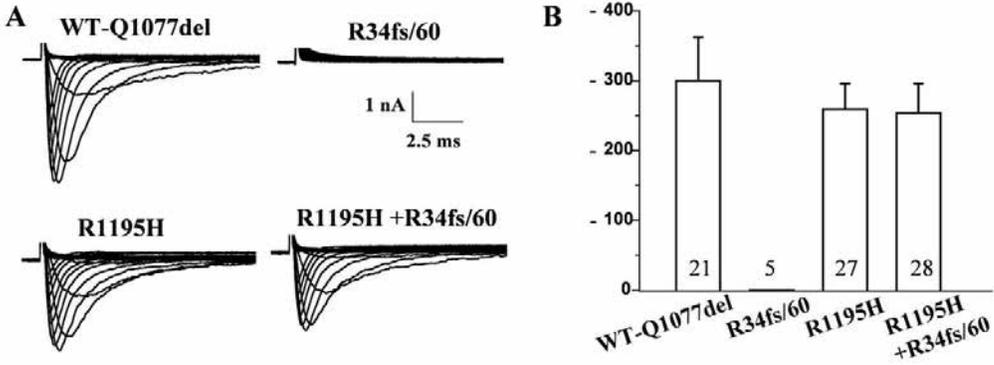


Figura 4.4

Trazos representativos de las corrientes de sodio registradas por medio de control en parche (patch clamp) utilizando la técnica de parche perforado. Los experimentos fueron realizados en la variante de procesamiento alternativo mas común (SCN5A-Q1077del). (A) La amplitud de corriente en el curso del tiempo se muestra para en canal silvestre (WT-Q1077del), la mutante R34fs/60, la mutante R1195H y las mutantes R1195H + R34fs/60 juntas. (B) Representación grafica de la densidad de INa para los canales silvestres silvestre (WT-Q1077del), la mutante R34fs/60, la mutante R1195H y las mutantes R1195H + R34fs/60 juntas.

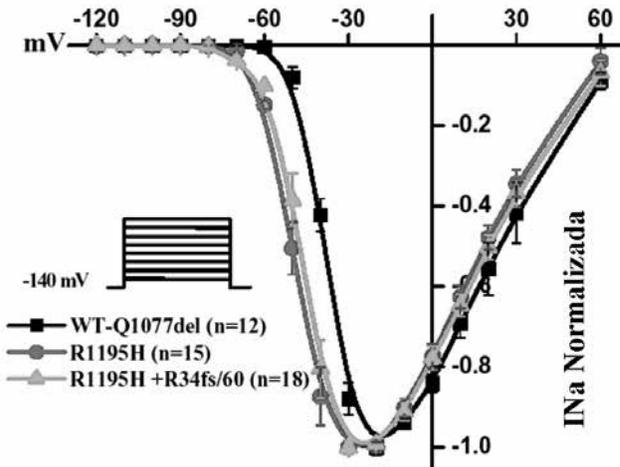


Figura 4.5

Activación dependiente de voltaje para la variante silvestre (WT-Q1077del) y las mutantes R1195H, R1195H + R34fs/60. El pinzamiento de voltaje se realizó en escalones despolarizantes de 24ms, el voltaje se incrementó en unidades de 10mV iniciando a un potencial sostenido de -140mV. Los puntos medios de activación se ajustaron con la función de Boltzmann. Los puntos medios de activación se encuentran desviados a potenciales negativos para las mutantes.

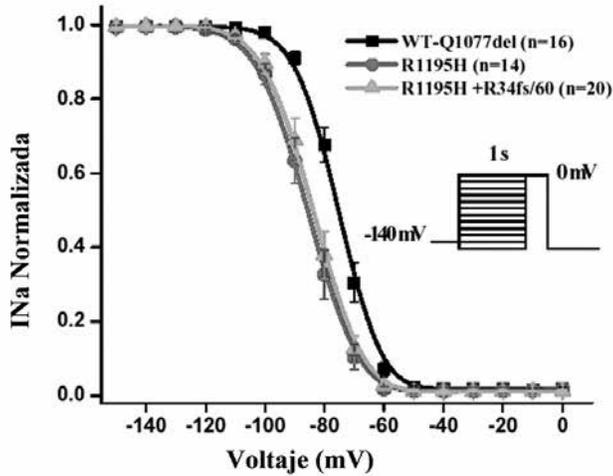


Figura 4.6

Gráfica de inactivación; se observa la variante silvestre (WT-Q1077del) y las mutantes R1195H, R1195H + R34fs/60 utilizando protocolos estándar y ajustado mediante la función de Boltzmann. El punto medio de inactivación para ambas construcciones mutantes se encuentra desviado en forma significativa a potenciales negativos, comparados con la variante silvestre.

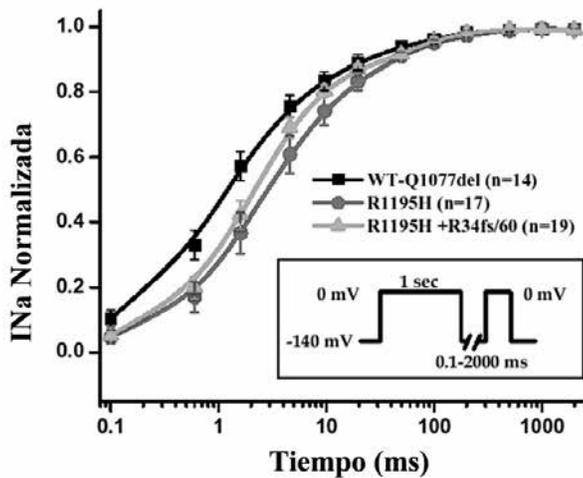


Figura 4.7

Recuperación de la inactivación, se observa la variante silvestre (WT-Q1077del) y las mutantes R1195H, R1195H + R34fs/60 con el tiempo en escala logarítmica para mejor apreciación del curso de la recuperación. Ambas construcciones mutantes exhiben una recuperación más lenta de la inactivación comparado con la variante silvestre.

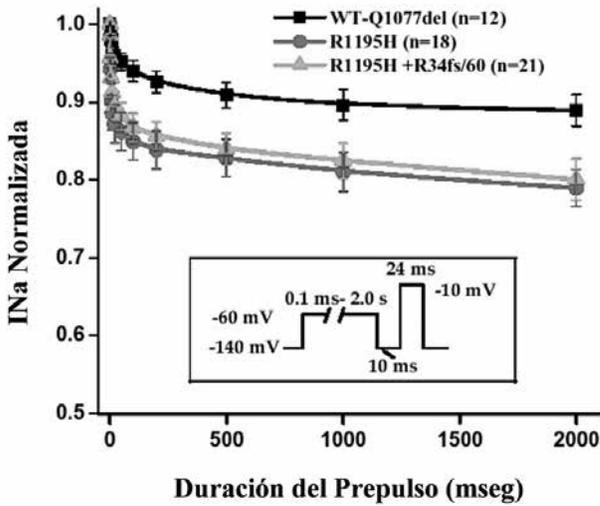


Figura 4.8

Activación Intermedia; se observa la variante silvestre (WT-Q1077del) y las mutantes R1195H, R1195H + R34fs/60, con variación en la duración del pulso prepulso. Se muestran los resultados promediados y las barras representan el error estándar de la media. La inactivación intermedia se observó incrementada para los canales mutantes, comparado con la variante silvestre.

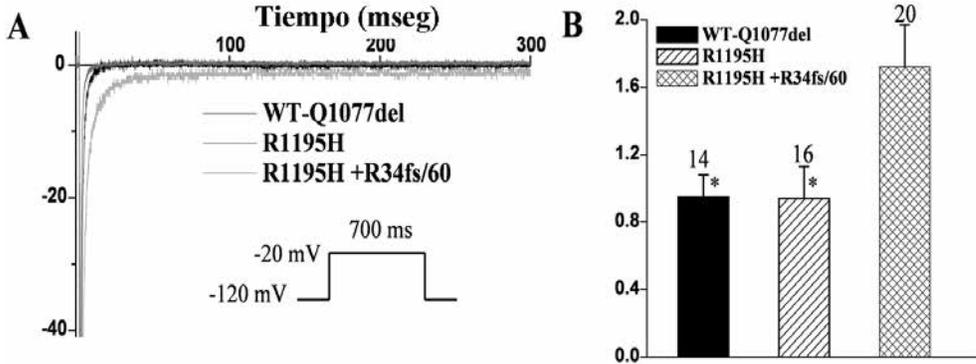


Figura 4.9

Corriente Tardía. (A) Trazos representativos de la corriente tardía de sodio para la variante silvestre y las mutantes R1195H, R1195H + R34fs/60, obtenidos mediante un pulso despolarizante de -120mV a -20mV por 700mseg (se muestran 300 mseg). La corriente tardía se normalizó a la capacitancia celular y se presenta en pA/pF. (B) Representación gráfica de la corriente tardía de sodio normalizada a la corriente pico. Después de la substracción de la corriente residual, la media de corriente tardía INa se midió entre 600 mseg y 700 mseg después del inicio de la despolarización. El número de experimentos se indica arriba de cada barra.

*Diferencia significativa comparada con la variante silvestre.

