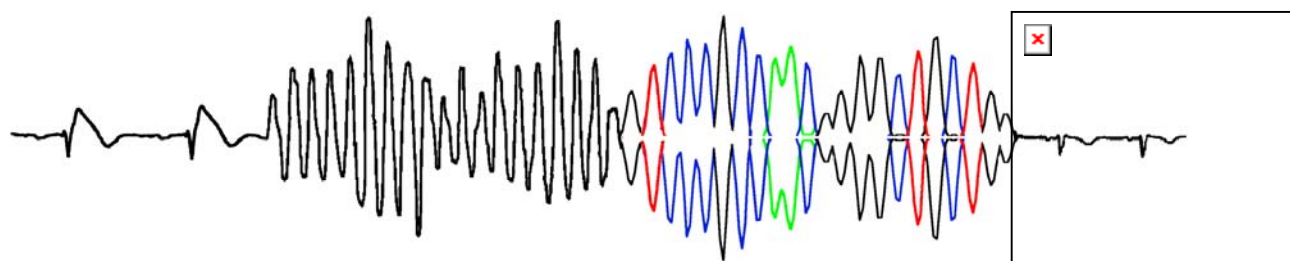


GENÈTICA I CAOS ELÈCTRIC

EL CANAL DE SODI EN LA SÍNDROME DE BRUGADA.



Ramon Brugada i Terradellas

GENÈTICA I CAOS ELÈCTRIC

EL CANAL DE SODI EN LA SÍNDROME DE BRUGADA.

**Memòria presentada per en
Ramon Brugada i Terradellas
per optar al grau de Doctor en Medicina per la
Universitat Autònoma de Barcelona.**

**Directors: Josep Brugada i Terradellas
 Jaume Guàrdia i Massó**

21 de febrer del 2008



PRÒLEG.

Naixem predestinats a morir. Ho sabem, però no hi ha res més trist per a una família que perdre un ésser estimat. Amb la seva absència manquen tantes altres coses; per als germans la il·lusió d'envellir junts; per als fills un conseller; per als pares, el sentit de la seva pròpia existència. Queden els bons records però tot queda entel·lat. Mai res torna a ser igual; es trenca l'alegria d'un Nadal, d'un tió o d'una reunió familiar.

Decisions i tendències professionals han fet que la meva activitat clínica i de recerca giri al voltant de la mort sobtada cardíaca, que sovint afecta els més joves. He tingut l'oportunitat d'observar nombroses famílies afectades per una pèrdua tan injusta i he pogut escoltar les seves vivències, les seves penes i les seves pors. M'havia preguntat tantes vegades d'on treien la força per a continuar, fins fa uns mesos.

A l'Anna, a la Clàudia i a l'Aleix Ramon, em donen la resposta cada dia.

Al pare, com sempre continua assegut a primera fila.

A la mare, als germans i nebots; ens veiem tan poc.

A tantes i tantes famílies que suporten aquest dur procés.

Naixem predestinats a morir. Un concepte tan senzill i tan complex alhora. Malgrat que ho intentem racionalitzar costa d'acceptar que la mort sigui part del nostre viure.

Els qui m'estimen em permetran que dediqui aquest treball especialment a la meva germana, la Teta, perquè ella hauria estat la primera a qui jo hauria trucat per dir-li que l'havia acabat. Malgrat tots els esforços que he dedicat a la recerca, no he arribat a temps. Em sap greu i t'enyoro.

Sóc emigrant i et desdibuixen
els meus ulls humits i resignats;
d'aprop contemplen com la tristesa
recolça al vidre la seva mà.

Ets emigrant i encongít t'abraça
des la finestra el meu plorar;
llàgrimes per tanta impotència
del meu cor buit i desconsolat.

Som emigrants a punt de sortida,
dos camins amb destins distants.
Ens acomiadem però amb un somriure,
no és un adéu sinó un a reveure més llarg.

AGRAÏMENTS

A en Pere i a en Josep, que continuen definint el camí de la meva vida.

Al Professor Bayés de Luna, el meu “mentor” a l'escola de medicina.

Al Dr Robert Roberts i a l'AJ Marian que varen fer que estimés la recerca.

A les famílies amb les quals treballem, que em recorden que cal ser humil.

A tots els metges i col.laboradors d'arreu que han fet possible el projecte.

A tots els qui han format o formen part del laboratori.

Catherine Barahona-Dussault

Sue Bartkowiak

Vicky Brugada

Elena Burashnikova

Tabitha Carrier

Grace Czernuszewicz

José Flores

Xavi Fuentes

Maday Gonzalez

Alejandra Guerchicoff

Kui Hong

Eva Hookana

Anna Iglesias

Juhani Juntilla

Pascal Karam

Eric Lizotte

Kiyotaka Matsuo

Antonio Oliva

Ryan Pfeiffer

Guido Pollevick

Naravat Pongvarin

Georgina Sarquella

Terry Tapscott

Kevin Vernooy

I també a aquells amb qui engegarem nous projectes.

Òscar Campuzano

Begoña Benito

Josep Sànchez

Maria Guillem

PRESENTACIÓ

El 1992 es va descobrir la que ara s'anomena la síndrome de Brugada. Des de llavors, la recollida de mostres, pacients i membres de famílies no s'ha aturat. L'augment exponencial en el nombre de publicacions dóna fe que hi ha un interès molt gran en la malaltia, però també que estem lluny encara d'acabar la feina, lluny de comprendre-la. El treball exposat en aquesta tesi és el resultat dels estudis del nostre grup. Hem recollit famílies amb la síndrome i hem identificat els portadors genètics de la malaltia. Investiguem dades clíniques i genètiques que ens permetin comprendre millor les implicacions de tenir una mutació. Altrament hem investigat si hi ha factors genètics addicionals i ambientals que puguin determinar el risc de patir una mort sobtada en aquests individus.

Aquest treball és, en definitiva, un seguiment de la població més gran coneguda amb la síndrome de Brugada determinada genèticament. Allò que semblava una curiositat electrocardiogràfica s'ha convertit en una línia de recerca per a molts centres especialitzats en genètica de les arítmies cardíques; també per al nostre.

INDEX

Introducció	11
La mort sobtada	13
L'activitat elèctrica cardíaca	15
Genètica de la mort sobtada	18
Proteïnes associades a mort sobtada	20
Corrent de sodi i mort sobtada	24
La Síndrome de Brugada	27
Introducció	29
L'ECG a la síndrome	30
Prevalença	36
Formes induïdes	39
Mort sobtada al sud-est asiàtic	40
Aspectes clínics de la malaltia	41
Aspectes bàsics de la malaltia	47
Hipòtesi de treball	51
Objectius	51
El perquè de la proposta	53

INDEX (Continuació)

Materials i mètodes	55
Mètodes Clínics	57
Mètodes genètics	60
Resultats	65
Objectiu 1	67
Objectiu 2	75
Objectiu 3	91
Conclusions	109
Bibliografia	127
Publicacions de l'autor	144

INTRODUCCIÓ

LA MORT SOBTADA.