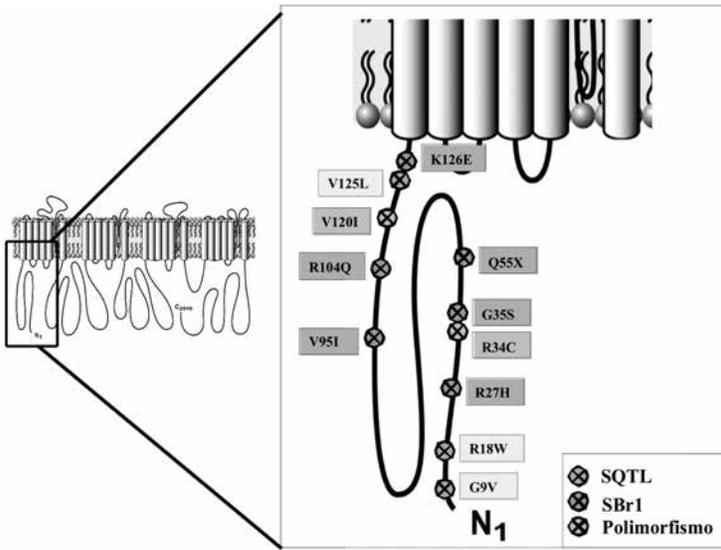


Figura 4.10

Diagrama topológico del canal de sodio Na_v1.5 con énfasis en la región N-terminal. Se ilustran los cambios no-sinónimos en esta región, reportados en la literatura; así como el fenotipo resultante.

Discusión y Conclusiones

Hasta la fecha se han descrito 9 mutaciones en la región N-terminal del canal Na_v1.5, codificado por el gen SCN5A, 3 de estas mutaciones se manifestaron con fenotipo de SQT1 (V125L, R18W, G9V)^{10,11} y 5 condicionaron síndrome de Brugada (R27H¹², G35S¹³, Q55X¹⁴, V95I¹⁵, R104Q¹³, K126E¹⁶) También se han reportado dos polimorfismos en esta región, V120I, encontrado en población japonesa¹⁷ y R34C, frecuente en población de origen hispano⁹ (**Figura 4.10**), interesante es que la delección observada en el caso índice, se localiza justo en el sitio de este último polimorfismo. Desafortunadamente solo 3 de estas variantes: R34C, Q55X y K126E, tienen estudio funcional, por lo que el fenotipo clínico no se ha reproducido in Vitro.

No se sabe con precisión el papel de la región N-terminal del canal de sodio

Na_v1.5, pero se sabe que en otros canales dependientes de voltaje, es crucial en la regulación de la corriente iónica, por ejemplo, en el canal de calcio tipo L, se ha documentado que la delección de esta región (46 a 139 AA) genera un incremento en la corriente iónica 5 a 10 veces mayor que el canal normal¹⁸; en otros canales, como el de potasio codificado por *KCNQ1* (que da lugar al SQT1), mutaciones en la región N-terminal suelen dar fenotipos severos con manifestaciones tempranas de la enfermedad, los estudios funcionales han mostrado que las mutaciones en este sitio generan un defecto en el tráfico del canal, mismo que se retiene en el retículo endoplásmico; ejerciendo además en algunas mutaciones, un efecto dominante negativo, afectando el tráfico de los canales heteromultiméricos normales¹⁹. Así mismo se ha descrito que la región N-terminal del canal K_v4.2, tiene un sitio de unión para las proteínas syntaxina 1

(STX1A) y KChIP2, mismas que regulan la expresión del canal en la superficie celular²⁰.

En este trabajo mostramos que la co-expresión de las mutantes R34fs/60 + R1195H genera corriente tardía, y un fenotipo clínico muy severo con arritmias auriculares y ventriculares desde edades tempranas como se observó en el caso índice. Sin embargo, la mutante R1195H sola, no es capaz de generar corriente tardía y el fenotipo clínico no es severo, pues el padre, portador de esta mutación, cursa asintomático. Esto implica que el péptido generado por la mutante R34fs/60, trafica a la superficie celular junto con el canal que contiene la mutante R1195H y su interacción genera alteración de la inactivación rápida (incremento en la función).

Otra observación importante del presente trabajo es que la deleción heterocigota de la región N-terminal del canal $Na_v1.5$, es compatible con la vida y puede incluso generar un fenotipo normal, pues la madre del caso, portadora de la deleción, cursa asintomática y el ECG es normal. Este mismo efecto se observó con la deleción Q55X, reportada recientemente por Makita y cols¹⁴, la deleción también se localiza en región N-terminal del canal de sodio $Na_v1.5$, dos familiares con la misma mutante cursaron asintomáticos y el ECG se observa normal. Interesante es que la mutante Q55X-SCN5A, a pesar de ser una deleción mas tardía, generó un fenotipo de SB_{Br1} y DCC (pérdida de la función del canal) en el caso índice. Si bien los mecanismos implicados en la penetrancia y expresivi-

dad variable de esta enfermedad aún no son completamente entendidos, se sabe que la interacción con otros polimorfismos o variantes en el canal de sodio es crucial para el fenotipo final, entre los polimorfismos regulatorios importantes se encuentra la variante H558R, con una frecuencia cercana al 30%; esta variante en presencia de mutaciones que condicionan SB_{Br1}, puede corregir los defectos en el trafico del canal⁸. Así mismo la variante de procesamiento alternativo de canal de sodio es también crucial en el fenotipo.

Previamente se ha descrito que la región C-terminal es crucial para la inactivación del canal $Na_v1.5$ ²¹, pero el estudio de la mutante R34fs/60 en este caso, muestra que la región N-terminal del canal $Na_v1.5$, también puede tener propiedades regulatorias de la inactivación, que ameritan estudiarse a profundidad.

En conclusión presentamos las implicaciones de una grave deleción del canal de sodio cardiaco; el lactante en particular presentó un fenotipo severo explicado por 2 mutaciones heterocigotas compuestas en el gen SCN5A: R34fs/60 y R1195H. La primera da lugar a un truncamiento temprano de la proteína que no genera corriente de sodio. En forma inesperada, el péptido de 94 aminoácidos generado por la mutante R34fs/60, confiere corriente tardía cuando co-expresado con el canal de sodio $Na_v1.5$ conteniendo la mutante R1195H, hecho que sugiere un importante papel de esta región en la inactivación del canal.

Referencias

1. Wang Q, Shen J, Splawski I, et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; 80(5):805-11.
2. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; 392(6673):293-6.
3. Schott JJ AC, Kyudt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Esconde D, Manners MM, Le Marc H. Cardiac Conduction defect associated with SCN5A. *Nature Genetics* 1999; 23:20-21.
4. Benson DW, Wang DW, Dyment M, et al. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 2003; 112(7):1019-28.
5. McNair WP, Ku L, Taylor MR, et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 2004; 110(15):2163-7.
6. Clancy CE, Kass RS. Defective cardiac ion channels: from mutations to clinical syndromes. *J Clin Invest* 2002; 110(8):1075-7.
7. Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, et al. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002; 277(11):9233-41.
8. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, et al. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res* 2003; 93(9):821-8.
9. Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, et al. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2004; 1(5):600-7.
10. Millat G, Chevalier P, Restier-Miron L, et al. Spectrum of pathogenic mutations and associated polymorphisms in a cohort of 44 unrelated patients with long QT syndrome. *Clin Genet* 2006; 70(3):214-27.
11. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2005; 2(5):507-17.
12. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, et al. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 2002; 105(11):1342-7.
13. Levy-Nissenbaum E, Eldar M, Wang Q, et al. Genetic analysis of Brugada syndrome in Israel: two novel mutations and possible genetic heterogeneity. *Genet Test* 2001; 5(4):331-4.
14. Makita N, Sumitomo N, Watanabe I, Tsutsui H. Novel SCN5A mutation (Q55X) associated with age-dependent expression of Brugada syndrome presenting as neurally mediated syncope. *Heart Rhythm* 2007; 4(4):516-9.
15. Liang P, Liu WL, Hu DY, et al. [Novel SCN5A gene mutations associated with Brugada syndrome: V95I, A1649V and delF1617]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2006; 34(7):616-9.
16. Vatta M, Dumaine R, Antzelevitch C, et al. Novel mutations in domain I of SCN5A cause Brugada syndrome. *Mol Genet Metab* 2002; 75(4):317-24.
17. Takahata T, Yasui-Furukori N, Sasaki S, et al. Nucleotide changes in the translated region of SCN5A from Japanese patients with Brugada syndrome and control subjects. *Life Sci* 2003; 72(21):2391-9.
18. Shistik E, Ivanina T, Blumenstein Y, Dascal N. Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type Ca²⁺ channel and its modulation by protein kinase C. *J Biol Chem* 1998; 273(28):17901-9.
19. Dahimene S, Alcolea S, Naud P, et al. The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome. *Circ Res* 2006; 99(10):1076-83.
20. Yamakawa T, Saith S, Li Y, et al. Interaction of Syntaxin 1A with the N-Terminus of K_v4.2 Modulates Channel Surface Expression and Gating. *Biochemistry* 2007.
21. Kass RS. Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17 Suppl 1:S21-S25.

CAPÍTULO V

Implicaciones clínicas y biofísicas de la delección en la región C-Terminal (L1821fs/10) del canal de sodio $\text{Na}_v1.5$

Publicado en:

Cardiovasc Res 2007 (en prensa).

A novel C-terminal truncation *SCN5A* mutation from a patient with sick sinus syndrome, conduction disorder and ventricular tachycardia.

Resumen

Las mutaciones en el gen *SCN5A* que codifica para la isoforma cardíaca de canal de sodio ($\text{Na}_v1.5$), generalmente dan un fenotipo arritmico único, esporádicamente causa fenotipo mixto. Reportamos una mutación en el gen *SCN5A* (L1821fs/10) que genera un truncamiento en la región C-terminal traducido en un fenotipo clínico mixto con penetrancia y expresividad variables.