La mort sobtada és una causa de mortalitat molt important als països industrialitzats. Cada any, al món occidental la mort sobtada afecta al voltant de 800.000 individus. Aquest nombre representa més morts que les causades per SIDA, càncers de pulmó i de mama, i accidents cerebrovasculars junts.¹

La mort sobtada cardíaca es defineix com la mort natural per raons cardíques que esdevé poc després de l'aparició dels símptomes. Quan es fa una definició temporal d'una hora, l'estimació és que un 13% de les morts naturals tenen un origen cardíac; quan la definició és de 24 hores, llavors la incidència augmenta a 18.5% de les morts naturals.²

La incidència de mort sobtada cardíaca varia segons l'edat de la població. Així, la incidència és de 1/1.000 per any en la població general, que disminueix a 1/50-100.000 en poblacions joves. Tanmateix, la incidència augmenta d'acord a la presència de patologia cardíaca prèvia; essent del 5% per any en una població de malalts coronaris, del 15% en població MADIT II (individus amb fracció d'ejecció de menys de 35%) i del 20% en la població que ha sobreviscut a una aturada cardíaca anteriorment.³

Les etiologies de la mort sobtada són depenents de l'edat. Els individus joves amb mort sobtada cardíaca estan afectats, en un percentatge important, per malalties genètiques com la síndrome de Brugada, de QT llarg o les miocardiopaties. Aquestes darreres són precisament la causa més freqüent de mort sobtada en l'atleta jove.⁴

La malaltia coronària és responsable del 80% de les morts sobtades en els individus de més de 40 anys.³ En el grup de malalts coronaris, fins a un 50% de les morts són sobtades³. Malgrat que hi ha també un component genètic important, la malaltia coronària està caracteritzada per ser multifactorial i poligènica, causada per la interacció de molts gens. Essent la malaltia coronària un problema de salut tan important, no és estrany que la recerca en aquest camp hagi estat intensa. Malauradament però, malgrat que la mortalitat cardiovascular ha baixat, la mortalitat per mort sobtada en la malaltia coronària s'ha estabilitzat. La raó més important d'aquesta manca de progrés és que no hi ha hagut les eines per comprendre bé els mecanismes bàsics que desencadenen la inestabilitat elèctrica. Aquest fet s'està solucionant des dels darrers vint anys, amb les noves investigacions dels mecanismes biològics que determinen l'aritmogènesi, especialment gràcies als avenços en la genètica.⁴ El descobriment la base fisiopatològica del potencial d'acció cardíac, de l'automatisme i de les arítmies s'ha vist associat al descobriment de la codificació genètica de molts dels canals iònics, proteïnes que regulen els gradients de voltatge, que són responsables de la generació d'aquesta activitat elèctrica. Aquests descobriments han donat pas al nou camp de les malalties elèctriques familiars, **les canalopaties**. Aquest grup de malalties ens han permès aprofundir no només en els coneixements moleculars de les malalties familiars, sinó també en la comprensió de l'activitat elèctrica cardíaca que causa les arítmies a la població general.

L'ACTIVITAT ELÈCTRICA CARDÍACA.

Una activitat cardíaca coordinada requereix diferents elements. Entre ells es destaquen els canals iònics i *gap junctions*, que permeten la generació de l'activitat elèctrica i la seva transmissió a les cèl·lules veïnes; i les proteïnes estructurals, que mantenen l'estructura cel·lular, generen la força de contracció i la transmeten a la resta de les cèl·lules. ⁵

Canals iònics. Els canals iònics són proteïnes de membrana encarregades de permetre la circulació d'ion a dins i a fora de la cèl·lula. Aquesta circulació iònica es manté seguint un balanç inter i extracel·lular o gradient de voltatge. Les corrents elèctriques generades per la circulació d'ions a través dels canals iònics donen peu al potencial d'acció cardíac, activitat elèctrica imprescindible per a la generació de la contracció sarcomèrica i del miòcit cardíac.

Potencial d'acció. El potencial d'acció és generat per la transferència d' ions, especialment de potassi, calci i sodi. La cèl·lula es despolaritza ràpidament durant la fase 0 del potencial d'acció, durant la qual hi ha una entrada massiva d'ions de sodi a l'interior de la cèl·lula. Això crearà una positivitat (o menor negativitat) de l'interior cel·lular i l'activació dels canals de potassi durant la fase de repolarització. La repolarització és més lenta, i formarà les fases 1, 2 i 3 del potencial d'acció cardíac governada molt especialment pels canals de potassi, sempre d'acord a un gradient de voltatge. A mida que surten aquests ions de potassi, l'interior cel·lular es farà més negatiu i la cèl·lula anirà tornant al seu estat basal. **(FIGURES 1 i 2)**

El potencial d'acció cardíac difereix significativament segons la zona del cor. Això permet que hi hagi característiques elèctriques diferents a les diferents

cèl·lules cardíques. Per exemple, el teixit de conducció té la propietat de despolarització sense cap influència externa. Aquesta característica és anomenada automaticitat. Els nodes sino-atrial i atrio-ventricular contenen cèl·lules marcapàs que tenen una velocitat de despolarització lenta (10-15 V/segon) i també mantenen una despolarització espontània lenta entre potencials d'acció, durant la que hauria de ser la fase de repòs. D'altra banda, els potencials d'acció ventriculars són molt ràpids (200-400 V/segon) i no hi ha etapa de despolarització espontània entre potencials d'acció, sinó que la cèl·lula es manté en repòs fins que és estimulada. Els potencials d'acció auriculars són semblants als ventriculars, però de més curta durada. Els potencials de les fibres de Purkinje són semblants als ventriculars, però tenen capacitat de despolarització espontània.

La formació del potencial d'acció cardíac requerirà doncs un balanç molt ajustat de les diferents corrents elèctriques i canals iònics. En estat basal, el potencial de membrana en el miocardi ventricular és de -85 a -95 mV. Aquest és l'anomenat potencial de repòs de la fase 4, durant la qual la cèl·lula no automàtica està en repòs esperant l'estimulació elèctrica.^{6,7}

FIGURA 1. Ones de potencial d'acció i propagació en el cor humà.

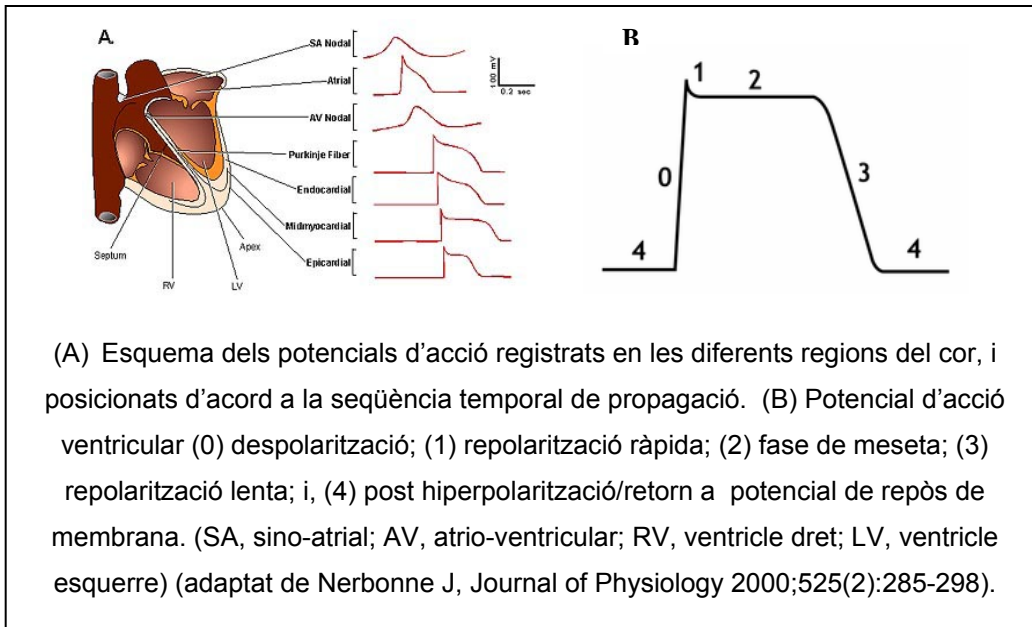
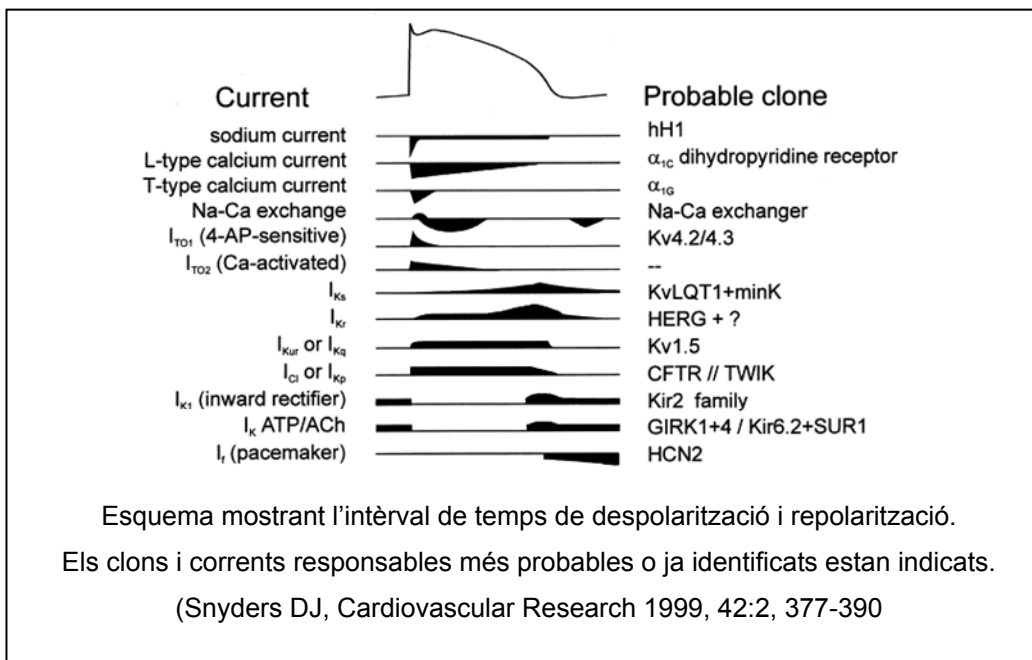


FIGURA 2. Base molecular i iònica del potencial d'acció cardíac.



PREDISPOSICIÓ GENÈTICA I MORT SOBTADA

A mesura que s'avança en la recerca es van descobrir més canals iònics involucrats en el manteniment del gradient de voltatge i en la creació de l'activitat elèctrica. Aquests canals iònics són proteïnes de membrana i per tant vénen codificades per la seqüència del DNA cel·lular. La formació de les proteïnes a partir del DNA és un procés complex on hi ha una transcripció de DNA a RNA, una traducció a aminoàcid i uns canvis posttraduccional que acabaran de formar el canal iònic funcional. Aquest, perquè funcioni, s'haurà d'incorporar a la membrana cel·lular en perfecte estat. Hi ha molt llocs a on la fabricació d'aquesta proteïna pot fallar i afortunadament tenim molts sistemes de correcció dels errors de fabricació. Però és possible que degut a un defecte en la codificació genètica (hereditària o *de novo*) s'alteri la formació de la proteïna i es doni lloc a un canal iònic defectuós. Si aquest defecte és prou important o no és compensat, pot donar lloc a una alteració de l'activitat elèctrica i ser responsable del trencament del balanç iònic intra i extracel·lular. La pèrdua del balanç iònic pot comportar l'aparició d'arítmies malignes i fins i tot mort sobtada. Aquest és el mecanisme bàsic de l'aritmogènesi en les malalties monogèniques o canalopaties.

Hi ha tres línies d'evidència que suggereixen que la genètica juga un paper molt important en la mort sobtada.

- Tal com s'ha dit anteriorment, la mort sobtada cardíaca pot estar causada per **malalties cardiovasculars hereditàries**, incloent les miocardiopaties i les malalties elèctriques primàries.⁸ Mentre que la malaltia coronària és responsable del 80% de les morts, la resta està causada per malalties estructurals no coronàries (miocardiopatia dilatada, hipertròfica i displàsia) o per malalties elèctriques no estructurals (síndrome de QT llarg, síndrome de QT

curt, síndrome de Brugada, taquicàrdia ventricular polimòrfica, etc). Un percentatge alt d'aquests casos tenen un origen genètic i algunes de les alteracions genètiques responsables de la malaltia familiar ja han estat identificades.^{9, 10}

- Hi ha una interacció entre la **genètica i algunes drogues pro-arrítmiques**. No tots els individus que prenen aquests medicaments desenvolupen una arrítmia, per tant es creu que hi ha un component genètic que predisposa alguns dels individus susceptibles a tenir una resposta més accentuada a la droga. En els darrers anys han estat identificats defectes genètics en la síndrome de Brugada o de QT llarg induïts per drogues.^{11, 12}

- El paper que l'herència juga en el risc de mort sobtada en la població general és encara poc conegut. Alguns estudis observacionals epidemiològics han mostrat que la mort sobtada pot agrupar-se a les famílies. L'estudi prospectiu de París, (Paris Prospective Study)¹³ va mostrar que una història de mort sobtada en els pares era un factor de risc per l'aparició de mort sobtada a la família. Un estudi de casos-control per Friedlander et al¹⁴ també va mostrar que la història familiar d'infart de miocardi o mort sobtada era més freqüent en les víctimes de mort sobtada que en els controls.

En aquest tipus de poblacions s'han realitzat estudis genètics preliminars, basats en anàlisis d'associació investigant els paper de variacions genètiques, en els canals iònics¹⁵ i en els receptors adrenèrgics,¹⁶ en el risc de mort sobtada. Malauradament hi ha hagut unes limitacions importants en el disseny d'aquests estudis. Per un costat, pel fet que les poblacions d'estudi són normalment reduïdes; i per l'altre, la manca de definició clara del fenotip. No tots els casos varen rebre autòpsia per a determinar si la mort sobtada era d'origen cardíac. Ambdues limitacions dificulten molt el poder estadístic per a una associació genètica concluent. Aquestes limitacions, però, no han impedit

que s'accepti ja el concepte que hi ha factors genètics predisposants a la mort sobtada en la població general.

PROTEÏNES ASSOCIADES A MORT SOBTADA.

- Al voltant d'un 15 a 19% de les morts sobtades d'origen cardíac estan causades per miocardiopaties (sobretot la miocardiopatia hipertròfica, dilatada i la displàsia aritmogènica del ventricle dret). Aquelles morts que romanen sense definir i que tenen una autòpsia sense patologia estructural són classificades com a fibril·lació ventricular idiopàtica.¹⁷ Les síndromes de mort sobtada genotipades estan causades, en la majoria dels casos, per mutacions en gens que codifiquen tres famílies de proteïnes: sarcomèriques, cito-esquelètiques i canals iònics. Mentre que sempre s'havia pensat que les arítmies familiars en cor estructuralment normal eren causades exclusivament per mutacions en canals iònics, la identificació de mutacions en l'anquirina B¹⁸ i en la caveolina 3,¹⁹ responsables de la localització dels canals iònics, suggereix que les anormalitats en el ritme cardíac també poden estar causades per proteïnes associades als canals iònics. Igualment, les mutacions en les proteïnes sarcomèriques en principi havien estat associades a malaltia hipertròfica²⁰ i les mutacions en proteïnes cito-esquelètiques a malaltia dilatada.²¹ Darrerament s'ha vist però que hi ha un solapament important entre malalties i defectes genètics.