Un niño de 11 años portador de enfermedad del nodo sinusal, trastornos en la conducción intraventricular, prolongación del intervalo QT y taquicardia ventricular monomórfica sostenida, fue enviado para estudio genético. El análisis mutacional mostró una delección de 4 bases (TCTG) en la posición 5464-5467 del exón 28 de *SCN5A*, dicha mutación se detectó también en 6 familiares, 2 de los cuales mostraron un fenotipo moderado. La delección genera un cambio en el marco de lectura y el truncamiento de la proteína en la posición 1831. La mutante fue expresada en células HEK-293 para estudio funcional por medio de patch-clamp. La densidad de

corriente de la mutante L1821fs/10 se mostró reducida en un 90% comparado con la variante silvestre. El análisis de la cinética de apertura del canal mostró una desviación de 5mV en la activación del canal en sentido positivo, un cambio de 12mV en sentido negativo durante la inactivación y una activación intermedia favorecida. Todos estos hallazgos contribuyen a la reducción en la corriente pico. También se registró corriente tardía. La mutante L1821fs/10 genera una delección importante en el canal de sodio $\text{Na}_v1.5$ con pérdida importante en la función del canal y corriente tardía, lo que explica el fenotipo mixto. La penetrancia y expresividad de la mutación, tuvieron un comportamiento variable en la familia.

Introducción

El gen *SCN5A* codifica la síntesis de la subunidad α de canal de sodio¹, isoforma cardíaca o $\text{Na}_v1.5$. Este canal es responsable de la entrada de corriente de sodio en la célula cardíaca, fenómeno crucial para los fenómenos de excitación y conducción del miocardio y fibras especializadas (His-

Purkinje y otras); también es responsable de la corriente tardía, que influye en la repolarización y refractariedad celular. Las mutaciones en *SCN5A* que aumentan la corriente tardía de sodio (incremento en la función del canal), causan el síndrome de QT largo (SQTL) tipo 3² y las mutaciones que disminuyen la corriente pico (pérdida de la función), causan diversos síndromes: el Brugada tipo 1 (SBr1)³, defectos en la conducción cardíaca (DCC)^{4, 5}, disfunción del nodo sinusal (DNS)⁶, fibrilación ventricular idiopática (FVI), fibrilación atrial (FA) y miocardiopatía dilatada (MCD)⁷.

Estas diversas formas clínicas pueden coexistir o presentarse en forma aislada, una misma mutación puede dar diversos fenotipos simultáneos⁸. La inserción de un ácido aspártico en la región C-Terminal de $Na_v1.5$ (1795insD) puede resultar tanto en SQTL3 como en SBr1⁹; la substitución de una Glicina por una Arginina en la posición 1408 (G1408R) en la región del poro del dominio III resulta tanto en SBr1 y/o DCC en diversas familias¹⁰. La delección de una lisina en el asa interdominio III-IV de $Na_v1.5$ ($\Delta K1500$) se asocia a SBr1, SQTL3 y DCC¹¹. El remplazo de un ácido glutámico por una lisina en la región transmembrana DI/S2, proporciona fenotipos de DNS, SBr1 y DCC⁸. El mecanismo por el cual una mutación proporciona diversos fenotipos no es claro aún. El descubrimiento y la caracterización funcional de nuevas mutaciones nos ayudan a un mejor entendimiento de estos fenómenos.

La región carboxilo terminal del canal $Na_v1.5$ (residuos1773-2016) representa una estructura crucial implicada en la modulación de la inactivación del canal. La estimación de la estructura tridimensional de su estructura predice que la mitad proximal está constituida por 6 estructuras helicoidales, mientras la mitad distal consiste en

péptido no estructurado¹². Las interacciones intramoleculares entre el asa III-IV (específicamente el motivo IFM) y la región C-terminal de $Na_v1.5$, han sido implicadas en la estabilización del estado de inactivación¹³. Los estudios funcionales han mostrado que esta región no estructurada puede ser mutada sin mostrar efectos funcionales importantes; pero la disrupción de la región estructurada o proximal, condiciona un desacoplamiento de la región C-terminal del motivo IFM durante la inactivación.

En el siguiente trabajo describimos la primera delección en la región estructurada C-terminal de $Na_v1.5$ documentada en el humano y sus implicaciones biofísicas y clínicas. Esta delección (L1821fs/10) consiste en la pérdida de 4 bases (TCTG) en *SCN5A*: de la posición 5464 a 5467 en el exon 28, condiciona cambio en el marco de lectura, el último aminoácido codificado apropiadamente es una leucina en la posición 1821, posteriormente se agregan 10 aminoácidos que no corresponden a la secuencia original y la proteína se trunca prematuramente, perdiendo los 195 aminoácidos terminales. Esta delección afecta la región C-terminal organizada en 6 hélices.

A pesar de esta importante disrupción, la mutante L1821fs/10 genera corriente, aunque reducida; al mismo tiempo, genera corriente tardía. El fenotipo del paciente es mixto, DCC, DNS, SQTL y taquicardia ventricular (TV).

Métodos

Análisis Mutacional

El estudio fue realizado de acuerdo a los lineamientos establecidos por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México DF. Después de la obtención de

consentimiento informado de todos los participantes, se obtuvo muestra sanguínea para extracción de DNA de linfocitos periféricos. Por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (DHPLC) y secuenciación directa se estudiaron los 5 principales genes asociados a SQT: *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* y *KCNE2*.

Mutagenesis Dirigida y Expresión Funcional

Para la clonación del canal de sodio hH1b, se utilizó la técnica descrita en el capítulo III de esta tesis. La mutante L1821 fs/10 fue creada por mutagénesis dirigida (kit para mutagénesis deStratagene®) por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La mutante fue construida en la variante resultante del procesamiento alternativo de canal de sodio cardiaco (*SCN5A/h Na_v1.5*) mas frecuente en el humano, en el vector pcDNA3 (Invitrogen; Carlsbad, CA); dicha variante carece de una glutamina en la posición 1077 (Q1077del)¹⁴. La integridad de las construcciones fueron verificadas por secuenciación directa. Los canales de sodio silvestres (normales) y con la mutante, fueron expresados en forma transitoria en células HEK-293 para estudio funcional.

Caracterización Funcional y Mediciones Electrofisiológicas

Las corrientes de sodio macroscópicas fueron registradas por medio de las técnicas estandarizadas utilizando la metodología de Patch Clamp en la configuración de célula completa a una temperatura entre 22-24°C, utilizando una solución extracelular constituida por (unidades en mmol/L): NaCl 140, KCl 4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.75 y HEPES 5 (pH 7.4, utilizando CsOH). Se utilizaron pipetas con una resistencia entre 1.0 y 2.0 MΩ con solución extracelular constituida por (unidades en mmol/L): NaCl 140,

KCl 4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.75 y HEPES 5 (pH 7.4, utilizando CsOH). Los datos fueron adquiridos utilizando pClamp 8.2 (Axon Instruments Inc. Union City, CA) y analizados utilizando Clampfit (Axon instruments Inc.). Los protocolos utilizados fueron los mismos que describimos en los capítulos III y IV de esta tesis.

Inmunohistoquímica

Por medio de microscopía confocal, se evaluaron células HEK-293, 48 horas después de la transfección con el plásmido ADN silvestre y el mutante, conteniendo el epítotope FLAG introducido entre S1 y S2 del dominio I de hNa_v1.5, fijadas con una mezcla fresca de metanol:acetona (1:1) por un minuto.

Análisis Estadístico

Los resultados se muestran en símbolos con error estándar del promedio. La significancia estadística fue determinada utilizando ANOVA para comparación de dos grupos. Una p < 0.05 se consideró como estadísticamente significativa. Las curvas ajustadas se obtuvieron utilizando pClamp 8.2 (Axon Instruments). Las curvas no lineares ajustadas fueron realizadas con Origin 6.0 (Microcal Software).

Resultados

Caso Clínico

Se trata de un paciente de 12 años de edad, evaluado por bradicardia fetal, sin historia familiar de enfermedad cardiaca o muerte súbita. Nació por cesárea sin complicaciones perinatales. Al año de edad se detectó bloqueo de rama derecha del haz de His (BRDHH) y flutter auricular (FIA) (**Figura 5.1A, 5.1B**). A los 3 años se realizó ablación con radiofrecuencia del FIA; durante el procedimiento se observó bradicardia sinusal y pausas de hasta 3.72 segundos con ritmo