TAULA 1.
Malalties familiars associades amb arítmies i/o mort sobtada.
Alteracions elèctriques

MALALTIA	HERÈNCIA	CROMOSOMA	GEN
Arítmies supraventriculars			
Fibril·lació auricular	Autosòmica dominant	1q21 3p21 10q22 11p15 11q23 12p13 21q22 17q23	GJA5 SCN5A ? KCNQ1 KCNA5 KCNE3 KCNE2 KCNJ2
Alteracions de conducció			
Bloqueig branca familiar	Autosòmica dominant	19q13 3p21	? SCN5A
Arítmies ventriculars			
Síndrome de Brugada	Autosòmica dominant	3p21 3p24	SCN5A GPD1-L
Síndrome de QT curt	Autosòmica dominant	7q35 11p17 17q23	HERG KCNQ1 KCNJ2
Síndrome de QT llarg			
Romano-Ward	Autosòmica dominant	3p21 3p25 4q25 7q35 11p15 11q23 12p13 17q23 21q22 21q22	SCN5A Cav3 Ankyrina B HERG KCNQ1 SCN4B CaV1.2 KCNJ2 MINK MirP1
Jerwell-Lange-Nielsen	Autosòmica recessiva	11p15 21q22	KCNQ1 MINK
Taquicàrdia ventricular catecolaminèrgica	Autosòmica dominant Autosòmica recessiva	1q42 1p13	RYR2 CASQ2

TAULA 2a.

Miocardipaties associades amb arítmies i/o mort sobtada.

Miocardipatia Dilatada i Miocardipatia hipertròfica

MALALTIA	HERÈNCIA	CROMOSOMA	GEN	
Miocardipatia hipertròfica	dominant	1q32 2q24 3p21 3p21 11p11 12q23 14q12 14q1 15q11 15q22 19p13	Troponina T Titina Troponina C Cadena lleugera de la miosina Proteïna C unida a miosina Cadena lleugera de la miosina Miosina beta Actina alfa Miosina alfa Tropomiosina alfa Troponina I	
hipertròfica amb WPW	dominant	7q32	PRKAG2	
Miocardipatia dilatada	dominant	1q32 1q42 2q14 2q24 2q35 3p21 4q12 5q33 6p23 6q22 9q13 10q22 10q22 11q15 11q35 12p12 12q22 14q11 15q11 15q22 17q12 17q21 19q13	Troponina T Actinina alpha ? Titina Desmina Troponina C β -sarcoglicà δ -sarcoglicà Desmoplakina Phospholamban ? Metavinculina Zasp/cypher Proteïna LIM muscular α -cristal·lina ABCC9 Thymopoyetina Miosina beta Actina Tropomiosina alfa T-cap α -sarcoglicà Troponina I	
	Lligada a X	Xp21 Xq28 Xq28	Distrofina Emerina Tafazzina	
Miocardipatia dilatada amb alteracions de conducció	dominant	1q21 3p25	Lamin A/C SCN5A	
Malalties musculars amb miocardipatia dilatada				
Becker Dreifuss	Duchenne- Emery-	Lligades a X	Xp21 Xq28	Distrofina Emerina
	Steinert	Autosòmica dominant	19q13	Mt-PK

TAULA 2b.

Miocardipaties associades amb arítmies i/o mort sobtada.

Displàsia Aritmogènica Ventricle dret

MALALTIA	HERÈNCIA	CROMOSOMA	GEN
Displàsia aritmogènica del ventricle dret	Autosòmica dominant	1q42	RYR2
		2q32	?
		3p23	?
		6q28	Desmoplaquina
		10q22	?
		12p11	Placofilina
		14q11	?
		14q24	TGFb-3
18q12	Desmocolina		
18q12	desmogleina		
Síndrome de Naxos	Autosòmica recessiva	17q21	Placoglobina

LA CORRENT DE SODI I LA MORT SOBTADA

La corrent de sodi (I_{Na}) ha estat estudiat extensivament en els darrers anys. Hi ha molta evidència científica que ha suggerit que aquesta corrent pot modular el risc de mort sobtada en la població general. Aquesta es detalla a continuació:

1- Alteracions genètiques en la corrent causen malalties hereditàries associades a mort sobtada. Els defectes genètics en el canal de sodi SCN5A estan associats a malalties familiars.²²⁻²⁷ Hi ha mutacions que provoquen un augment de la funció de SCN5A i són responsables de la síndrome de QT llarg 3.¹¹ La forma congènita de la síndrome de QT llarg està caracteritzada per la presència d'una prolongació en l'interval QT de l'electrocardiograma i la susceptibilitat a arítmies malignes. L'electrocardiograma mostra la prolongació característica i també alteracions en la forma de l'ona T. Els símptomes (síncop o mort sobtada) estan relacionats amb la presència de *torsades de pointe*, que és una forma de taquicàrdia ventricular polimòrfica. En aquesta malaltia el canal té un defecte que fa que no pugui tancar tan ràpidament com un canal normal; fent que els ions de sodi continuïn entrant a la cèl·lula, allargant el potencial d'acció cardíac. Els pacients amb síndrome de QT llarg tipus 3 normalment presenten símptomes durant el repòs.

Si una mutació produeix una reducció en la quantitat de sodi que entra a la cèl·lula, hi haurà una disminució en la velocitat de conducció de l'impuls. La rapidesa i quantitat de sodi que entra a la cèl·lula és determinant per a definir la velocitat de conducció de l'impuls elèctric a través de les cèl·lules que depenen del sodi (cèl·lules atrials, ventriculars i sistema de Purkinje). Això resultarà en un defecte de conducció que es traduirà en un bloqueig de branca o bloqueig aurículo-ventricular. Així les mutacions que causen una pèrdua de funció poden

donar lloc a la síndrome de Brugada, però també a la malaltia de conducció progressiva²⁸, fibril·lació ventricular idiopàtica²³, malaltia congènita del sinus²⁹ i mort sobtada inexplicada (SUDS)²⁶.

2- Bloquejants de la corrent de sodi I_{Na} són utilitzats per al diagnòstic de malalties aritmogèniques. L'administració de drogues que bloquegen el canal de sodi s'utilitza en l'actualitat per a la identificació d'individus a risc per síndrome de Brugada.^{30, 31}

3- Variacions normals en el gen $SCN5A$, que afecten I_{Na} estan associades a mort sobtada cardíaca. En la població afro-americana, la presència de la variació S1103Y a $SCN5A$ ha estat associat amb un risc augmentat de mort sobtada i de mort sobtada del nadó.¹⁵

4- L'ús de bloquejants del canal de sodi ha estat associat amb mort sobtada en pacients post-infart. L'estudi CAST (Cardíac Arrhythmia Suppression Trial) va mostrar que l'ús d'aquests bloquejants (Encainida, Flecainida) augmentava la mortalitat en els pacients post-infart de miocardi.³²

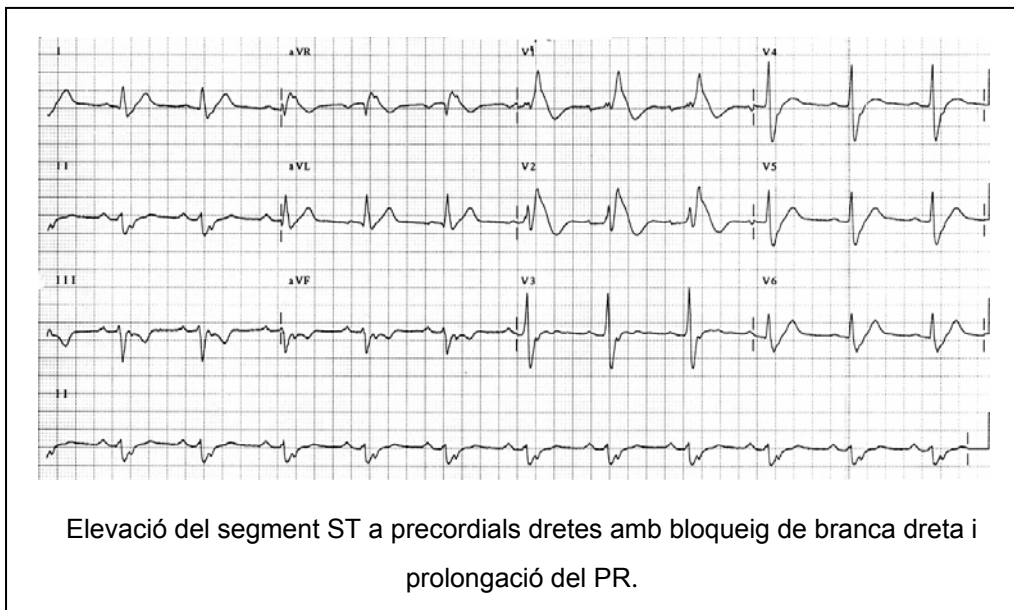
Aquestes dades suggereixen que la corrent de sodi juga un paper molt important en l'aritmogènesi cardíaca, tant en les malalties monogèniques com en el risc de la població general. La conformació molecular de les proteïnes responsable per la corrent i els factors ambientals modificadors poden definir el risc d'un individu de patir mort sobtada. En aquest projecte hem volgut doncs estudiar els factors addicionals que modulen aquest risc. Hem decidit enfocar el projecte cap a l'estudi de la variabilitat genètica i ambiental en una de les malalties monogèniques causada per mutacions a SCN5A, la síndrome de Brugada. Hi ha vàries raons per haver escollit la síndrome de Brugada: el nombre de famílies recollides, que ens permet fer anàlisis més significatives que els que ens permetria una població més reduïda; l'alta incidència de mortalitat en aquesta malaltia; la controvèrsia en l'agressivitat del tractament en els individus asimptomàtics; i la manca de dades significatives en el camp dels modificadors addicionals genètics en les arítmies cardíques.

LA SÍNDROME DE BRUGADA

INTRODUCCIÓ

La mort sobtada cardíaca provoca més de 800.000 morts cada any al món occidental.³ La fibril·lació ventricular idiopàtica (FVI) causa 5 a 9% dels casos extrahospitalaris de mort sobtada no relacionades amb l'infart de miocardi. Una forma de FVI, la síndrome de Brugada (SBr), és freqüent en les morts sobtades en la gent jove. La malaltia va ser descrita originalment a l'any 1992³³ i està caracteritzada per una història de mort sobtada cardíaca causada per taquicàrdia ventricular polimòrfica i/o fibril·lació ventricular sense cardiopatia estructural. Els pacients presenten un patró electrocardiogràfic típic d'elevació del segment ST en derivacions V1 a V3 amb o sense bloqueig de branca dreta. **(FIGURA 3)** La malaltia afecta individus amb una edat mitja de 40 anys, però ha estat lligada a mort sobtada en gent major de 80 anys i també en infants.²⁵

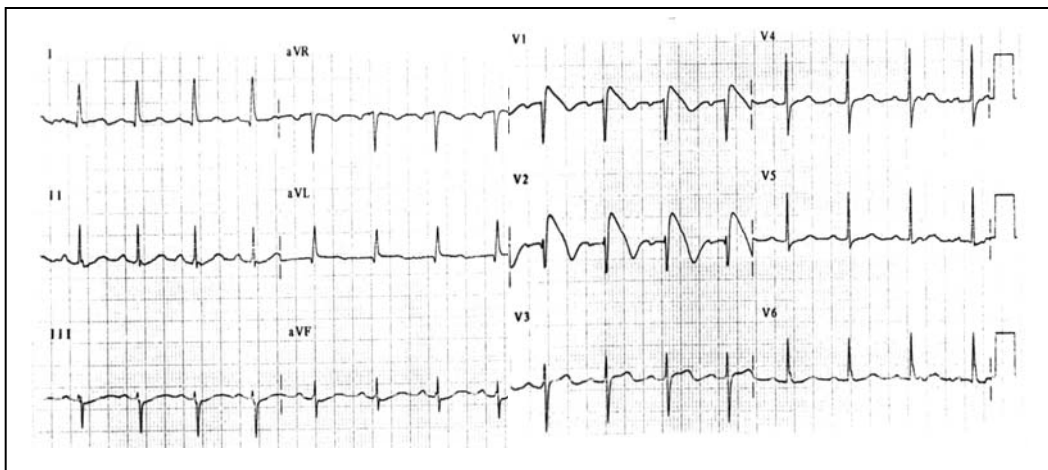
FIGURA 3. Electrocardiograma típic en la síndrome de Brugada.



L'ECG EN LA SÍNDROME DE BRUGADA.

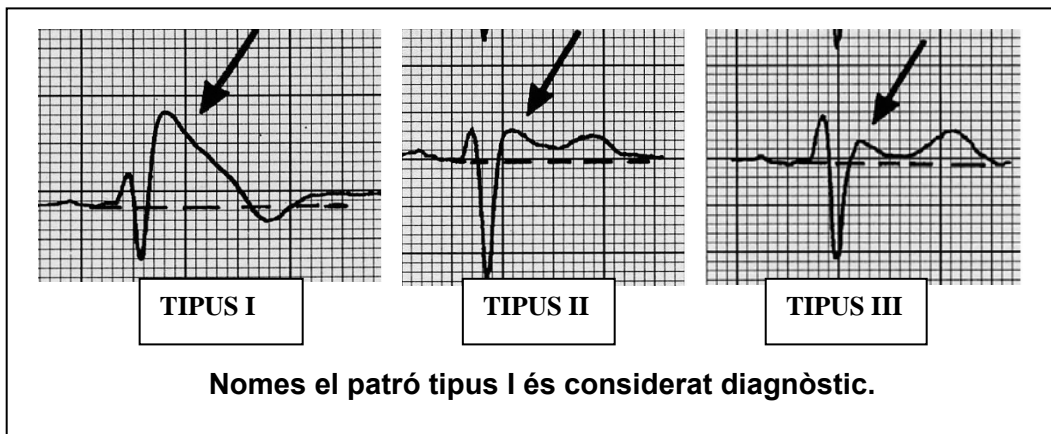
Tal com va ser publicat en el 1992 i en manuscrits subseqüents, la síndrome havia estat originàriament descrita com la malaltia del **bloqueig de branca dreta**, elevació **persistent** de ST a V1-V3 i mort sobtada.³³ Va ser durant les etapes inicials de la descripció quan alguns pacients varen ser exclosos de ser portadors de la malaltia a causa de l'absència d'un o ambdós d'aquests criteris electrocardiogràfics. Les investigacions clíniques posteriors han mostrat que cap dels dos criteris són necessaris per al diagnòstic de la malaltia. Molts pacients han estat identificats sense bloqueig de branca dreta (**FIGURA 4**) i ara és ben conegut que, en un percentatge molt alt d'individus, el signe electrocardiogràfic diagnòstic, l'elevació del segment ST, no és persistent sinó que fins i tot pot normalitzar-se.³⁴ Aquesta normalització de l'electrocardiograma és un aspecte molt important de la malaltia, ja que indica que la síndrome de Brugada ha d'estar sempre en el diagnòstic diferencial d'un pacient que ha patit síncope o aturada cardíaca, malgrat tingui un ECG normal.³⁵

FIGURA 4. Patró electrocardiogràfic sense bloqueig de branca dreta.