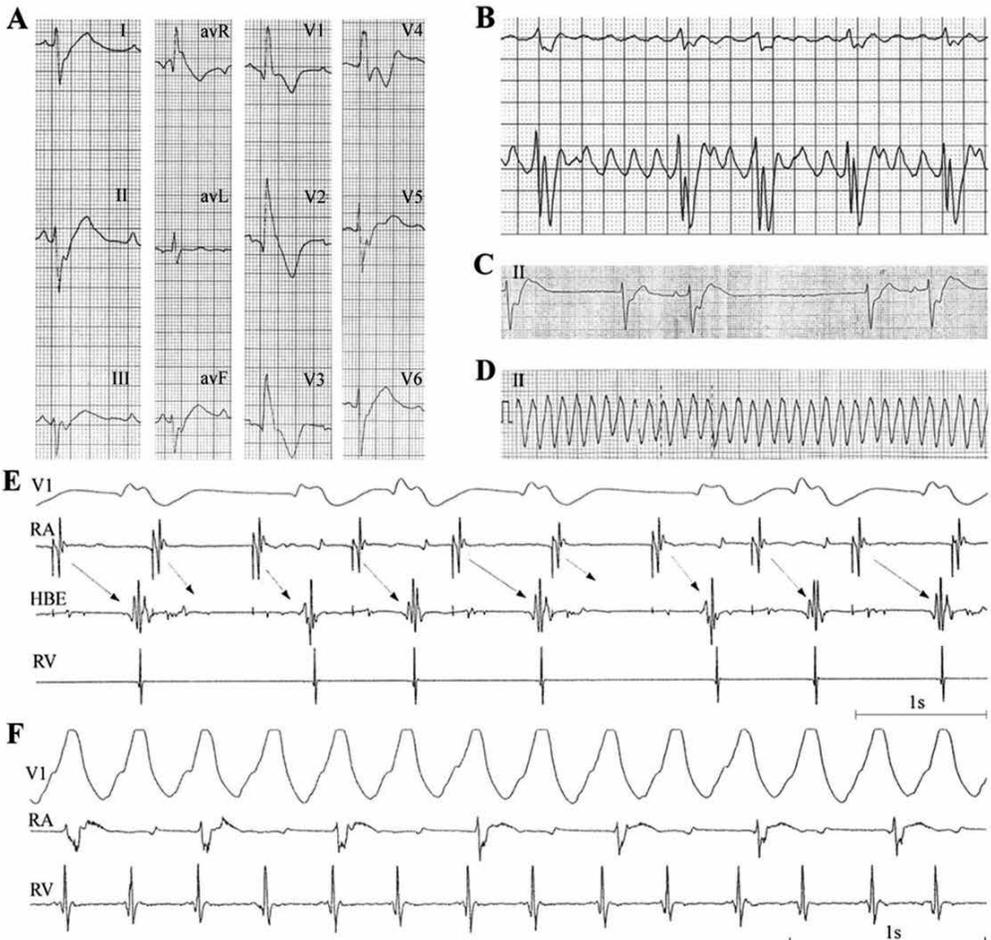


Figura 5.1.

(A). Electrocardiograma de superficie (10mm/mV, 25mm/s) del probando donde se observa ensanchamiento del complejo QRS (160ms) con imagen de bloqueo de rama derecha del haz de His y prolongación del intervalo QT. (B). Holter de 24 hrs que muestra episodio de flutter auricular con conducción ventricular variable, 3:1, 6:1. (C). Derivación II del ECG donde se observa bradicardia sinusal y paro sinusal de 3,72 seg con ritmo de escape de la unión. (D). Derivación II del ECG que muestra taquicardia ventricular monomórfica sostenida. (E). Derivación V1 y registros intracavitarios del atrio derecho (RA), ventrículo derecho (RV) y His (HBE); donde se observa bloqueo AV de segundo grado 4:3. (F). Derivación V1 y registros intracavitarios del atrio derecho (RA) y apex de ventrículo derecho (RV) durante episodio de taquicardia ventricular, se aprecia disociación ventrículo-atrial.

de escape de la unión (**Figura 5.1C**). A los 5 años se documentó taquicardia ventricular monomórfica (TV) (**Figura 5.1D**) manejada con lidocaína en el servicio de urgencias, obteniendo un ritmo de la unión muy lento. Se implantó marcapaso DDD-R y se inició tratamiento con amiodarona. Le fueron realizados dos ecocardiogramas y una tomografía computada del corazón, sin documentarse enfermedad estructural cardiaca. Se realizó estudio electrofisiológico documentando prolongación del intervalo HV de 100ms (normal <50ms) y bloqueo aurículo ventricular 4:3 durante la estimulación atrial (**Figura 5.1E**). Se indujo una taquicardia TV monomórfica con una longitud de ciclo de 350ms (**Figura 5.1F**), se procedió a realizar ablación con radiofrecuencia sin éxito. Se administró propafenona con el fin de desenmascarar probable síndrome de Brugada, la prueba fue negativa para esta enfermedad; mas sin embargo se observó un severo ensanchamiento del complejo QRS, el paciente desarrolló asistolia ventricular transitoria con incremento en los umbrales de estimulación, efecto que revirtió espontáneamente en pocos minutos. Se documentó un QTc de 550ms. Se concluyeron los siguientes diagnósticos clínicos: disfunción del nodo sinusal (DNS), trastornos en la conducción intraventricular (DCC), taquicardia ventricular monomórfica (TV) y síndrome de QT largo (SQTL).

Caracterización

Molecular de L1821fs/10

El análisis genético mostró una delección de 4 bases (TCTG) en la posición 5464-5467 en el exón 28 de *SCN5A* (**Figura 5.2B**), generando un cambio en el marco de lectura L1821fs/10, indicando que el último aminoácido codificado apropiadamente es una leucina (L) en posición 1821, seguido de 10

aminoácidos, no relacionados con la proteína original posterior a los cuales la proteína se trunca en forma prematura (**Figura 5.2A**). El producto de este gen mutado es un canal de sodio de 1831 residuos, en lugar de 2016, con pérdida de 195 aminoácidos de la región C-Terminal.

La mutación tiene penetrancia y expresividad variable, se encontró en la madre (**Figura 5.3**), la abuela, y dos tíos, quienes cursaban asintomáticos, también se encontró en una hermana y una prima quienes a pesar de estar asintomática, presentaron un electrocardiograma anormal, con trastornos en la conducción intraventricular y atrioventricular respectivamente.

Expresión funcional de la mutante L1821fs/10

Las células HEK-293 transfectadas transitoriamente con los canales portadores de L1821fs/10 y la forma silvestre (WT-Q1077del) fueron estudiados por medio de patch clamp después de 24 y 48 horas de incubación. Los canales con la mutación mostraron corriente pico reducida comparados con la forma silvestre (**Figuras 5.4A y 5.4B**). En la figura 5.4C se muestra la suma de la densidad de corriente a las 24 horas de incubación, el canal mutante muestra una dramática reducción en la densidad de corriente de sodio (-4 ± 2 pA/pF, $n=14$) comparado con la forma silvestre (-302 ± 48 pA/pF $n=21$; $p < 0.0001$). A pesar de que la corriente en la mutante se incrementó a las 48 horas de incubación (-22 ± 8 pA/pF, $n=33$), esta fue aún mucho menor que la obtenida con la forma silvestre a las 24hrs de incubación ($p < 0.001$); esto considerando que de 47 experimentos realizados para la mutante a las 48hrs, sólo 5 células tuvieron corriente macroscópica suficiente para el análisis cinético. La extensión de la incubación por 72hrs no incrementó la corriente de la mutante. Se intentó sin

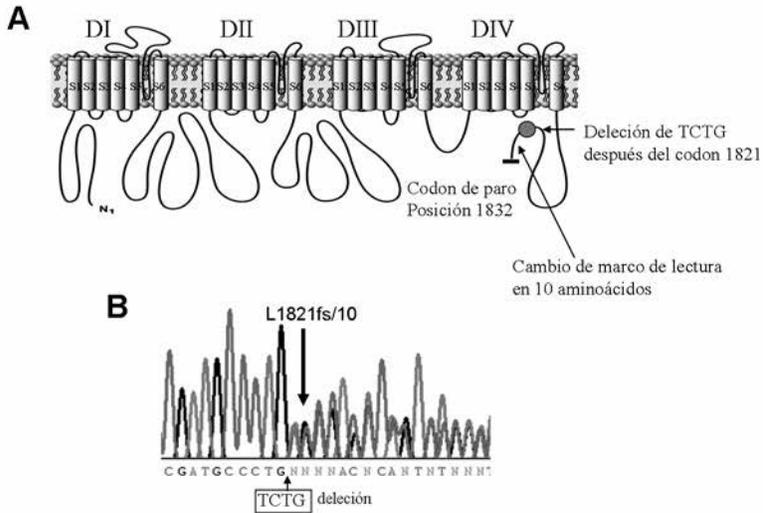


Figura 5.2.

(A). Diagrama topológico de SCN5A que muestra la delección de 4 bases (TCTG) después del codon 1821; causando cambio en el marco de lectura, se agregan 10 nuevos aminoácidos y la proteína se trunca al encontrar un codon de paro en la posición 1832. (B). Secuencia obtenida en el probando que ilustra la delección de 4 bases (TCTG), generando en forma heterocigota L1821fs/10.

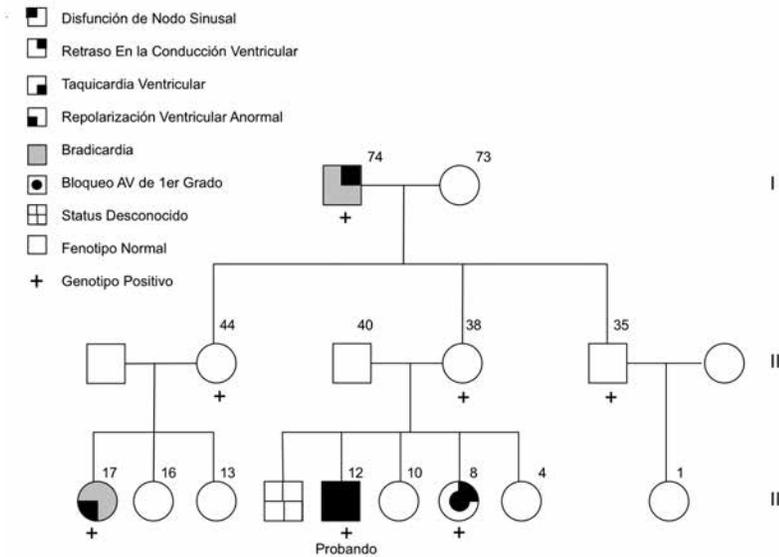


Figura 5.3

Arbol familiar que muestra la correlación genotipo-fenotipo, penetrancia incompleta con expresividad variable de la enfermedad. Las edades al momento de estudio de los individuos participantes, se indica arriba de cada símbolo.