A l'any 2000 es va fer una reunió d'experts en la malaltia per a definir-ne els criteris electrocardiogràfics diagnòstics.³⁵ Des de llavors, s'han definit tres patrons electrocardiogràfics (**FIGURA 5**). Només un és però diagnòstic de la malaltia, l'electrocardiograma tipus I, que requereix la presència d'una elevació convexa del segment ST en almenys dues precordials dretes. Aquest segment baixa i continua en una ona T negativa. El tipus II i el tipus III estan caracteritzats per la presència d'una r' i d'elevació del segment ST en les precordials dretes (2 mm en la tipus II i 1 mm en la tipus III), amb una ona T que roman positiva, formant el patró *en cadira de muntar*. Els tipus II i III són classificats com a patrons suggerents, però no diagnòstics de la malaltia. És freqüent veure els patrons II i III en electrocardiogrames de seguiment d'individus que han tingut abans un electrocardiograma tipus I, i també en membres de la família d'un afectat. Amb la presència dels patrons tipus II i III no es pot establir el diagnòstic ja que cal documentar l'electrocardiograma tipus I. El tipus II pot tenir una semblança molt gran amb la repolarització precoç, especialment quan hi ha una ona r' alta. Tanmateix és important no diagnosticar la síndrome de Brugada basant-se només en la presència del patró tipus III en l'individu esporàdic, ja que aquest patró no és infreqüent en individus normals.

FIGURA 5. Patrons electrocardiogràfics en la síndrome de Brugada.



ALTRES CANVIS PRESENTS EN LA SÍNDROME DE BRUGADA.

Hi ha un solapament important entre la síndrome de Brugada i altres malalties aritmogèniques. Així és possible observar prolongació dels intervals QT i PR i bloqueig de branca dreta en alguns individus. Igualment al voltant del 15% dels individus amb la síndrome de Brugada tenen arítmies auriculars.³⁶

MODULADORS DE L'ECG.

Hi ha diversos factors que poden modular el segment ST i poden ajudar a millorar diagnòstic de la malaltia:

Elevació del segment ST durant la fase de recuperació després de l'exercici.

Mentre que l'augment en la freqüència cardíaca durant l'exercici disminuirà l'elevació en el segment ST, just després, durant la fase de recuperació hi haurà un augment del ST altra vegada. Aquest fet està relacionat amb l'augment en el to vagal³⁷. És important notar que l'elevació del segment ST pot comportar l'aparició d'arítmies malignes.

Posició de derivacions precordials.

L'ús d'un espai intercostal més elevat ha estat utilitzat per a la identificació del patró electrocardiogràfic.³⁸ En l'actualitat s'accepta el patró tipus I com a diagnòstic encara que s'utilitzi un espai intercostal més elevat.

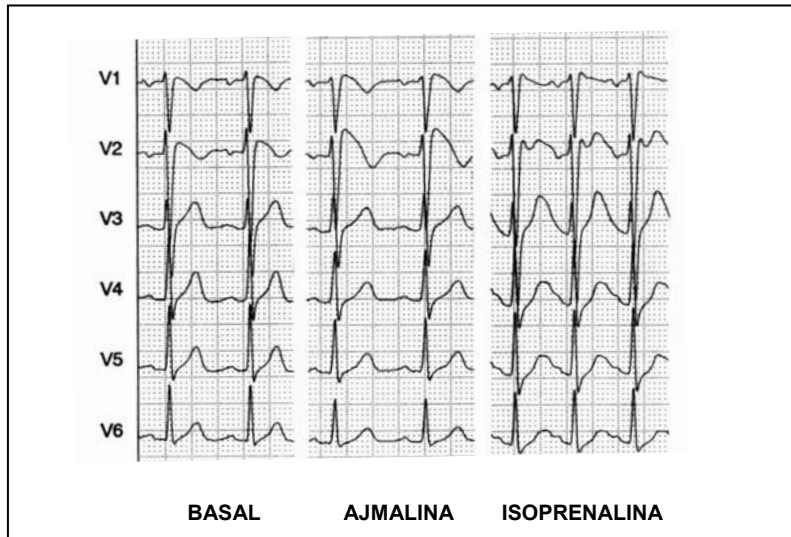
Modificació farmacològica.

- Isoprenalina.

L'efecte de la isoprenalina és similar al de l'exercici. Hi ha un augment de la freqüència cardíaca i descens del segment ST durant la infusió. Aquesta medicació s'utilitza en l'actualitat per a les tempestes elèctriques en els pacients

amb la síndrome, indicant que hi ha una relació entre el descens del segment ST i la disminució d'arítmies.³⁹ (FIGURA 8)

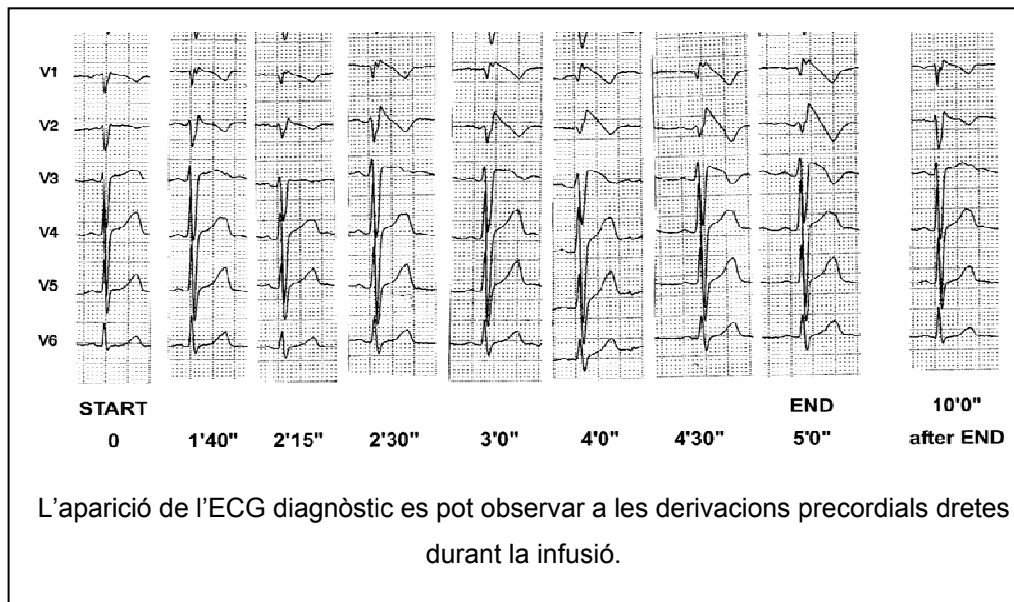
FIGURA 8. Patrons electrocardiogràfics durant la infusió de drogues.



- Bloquejants del canal de sodi.

És ben conegut que hi pot haver una normalització temporal de l'electrocardiograma en un pacient amb la síndrome de Brugada, fet que dificulta el seu diagnòstic. En el 1996 Miyazaki et al. va descriure l'ús de bloquejants de sodi com a moduladors de l'electrocardiograma, i va permetre la identificació de portadors de la malaltia amb l'electrocardiograma temporalment normal³¹. L'ús d'ajmalina i flecainida a Europa, procainamida als Estats Units i pilsicainida al Japó han permès de tenir una prova diagnòstica de la síndrome de Brugada. L'ús dels bloquejants de sodi ha estat acceptat com una eina diagnòstica en la síndrome, i en la reunió dels experts, la conversió de l'electrocardiograma a tipus I mitjançant l'ús dels bloquejants de sodi ha estat definida com a diagnòstica de la malaltia. (FIGURA 9)

FIGURA 9. Modulació de l'electrocardiograma amb la prova d'ajmalina.



DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL DE L'ELEVACIÓ DEL ST A PRECORDIALS DRETES.

Hi ha altres condicions que es poden associar amb una elevació del segment ST a les precordials dretes.⁴⁰ Tal com es discuteix a continuació, alguns d'aquests casos estan associats també a mort sobtada, per tant és possible que el patró electrocardiogràfic sigui un signe d'instabilitat elèctrica i de mort sobtada imminent. **(TAULA 3)**

TAULA 3.

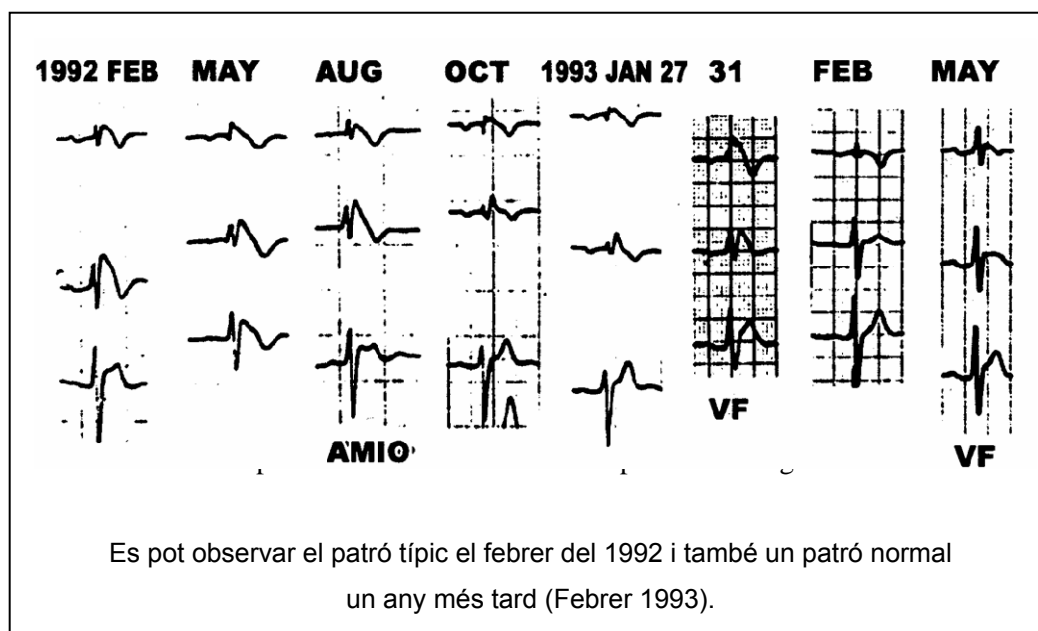
Condicions associades amb elevació de l'ST a precordials dretes.

Bloqueig de branca dreta	antidepressius tricíclics
Infart de miocardi	Distròfia de Duchenne
Miocarditis	Atàxia de Friedreich
Hipotèrmia	Deficiència de tiamina
Infart o isquèmia de ventricle dret	Hipercalcèmia
Aneurisme dissecant d'aorta	Hiperkalièmia
Intoxicació per cocaïna	Displàsia aritmogènica del VD
Embolisme pulmonar agut	Tumor comprimint el VD
Alteracions del sistema nerviós autònom	Repolarització precoç

PREVALENÇA DE LA SÍNDROME DE BRUGADA

La prevalença és difícil de determinar especialment per dues raons: 1) La malaltia no és encara reconeguda arreu doncs ha estat descrita només fa 15 anys. En el futur s'espera un augment significatiu en el nombre de casos identificats, a mesura que el patró electrocardiogràfic es reconegui. 2) L'electrocardiograma és molt canviant, fins al punt que un malalt pot arribar a normalitzar el patró durant el seguiment.⁴¹ És difícil, per tant, en aquesta situació saber si la persona que ve amb símptomes cardíacs pateix la síndrome de Brugada i cal fer proves addicionals. (FIGURA 10)

FIGURA 10. Canvis en l'electrocardiograma en la síndrome de Brugada.



En els darrers anys hi ha hagut un bon nombre d'estudis observacionals per a definir la prevalença del patró electrocardiogràfic:

A) En una població d'Israel amb fibril·lació ventricular idiopàtica es varen identificar 8 individus amb el patró típic però cap en els controls. Es va també trobar una prevalença d'alteracions electrocardiogràfiques menys definides en un 1% dels controls, indicant que per a la diagnòstic l'ECG ha de ser clar.⁴²

B) En un centre mèdic de Nova Orleans es varen examinar més de 55.000 electrocardiogrames. D'aquests n'hi havia 18 que tenien canvis electrocardiogràfics suggerents, però cap complia amb els criteris diagnòstics de la malaltia.⁴³

C) En una població de 3.895 individus que presentaven palpitations, 100 (2.56%) presentaven el patró electrocardiogràfic. D'aquests 21 tenien el patró típic tipus I, i d'aquests, 16 tenien història de síncope, mort sobtada familiar, història de la malaltia a la família. La prevalença del patró electrocardiogràfic era de 2.43% en individus entre 17 i 30 anys i de 0.13% en individus més grans de 30 anys.⁴⁴

D) En la població xinesa sana es va trobar una prevalença de 0.5% amb un patró tipus II i no es va trobar cap individu amb patró I.⁴⁵

E) Estudis a Turquia varen mostrar una prevalença de 0.48% en la població sana, amb 0.8% la prevalença d'ECG tipus I.⁴⁶

F) A Corea, en una població sana es va trobar el patró electrocardiogràfic tipus II en 0.4% dels individus, que augmentava a 1.3% si s'utilitzava un espai intercostal més elevat.⁴⁷

G) Un estudi a França amb més de 35.000 individus va mostrar 6 individus amb l'electrocardiograma tipus I i 14 tenien un electrocardiograma sospitós. Dels 9 que varen consentir a una prova d'ajmalina, 5 varen desenvolupar l'electrocardiograma típic. Per tant la prevalença total en aquella població era de 0.3%.⁴⁸

H) Estudis a Finlàndia han mostrat una prevalença del tipus II en 0.61% sense que hi hagués cap individu amb tipus I.⁴⁹

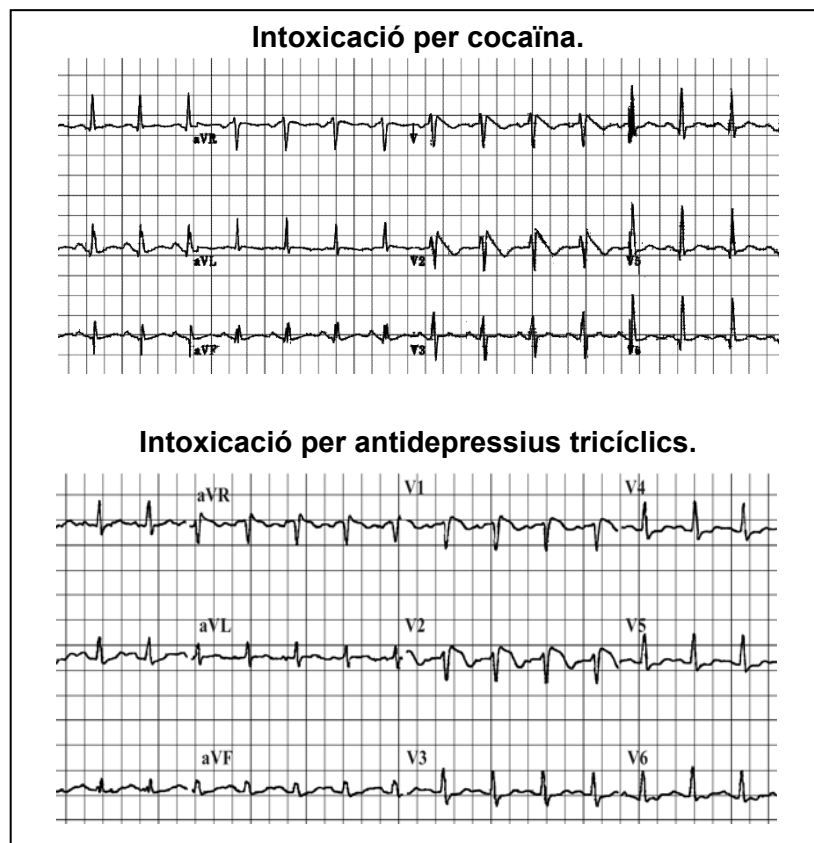
I) S'han fet molts estudis a la població japonesa. Per al tipus I la prevalença va de 0.005%⁵⁰ fins a 0.16%⁵¹⁻⁵⁴ en la comunitat adulta. Només una població juvenil ha estat estudiada, amb una prevalença de 0.0098%.⁵⁵