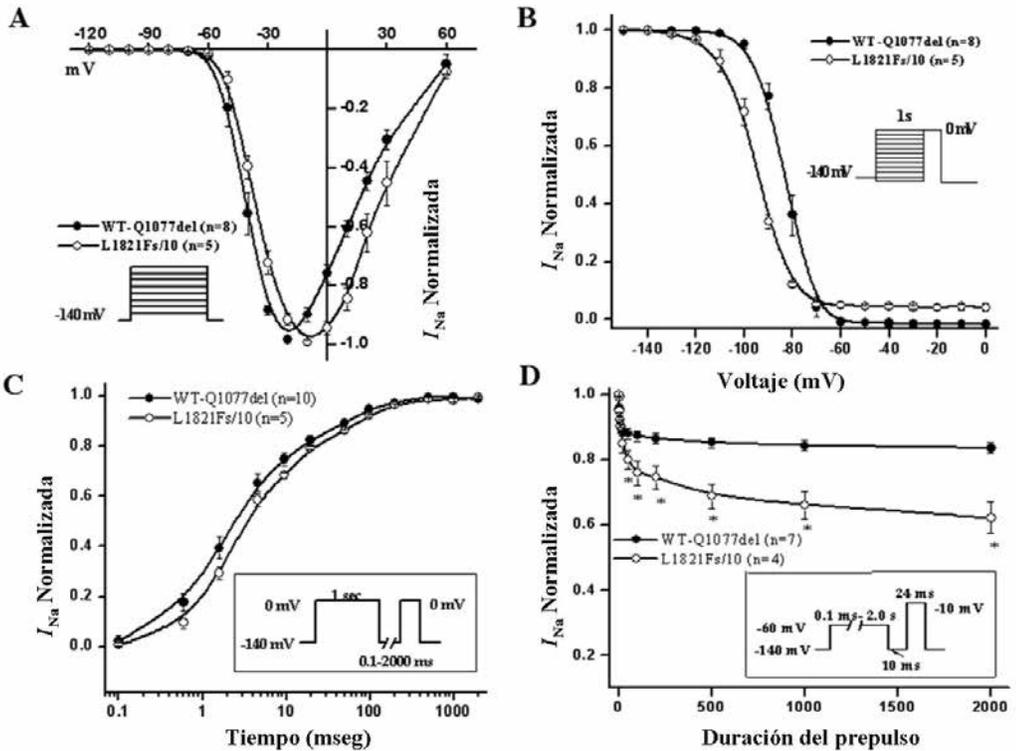


Figura 5.4.

(A, B). Corrientes pico representativas registradas mediante parche perforado para la mutante L1821fs/10 (A) y la variante silvestre (WT-Q1077del) (B) a las 24 hrs (panel izquierdo) y 48 hrs (panel derecho) posterior a la transfección. (C). Representación gráfica de la densidad de INa tanto de la mutante L1821fs/10 como la forma silvestre (WT-Q1077del) a las 24 y 48hrs de incubación. El número de experimentos se indica arriba de cada barra, N.S denota sin diferencias significativas. (D). Trazo representativo de corriente tardía para la mutante L1821fs/10 (trazo superior) y la variante silvestre (trazo inferior), obtenido mediante una prueba de despolarización con pulsos desde -120 mV a -20mV durante 700mseg (se muestran solo 200mseg). La corriente tardía INa fue normalizada a la capacitancia celular y mostrada en pA/pF. (E). Representación gráfica de la corriente tardía INa, normalizada al pico de INa. Después de la substracción de la corriente residual, la media de corriente tardía INa se midió entre 600 mseg y 700 mseg después del inicio de la despolarización. El número de experimentos se indica arriba de cada barra.

WT = variante silvestre.

éxito restaurar la corriente mediante la incubación con fármacos antiaritmicos (mexiletina 500µM, quinidina 100µM y cisaprida 10µM), tampoco funcionó la disminución de la temperatura o la co-expresión con las subunidades β₁ y β₃ de canal de sodio, que en ocasiones mejoran la densidad de la corriente en algunas mutantes.

Cuando L1821fs/10 fue co-expresado con la forma silvestre (0.75 µg DNA, n=10 células a 24 horas), la amplitud de corriente fue cerca del 55% de la forma silvestre (1.5 µg DNA n=10 células), consistente con haploinsuficiencia en el sistema heterólogo de expresión, sin efecto dominante negativo.

La corriente tardía para los canales con la mutante L1821fs/10, se mostró incrementada en respuesta a un pulso largo (700 ms) y despolarizaciones escalonadas iniciando con -140mV (Figura 5.4D). Posterior a la substracción de la corriente residual, la corriente tardía se midió entre 600

mseg y 700 mseg después del inicio de la despolarización y normalizada dividiendo el pico de amplitud máximo de la corriente entre la relación corriente-voltaje (Figura 5.4E, $2.9\% \pm 0.3\%$, $n=5$ para L1821fs/10 y $0.8\% \pm 0.1\%$, $n=5$ para la forma silvestre $p < 0.001$).

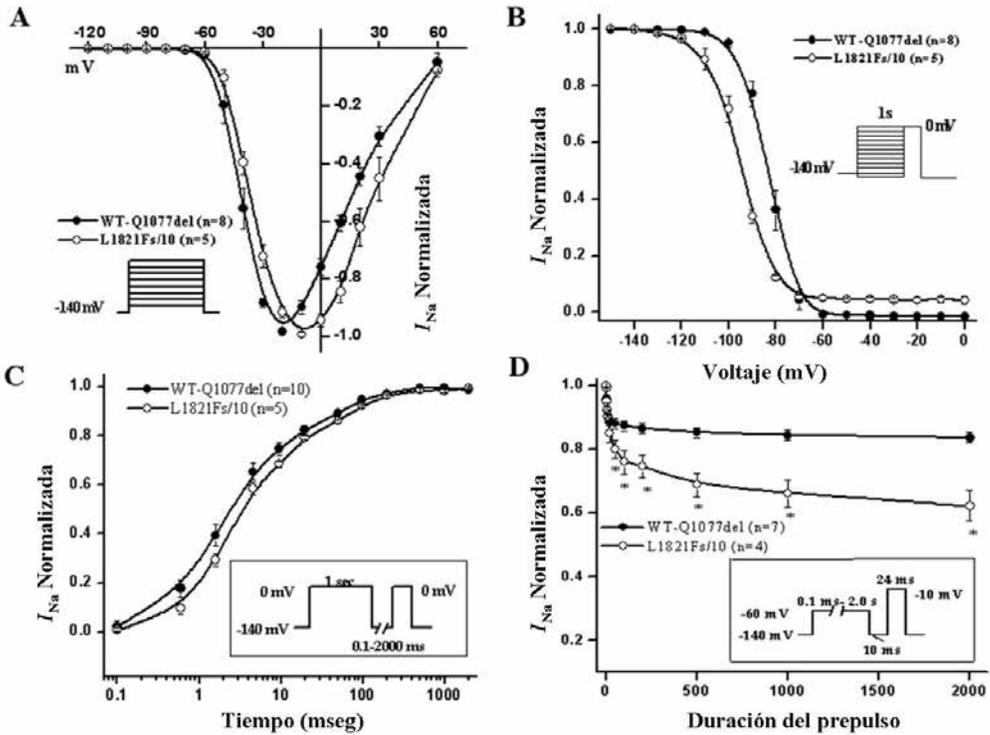


Figura 5.5.

(A). Activación dependiente de voltaje para la mutante L1821fs/10 y la forma silvestre (WT-Q1077del), ajustada mediante la función de Boltzmann. (B). Inactivación para L1821fs/10 y la variante silvestre (WT-Q1077del), ajustada mediante la función de Boltzmann. (C). Recuperación de la inactivación para la mutante L1821fs/10 y la forma silvestre, con el tiempo en escala logarítmica para mejor apreciación el curso de la recuperación. Mismo que se ajustó con dos exponenciales: $I_{Na} \text{ Normalizada} = [A_f \exp(-t/t_f)] + [A_s \exp(-t/t_s)]$ donde t es el tiempo de recuperación t_f y t_s las constantes de tiempo rápida y lenta respectivamente; A_f y A_s son la amplitud fraccional de los componentes de recuperación rápida y lenta respectivamente. (D). Inactivación intermedia para los canales mutantes L1821fs/10 y los silvestres con variante en el tiempo de prepulso. Los datos se muestran como lo valores medios y las barras representan el error estándar de la media. Los parámetros de ajuste se muestran en la tabla 5.1.

*Diferencia estadísticamente significativa.

Propiedades de la apertura dependiente de voltaje en la mutante L1821fs/10

En la Tabla 5.1 y figura 5.5 se muestran las propiedades de apertura dependiente de voltaje para los canales con la forma silvestre y mutante L1821fs/10. El punto medio de la activación dependiente de voltaje se encuentra significativamente desviado positivamente por 5mV y la pendiente fue mayor para la mutante L1821fs/10 comparado con el silvestre. Los canales con la mutante mostraron un incremento en la inactivación intermedia comparada con la forma silvestre para prepulsos con duración mayor de 50 ms (**Figura 5.5D**). Las curvas correspondientes a corriente dependiente de voltaje (**Figura 5.6**) muestran que la mutante tiene una pendiente diferente, mas lenta que la forma silvestre a potenciales >-30mV.

El voltaje dependiente de tiempo a la amplitud pico de la corriente de sodio; las constantes de tiempo de la pendiente de la corriente y la amplitud fraccional de la corriente fueron medidos a potenciales de -50, -40, -30, -20, -10, 0, 10, 20 y 30mV (**Figura 5.6**). El pico de corriente para la mutante L1821fs/10 fue mas temprano que para la forma silvestre a -50mV, pero tiende a aparecer mas tardíamente a potenciales mas despolarizantes (**Figura 5.6A**). Al igual que el tiempo al pico; la pendiente constante de tiempo rápida y lenta fueron más rápidas a -50mV para la Mutante L1821fs/10, y significativamente mas lentas a la despolarización con >-20mV comparada con la variante silvestre (**Figuras 5.6B, 5.6C**). Esta inactivación lenta pudiera contribuir al incremento en la corriente tardía registrada para la mutante.

Inmunocitoquímica

Las células HEK-293 transfectadas fueron marcadas con un anticuerpo anti-FLAG con el fin de documentar la localización de los canales (**Figura 5.7**). Calnexina es una proteína chaperona presente en el retículo endoplásmico. Se utilizaron anticuerpos anti-calnexina marcados para mostrar la colocalización de los marcadores. A las 48 horas posteriores a la transfección, los canales tanto silvestres como mutantes L1821fs/10 tuvieron una localización periférica similar, descartando la posibilidad de pérdida de la función por defectos en el tráfico de la mutante a la superficie celular.

Discusión y Conclusiones

Los canales de sodio con la mutación L1821fs/10 muestran un fenotipo biofísico de pérdida de la función, con corriente tardía; estos hallazgos son compatibles con el fenotipo clínico de DNS, DCC, SQT1 y VT. La pérdida de la función del canal puede ser por defectos en la expresión del canal, generalmente por un defecto en el tráfico del mismo o bien por cambios en la cinética del canal que disminuyen la corriente pico. En el caso de la mutación L1821fs/10, este último mecanismo es el implicado.

El mecanismo por el cual una misma mutación puede dar uno o diversos fenotipos no es aún bien entendido, se ha propuesto que la desviación a la derecha en la curva de activación dependiente de voltaje es un hallazgo común para los casos con DCC^{5, 10, 11, 15}, como observamos con L1821fs/10 (**Figura 5.5A**). Como se muestra en la figura 5.6, los canales con la mutante requieren un potencial de membrana mas positivo para una activación completa y un mayor tiempo para alcanzar el potencial de membrana en el cual se obtiene la máxima corriente/amplitud comparados

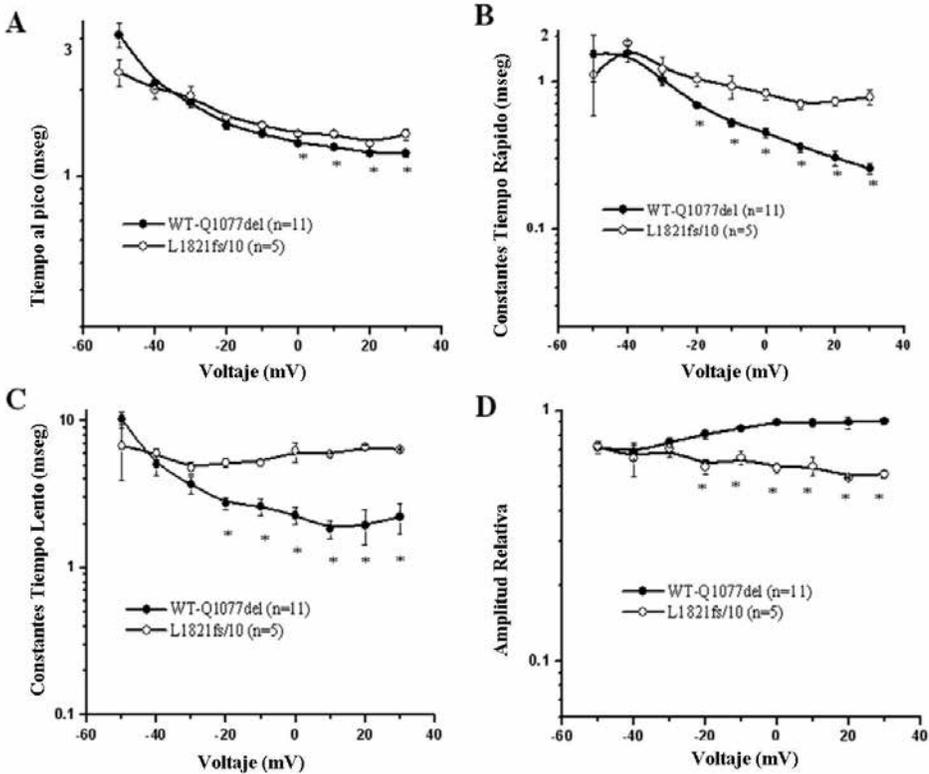


Figura 5.6

(A). Constante de tiempo rápida, (B). Constante de tiempo lenta, (C). Amplitud fraccional rápida de la corriente en decaimiento, (D). Células con corriente pico comparable, fueron seleccionadas para minimizar los efectos derivados de un inadecuado control de voltaje.

WT-Q1077del=Variante silvestre, L1821fs/10=mutante
*Diferencia significativa

con la forma silvestre, lo que se puede traducir en el electrocardiograma como prolongación del complejo QRS (DCC). Sin embargo esto no explica porqué el paciente presenta DNS y porqué no SBr. Interesante es que se ha descrito DCC de diversos grados en pacientes con SBr con mutaciones en canal de sodio¹⁶. De hecho el fenotipo clínico de DCC tiene una penetrancia mayor (76%) que el fenotipo de SBr

(36%)¹⁷. En relación al fenotipo de TV, es un fenotipo raro en las canalopatías, pero se ha reportado en mutaciones del canal de sodio que condicionan SBr¹⁸; el hecho de ser sensible a la estimulación ventricular, sugiere un mecanismo de re-entrada¹⁹. En forma interesante, la disrupción heterocigota de *SCN5A* en ratones, muestra también un fenotipo de arritmias por re-entrada²⁰, sugiriendo que la pérdida de la

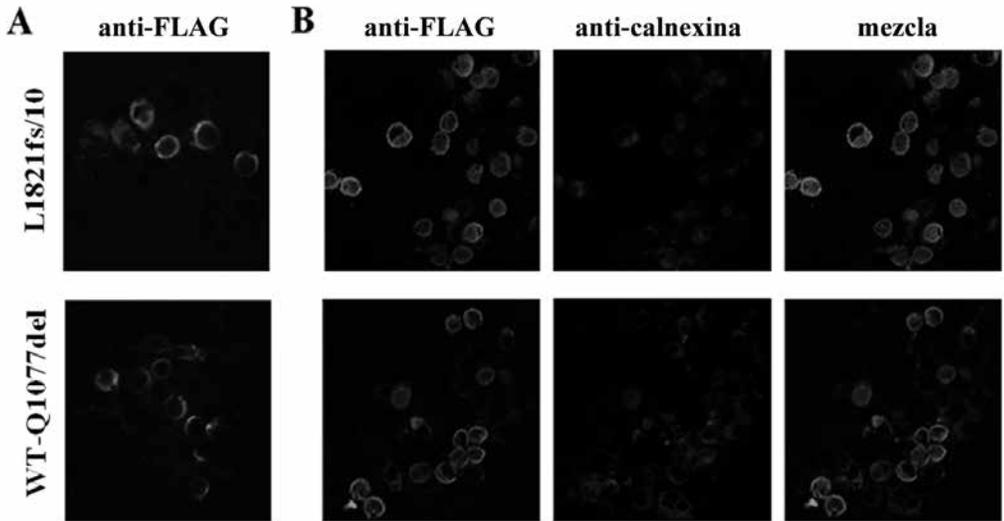


Figura 5.7

Imágenes confocal de las células HEK-293 expresando la mutante L1821fs/10 (panel superior) y la forma silvestre (WT-Q1077-del, panel inferior), con canales de sodio marcados con FLAG. **(A)**. Marca en la superficie de las células no-permeabilizadas utilizando anticuerpo anti-FLAG. **(B)**. Doble marca en las células permeabilizadas utilizando anti-FLAG y anti-calnexina, anticuerpo para mostrar colocalización.

función del canal de sodio puede dar lugar a arritmias por reentrada, del tipo de la taquicardia ventricular.

La mutación L1821fs/10 muestra también corriente tardía (**Figuras 5.4D y 5.4E**), lo que traduce incremento en la función del canal y de hecho, este es uno de los mecanismos implicados en el SQT13. Esto pudiera sonar paradójico, pérdida de la función e incremento en la función del canal con la misma mutante, pero en realidad ambos mecanismos se refieren a distintos tiempos del ciclo funcional del canal, la “pérdida de la función” se refiere a la disminución de la corriente pico condicionada por la apertura del canal, y el “incremento en la función” se refiere a la conductancia al sodio durante la inactivación, lo que genera la llamada “corriente tardía”. Para la mutante L1821fs/10 existe una disminución en la corriente pico, pero al mismo

tiempo, el canal no cierra por completo durante la inactivación.

En los últimos años, la región C-Terminal ha sido motivo de gran atención, diversas mutaciones en esta zona condicionan un fenotipo clínico y biofísico de pérdida de la función del canal. Se ha propuesto que el dominio C-Terminal tiene un efecto directo en la inactivación, estabilizando este estado durante despolarizaciones prolongadas. La delección L1821fs/10 ocurrida naturalmente, trunca la proteína en la posición 1832; y muestra un fenotipo biofísico similar al reportado por Dr. Kass quien en forma experimental creó una mutación que trunca la proteína en la posición 1835, esta mutación también mostró corriente tardía con desviación de la curva de inactivación en dirección hiperpolarizante, aunque la corriente pico fue normal^{13, 21, 22}.

Es interesante que familiares portadores de la mutación presentan un fenotipo ligero o se encuentran asintomáticos. Los portadores asintomáticos en el árbol familiar son principalmente del sexo femenino. Se ha reportado previamente que los fenotipos con pérdida de la función en canal de sodio en particular el SBr, son predominantes en el sexo masculino, aunque no existe una explicación a este fenómeno. Otra explicación a la penetrancia incompleta observada en esta familia pudiera encontrarse en otros polimorfismos en el mismo gen que pueden modular la severidad de las mutaciones, como sucede con el poli-

morfismo H558R, esta variante se presenta en cerca del 30% de la población y tiene importantes propiedades regulatorias sobre otras mutaciones^{14, 23}, pero en esta familia no se documentó el polimorfismo H558R, por lo que la penetrancia incompleta y expresividad variable se deben a otros mecanismos, que pudieran estar relacionados a supresión alélica de la mutación, aunque otros factores genéticos y ambientales pudieran contribuir. El entendimiento de estos mecanismos de "protección" permitirá conocer mejor la patogénesis de la enfermedad e incluso generar una terapia específica.

Referencias

1. Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol* 2002; 205(Pt 5):575-84.
2. Wang Q, Shen J, Li Z, et al. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet* 1995; 4(9):1603-7.
3. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; 392(6673):293-6.
4. Schott JJ AC, Kyudt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Esconde D, Manners MM, Le Marc H. Cardiac Conduction defect associated with SCN5A. *Nature Genetics* 1999; 23:20-21.
5. Tan HL B-BM, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beafourt-Krol GC, Van Tintelen PJ, Van den Berg MP, Wilde AA, Balsev JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001; 409:1043-47.
6. Benson DW, Wang DW, Dyment M, et al. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 2003; 112(7):1019-28.
7. Olson TM, Michels VV, Ballew JD, et al. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *Jama* 2005; 293(4):447-54.
8. Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, et al. A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38(6):969-81.
9. Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, et al. A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res* 1999; 85(12):1206-13.
10. Kyndt F, Probst V, Potet F, et al. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 2001; 104(25):3081-6.
11. Grant AO CM, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002; 110(8):1201-9.
12. Glaaser IW, Bankston JR, Liu H, et al. A carboxyl-terminal hydrophobic interface is critical to sodium channel function. Relevance to inherited disorders. *J Biol Chem* 2006; 281(33):24015-23.
13. Kass RS. Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17 Suppl 1:S21-S25.

14. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, et al. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res* 2003; 93(9):821-8.
15. Shirai N, Makita N, Sasaki K, et al. A mutant cardiac sodium channel with multiple biophysical defects associated with overlapping clinical features of Brugada syndrome and cardiac conduction disease. *Cardiovasc Res* 2002; 53(2):348-54.
16. Smits JP, Eckardt L, Probst V, et al. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40(2):350-6.
17. Probst V, Allouis M, Sacher F, et al. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17(3):270-5.
18. Probst V, Evain S, Gournay V, et al. Monomorphic ventricular tachycardia due to Brugada syndrome successfully treated by hydroquinidine therapy in a 3-year-old child. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17(1):97-100.
19. Bertomeu-Gonzalez V, Ruiz-Granell R, Garcia-Civera R, et al. Syncopal monomorphic ventricular tachycardia with pleomorphism, sensitive to antitachycardia pacing in a patient with Brugada syndrome. *Europace* 2006; 8(12):1048-50.
20. Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, et al. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(9):6210-5.
21. Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, et al. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002; 277(11):9233-41.
22. Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, et al. The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004; 123(2):155-65.
23. Poelzing S, Forleo C, Samodell M, et al. SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation* 2006; 114(5):368-76.

Disusión General

El Síndrome de QT Largo representa el prototipo de las canalopatías cardíacas¹ y es quizá el síndrome arritmico heredable mejor entendido hasta la fecha. Desde la descripción de las primeras mutaciones causales del SQT en 1995, cientos de mutaciones se han descrito en hasta ahora 9 genes. 5 de estos genes codifican unidades formadoras del poro de diversos canales iónicos y 4 codifican proteínas regulatorias. Pero aún, 25% de los casos con SQT permanecen sin diagnóstico genético². Los registros internacionales de esta enfermedad, están constituidos principalmente por pacientes de origen caucásico-europeo, de manera que las razas de oriente, población negra y americano-mestizas han sido pobremente estudiadas. Sin embargo, se ha demostrado que existen diferencias étnicas en la manifestación de las canalopatías cardíacas, por ejemplo, algunos polimorfismos regulatorios, tienen mayor incidencia en población negra, como el polimorfismo S1103Y del gen *SCN5A* (que codifica la subunidad alfa del canal de sodio $Na_v1.5$), frecuente en población áfrico-americana y asociado a un incremento en el riesgo de muerte súbita^{3, 4} o la variante R34C, también en *SCN5A* que se encontró con mayor frecuencia en población de habla hispana de Estados Unidos⁵. Otro ejemplo es el Síndrome de Brugada caracterizado por elevación del segmento ST en precordiales derechas y muerte súbita, 30% tiene pérdida de la

función del canal de sodio codificado por *SCN5A*; es más frecuente en población asiática que en cualquier otra población^{6,7}. En la presente tesis, encontramos que mientras en la literatura está reportado que tan solo 10% de los casos con SQT tienen mutaciones en canal de sodio⁸, en la población estudiada compuesta por 12 casos de origen mexicano-mestizo, las alteraciones en el complejo macromolecular de canal de sodio, fueron el substrato patogénico predominante. El número de casos es limitado para concluir que en población mexicana-mestiza existe mayor número de pacientes con SQT y afección en canal de sodio, pero abre la discusión sobre el tema y expone la necesidad de realizar mayores estudios en este sentido.

El análisis detallado de algunas de las mutaciones encontradas en esta población, permitió realizar observaciones interesantes: desde el punto de vista genético la penetrancia (individuos que manifiestan la enfermedad cuando portan la mutación) y expresividad (fenotipos que puede dar una enfermedad) fueron muy variables en las mutaciones que afectaron la corriente de sodio; de hecho todas ellas tuvieron penetrancia y expresividad variable, no así las encontradas en canal de potasio. Este hallazgo sugiere que los mecanismos regulatorios en la función del canal de sodio son mucho más complejos. Algunos de estos mecanismos pudieran

estar en relación a la presencia de polimorfismos con propiedades moduladoras⁹ en el gen *SCN5A*, o bien en función del procesamiento alternativo de este gen¹⁰⁻¹², que se ha demostrado puede dar lugar a una reducida reserva en la conductancia al sodio, que sumará su efecto al fenotipo¹². La mutación L1821fs/10 en *SCN5A* se encontró en 6 miembros de la familia –además del probando– 3 con fenotipo moderado y 3 asintomáticos, si bien no se encontró otro polimorfismo en el canal de sodio en esta familia, la mutación sólo se estudió en canales con la variante de procesamiento alternativo Q1077del, por ser la más frecuente (65%)¹⁰.

Continuando con las observaciones genéticas, las mutaciones compuestas dieron un fenotipo más grave, como sucedió con el caso que portó las mutaciones R34fs/60 (heredado por la madre) + R1195H (heredado por el padre) en el canal de sodio $Na_v1.5$, el caso falleció antes del año de edad, mientras los padres, a pesar de portar una de las variantes, cursan asintomáticos. En esta misma familia surgió otro hallazgo interesante derivado del hecho de que la mutante R34fs/60 constituye un modelo clínico de haploinsuficiencia del canal de sodio al formar solo los primeros aminoácidos de la región N-terminal; el producto final carece de todos los segmentos transmembranales del canal. En forma inesperada, la madre que porta la mutación, cursa asintomática con fenotipo eléctrico normal, lo que sugiere que el alelo sano es capaz de compensar el defecto severo del alelo enfermo. Existen modelos animales de haploinsuficiencia del canal de sodio (*SCN5A*)¹³ que muestran que en animales con *SCN5A+/-* (haploinsuficiencia heterocigota), la pérdida de la función del canal es edad-dependiente; estos hallazgos reportados en ratón no

fueron reproducidos en la familia estudiada; aunque los casos fueron analizados en reposo, quizá al esfuerzo o mediante reto farmacológico la haploinsuficiencia pudiera hacerse manifiesta.

En relación al entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en el SQT, en la presente tesis se hacen algunas contribuciones relevantes, quizá la más importante constituye el hallazgo de una nueva proteína implicada en la enfermedad. En años recientes se ha hecho evidente que los canales iónicos son parte de un complejo macromolecular que incluye el canal, proteínas auxiliares del mismo, componentes del citoesqueleto, proteínas de la matriz extracelular e incluso otros canales iónicos¹⁴. Este concepto tiene un gran impacto en el estudio de las canalopatías arritmogénicas, pues en teoría la disfunción de cualquiera de los componentes del complejo macromolecular, dará lugar a disfunción del canal iónico en cuestión. La identificación de cada una de las proteínas que integran este complejo, es de crucial importancia pues quizá en este grupo de proteínas se encuentre la explicación de parte de los casos que hasta ahora han resultado con genotipo negativo. En la presente tesis mostramos que la proteína auxiliar del canal de sodio $Na_v\beta4$, codificada por el gen *SCN4B*, explica el fenotipo en uno de los 4 casos con genotipo-negativo/fenotipo-positivo, de la cohorte de 12 pacientes. Interesante es que existen otras 3 subunidades auxiliares β del canal de sodio ($Na_v\beta1$, $Na_v\beta2$ y $Na_v\beta3$)^{14, 15}, expresadas en corazón que no han sido exploradas en este síndrome y que pudieran participar en la fisiopatología de la enfermedad.

Por otro lado, en el estudio de esta subunidad auxiliar, nos encontramos que los modelos celulares de expresión heteróloga no son ideales cuando se estudia el com-

plejo macromolecular del canal iónico, las células HEK293 (embrionarias de riñón humano), prototipo en el estudio de esta enfermedad, carecen de las proteínas y entorno natural del canal de sodio y la pregunta es ¿qué tanto se pueden extrapolar estos experimentos al corazón humano?, lo ideal sería expresar estas mutaciones en cardiomiocitos que contienen el entorno natural –o complejo macromolecular- del canal estudiado.

Otras observaciones importantes relacionadas con la estructura-función del canal de sodio, fueron las derivadas de los estudios funcionales de las deleciones L1821fs/10 y R34fs/60. La mutante L1821fs/10 constituye la primera en esta región en ser reportada en el humano; si bien con anterioridad se habían publicado los efectos in-vitro de la deleción en sitios cercanos^{16, 17}, mismos que aportaron conocimientos importantes en la fisiología de la inactivación del canal permitiendo reconocer la región C-terminal como segmento crucial en la inactivación; el fenotipo clínico resultante de una deleción ocurrida naturalmente en este sitio, no había sido descrita. Esta deleción condicionó un fenotipo mixto, disfunción del nodo sinusal, arritmias por re-entrada ventricular, trastornos en la conducción ventricular, que traducen pérdida de la función del canal de sodio (disminución de la corriente pico) aunado a SQTl (incremento en la conductancia al sodio en la fase 2 del potencial de acción, manifestada en los estudios electrofisiológicos por registro de corriente tardía).

Reafirmando el concepto de la importante interacción de las diferentes variantes en el gen *SCN5A*; la mutante R34fs/60 por sí sola no mostró corriente tardía, la variante R1195H mostró curvas de activación e inac-

tivación desviadas a la izquierda, pero no corriente tardía. La asociación de ambas mutantes generó corriente tardía reconstituyendo así el fenotipo clínico de SQTl observado en el enfermo y planteando la posibilidad de que la región N-terminal del canal de sodio participa en la inactivación del canal, hipótesis que amerita estudiarse con mayor profundidad.

Desde el punto de vista clínico, y resaltando la importancia de la correlación genotipo-fenotipo, otra observación ha sido importante: 4 de los 12 casos que presentamos aquí tuvieron un fenotipo de: trastorno en la conducción intraventricular, enfermedad del nodo sinusal, intervalo QT prolongado y taquicardia ventricular. Esta peculiar combinación de fenotipos no se había descrito con anterioridad, en particular la taquicardia ventricular, es una arritmia poco común en el contexto de SQTl, aunque ha sido reportada esporádicamente en casos con Sx de Brugada⁸ (pérdida de la función del canal de sodio) donde se genera por un mecanismo de reentrada^{19,20}. Interesante es que todos los pacientes con este fenotipo tuvieron mutación en el canal de sodio; y el fenotipo biofísico reveló pérdida de la función de $Na_v1.5$ (disminución de la corriente pico), aunado a incremento en la función por defectos en la inactivación que favorecen corriente tardía. De esta forma se puede proponer que en los pacientes con el fenotipo mixto mencionado, se debe sospechar en enfermedad del canal de sodio.

Como sucede en muchos proyectos de investigación, los hallazgos iniciales en este trabajo marcaron el camino a seguir; reorientaron algunos objetivos de la tesis, y

al final, realizamos estudios más profundos sobre el canal de sodio, no así sobre el canal de potasio; que si bien no estaba contemplado, dieron trabajo suficiente y

revelaron conceptos importantes que espero contribuyan al entendimiento y tratamiento de esta enfermedad.

Referencias

1. Priori SG, Napolitano C. Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1015:96-110.
2. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2005; 2(5):507-17.
3. Plant LD, Bowers PN, Liu Q, et al. A common cardiac sodium channel variant associated with sudden infant death in African Americans, SCN5A S1103Y. *J Clin Invest* 2006; 116(2): 430-5.
4. Burke A, Creighton W, Mont E, et al. Role of SCN5A Y1102 polymorphism in sudden cardiac death in blacks. *Circulation* 2005; 112(6):798-802.
5. Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, et al. Spectrum and prevalence of cardiac sodium channel variants among black, white, Asian, and Hispanic individuals: implications for arrhythmogenic susceptibility and Brugada/long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2004; 1(5):600-7.
6. Antzelevitch C. Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006; 29(10):1130-59.
7. Shimizu W. The Brugada syndrome—an update. *Intern Med* 2005; 44(12):1224-31.
8. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, et al. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *Jama* 2005; 294(23):2975-80.
9. Poelzing S, Forleo C, Samodell M, et al. SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation* 2006; 114(5):368-76.
10. Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, et al. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res* 2003; 93(9):821-8.
11. Ye B, Valdivia CR, Ackerman MJ, Makielski JC. A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiol Genomics* 2003; 12(3):187-93.
12. Tan BH, Valdivia CR, Rok BA, et al. Common human SCN5A polymorphisms have altered electrophysiology when expressed in Q1077 splice variants. *Heart Rhythm* 2005; 2(7):741-7.
13. van Veen TA, Stein M, Royer A, et al. Impaired impulse propagation in Scn5a-knockout mice: combined contribution of excitability, connexin expression, and tissue architecture in relation to aging. *Circulation* 2005; 112(13):1927-35.
14. Meadows LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 2005; 67(3):448-58.
15. Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ, et al. Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43(5):636-47.
16. Kass RS. Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17 Suppl 1:S21-S25.
17. Glaaser IW, Bankston JR, Liu H, et al. A carboxyl-terminal hydrophobic interface is critical to sodium channel function. Relevance to inherited disorders. *J Biol Chem* 2006; 281(33):24015-23.
18. Probst V, Evain S, Gournay V, et al. Monomorphic ventricular tachycardia due to Brugada syndrome successfully treated by hydroquinidine therapy in a 3-year-old child. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17(1):97-100.
19. Bertomeu-Gonzalez V, Ruiz-Granell R, Garcia-Civera R, et al. Syncopal monomorphic ventricular tachycardia with pleomorphism, sensitive to antitachycardia pacing in a patient with Brugada syndrome. *Europace* 2006; 8(12):1048-50.

20. Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, et al. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(9):6210-5.

Apéndice

El conocimiento sin compasión es inhumano y la compasión sin conocimiento es inefectiva.

Anónimo

Los científicos no persiguen la verdad,
es ésta quien los persigue a ellos.

Karl Schlechta

No he fallado, he encontrado 10,000 maneras que no funcionan.

Thomas Edison

Los sabios buscan la sabiduría; los necios creen haberla encontrado.

Napoleón Bonaparte

Arriesgarse es perder un poco, no arriesgarse es perderlo todo.

Vladimir Mayacowsky

Cuando no sabemos a que puerto nos dirigimos, todos los vientos son desfavorables.

Séneca

Cuanto menos se lee, más daño hace lo que se lee.

Miguel de Unamuno

El arte de vencer se aprende en las derrotas.

Simón Bolívar

El hombre sabio no lo es en todas las cosas.

Michel D. Montaigne

El que pregunta con mala intención no merece conocer la verdad.

San Ambrosio

En la vida hay algo peor que el fracaso: el no haber intentado nada.

Franklin D. Roosevelt

Engrandecerás a tu pueblo no elevando sus tejados, sino las almas de sus habitantes.

Epicteto

Es más fácil saber como se hace una cosa que hacerla.

Ignoramos nuestra verdadera estatura hasta que nos ponemos en pié.

Emily Dickinson

Lo poco que sé se lo debo a mi ignorancia.

Platón

Nada nos engaña tanto como nuestro propio juicio.

Leonardo da Vinci

No hay maestro que no pueda ser discípulo.

Baltasar Gracian

Si hallas un camino sin obstáculos, desconfía. Lo mas probable es que no conduzca a ninguna parte.

Constancio C. Vigil

Si dos individuos están siempre de acuerdo en todo, es porque uno de los dos piensa por ambos.

Sigmund Freud

Si no puedes ganar, estimula al que ha tomado la delantera para que rompa la marca.

Jan Mickeithen

Si a tu muerte no quieres perderte en el olvido, escribe cosas dignas de leerse, o haz cosas dignas de escribirse.

Benjamin Franklin

Si tu intención es describir la verdad, hazlo con sencillez y la elegancia déjasela al sastre.

Albert Einsten

Hay tres clases de mentiras: las mentiras, las malditas mentiras y las estadísticas.

Mark Twain

Prefiero que mi mente se abra movida por la curiosidad a que se cierre movida por la convicción.

G. Spence

Los grandes sucesos dependen de incidentes pequeños.

Demóstenes

La mente es como un paracaídas, solo funciona cuando es abierta.

Sir James Dejar

Las inovadoras ideas son consideradas disparates en su inicio.

Alfred North Whitehead

La ciencia no es una religión. Si lo fuese, no tendríamos problemas para conseguir dinero.

Leon Lederman

Si quieres cultivar enemigos, trata de cambiar las cosas.

Woodrow Wilson

Lo bueno de los estandares es que tenemos muchas opciones.

Anónimo

La mitad del trabajo realizado en este mundo es para hacer parecer las cosas lo que no son.

Elias Root Beadle

El hombre que nunca comete errores, siempre sigue las órdenes de alguien que los comete.

Anónimo

Siempre que te encuentres parte de la mayoría, es hora de hacer pausa y reflexionar.

Anónimo

El hombre tarda dos años en aprender a hablar y el resto de su vida en aprender a callar

Anónimo

El que quiere de esta vida todas las cosas a su gusto, tendrá muchos disgustos.

Miguel Angel Quevedo

La diplomacia es el arte de conseguir que los demás hagan con gusto lo que uno desea que hagan.

Andrew Carnegie

Nadie está libre de decir estupideces, lo grave es decir las con énfasis.

Michel D. Montaigne

Los grandes no son grandes, si no son buenos.

Samuel Smiles

Sólo el que manda con amor es servido con fidelidad.

Miguel Angel Quevedo

Una de las mayores pruebas de mediocridad estriba en no saber reconocer la superioridad de los demás.

J.B. Say

Tiempo perdido es vida perdida.

Sathya Sai Baba