Tots aquests estudis suggereixen que la síndrome de Brugada es manifesta durant l'època adulta, al voltant dels 40 anys, i que la prevalença és molt baixa en nens. En l'actualitat es creu que la síndrome de Brugada és responsable del 4-12% de totes les morts sobtades i aproximadament del 20% de morts en pacients amb el cor estructuralment normal.⁵⁶ Al món occidental, la prevalença és de 1/5.000 individus. Les dades suggereixen que la síndrome de Brugada és present a tot el món. En llocs endèmics, la síndrome afecta al voltant de 1/2.000 habitants, i en el sud-est asiàtic és una de les causes de mortalitat més importants en homes de 40 anys, segona després dels accidents de cotxe.⁵⁷

FORMES INDUÏDES DE LA SÍNDROME DE BRUGADA.

Ens els darrers anys s'han identificat molts medicaments que poden generar un patró electrocardiogràfic de síndrome de Brugada. Aquests són, en la seva majoria, bloquejants dels canals de sodi, com el antidepressius tricíclics,⁵⁸ alguns anestèsics intravenosos com la bupivacaina,¹² el liti⁵⁹ i la cocaïna.⁶⁰ No es sap encara què significa tenir el patró electrocardiogràfic sota un estímul, però la presència d'arítmies, fins i tot de mort sobtada, en alguns d'aquests individus, fa pensar que és un indicador d'instabilitat elèctrica cardíaca. (FIGURA 11)

FIGURA 11. Exemples de formes induïdes del patró electrocardiogràfic.



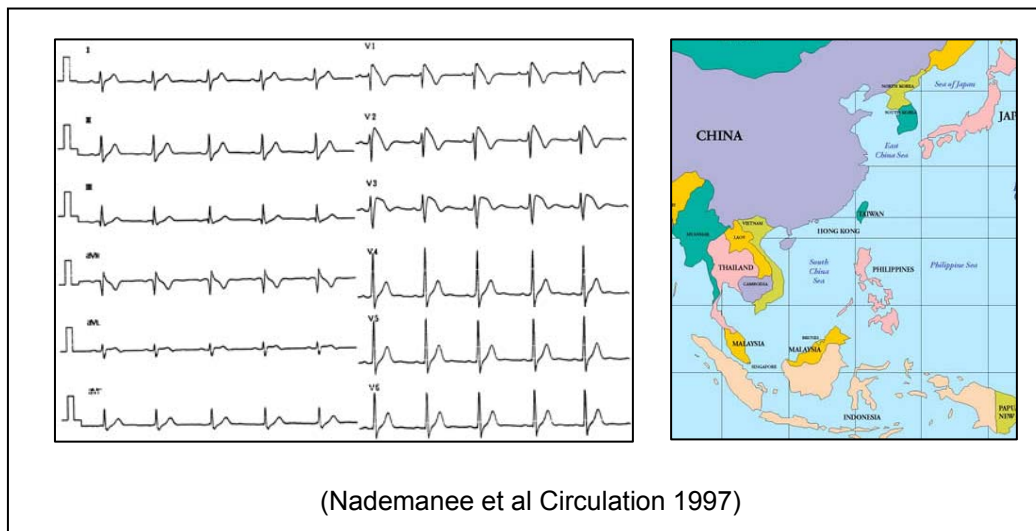
MORT SOBTADA AL SUD-EST ASIÀTIC.

Nombrosos estudis relacionen el que es coneix com a “mort sobtada cardíaca inesperada” amb la síndrome de Brugada. La mort sobtada inesperada al Sudest Asiàtic (SUDS) és una malaltia descrita de fa molts anys^{61, 62}. Hi ha publicacions des de començaments del segle XX que fan referència a la mort sobtada d’homes joves, durant la nit, i en els qui no s’ha descobert una malaltia estructural. La malaltia es coneix com a Pokkuri al Japó,⁶³ Lai-Thai a Tailàndia i Bangungut a les Filipines.⁶¹

En el 1997 Nademanee et al⁵⁷ va investigar aquestes malalties i va descobrir que tenen el mateix patró electrocardiogràfic que en la síndrome de Brugada. Més endavant el nostre grup va mostrar que en molts casos tenen la mateixa base genètica i biofísica i per tant es tracta d’una mateixa malaltia.^{26, 57, 64}

(FIGURA 12)

FIGURA 12. Patró electrocardiogràfic i regió afectada per SUDS.



ASPECTES CLÍNICS DE LA SÍNDROME DE BRUGADA

Història natural de la malaltia.

La presentació típica del malalt és la d'una persona d'uns 40 anys que ha tingut una mort sobtada recuperada i que té una història prèvia d'episodis sincopals causats per taquicàrdies ventriculars polimòrfiques.³³ Durant els primers anys després del descobriment de la malaltia, la majoria dels malalts eren simptomàtics.⁶⁵ En l'actualitat s'identifica cada vegada un nombre més gran de malalts asimptomàtics, gràcies al millor reconeixement de la malaltia per part de la comunitat mèdica i sobretot pels estudis familiars que es duen a terme quan es fa el diagnòstic de la malaltia en un dels membres.³³

Les anàlisis de seguiment dels individus amb la síndrome de Brugada només han estat possibles quan hi ha hagut un nombre suficient de malalts. A l'any 2002 el nostre grup va publicar el seguiment de 667 individus amb el patró electrocardiogràfic.⁶⁶ Aquesta població va mostrar unes dades demogràfiques que s'han mantingut en tots els grups de recerca: 1) l'edat al diagnòstic (edat en la qual es va diagnosticar el primer electrocardiograma anormal) era de 41 ± 15 anys (2 a 85 anys); 2) la població mostrava que la malaltia és més prevalent en homes que en dones (507 i 160 respectivament); i 3) en 344 individus (51.5%) hi havia una sospita de malaltia familiar.

En la nostra població l'ECG basal era anormal en 499 casos (75%) i anormal després de l'administració de bloquejants de sodi en 168 casos. L'estudi electrofisiològic va ser realitzat en 403 individus, dels quals 231 (47%) varen tenir una arítmia ventricular induïda durant l'estimulació programada.

Al seguiment, aquesta població va mostrar que un total de 164 pacients varen presentar almenys un episodi de mort sobtada o fibril·lació ventricular. En totes les categories de pacients (mort sobtada, síncope o asimptomàtic) els homes tenien un pronòstic pitjor que les dones. La probabilitat que un home amb un electrocardiograma espontani anormal i induïble durant l'estudi electrofisiològic, tingués aturada cardíaca o arítmia maligna era de 45.1% (95% CI 37.9-52.5%). A l'altre costat de l'espectre, la probabilitat que una dona amb un electrocardiograma anormal només després de l'ús de bloquejant de sodi, i no induïble tingués arítmia maligna era de 3 % (95% CI 1.3-6.9%). **(FIGURA 13)**

A grans pinzellades les dades han mostrat els resultats següents:

1. Un electrocardiograma diagnòstic de síndrome de Brugada és un marcador de mort sobtada. De tots els individus de la nostra sèrie, 25% han patit mort sobtada o fibril·lació ventricular documentada en algun moment de la seva vida. Amb una mitjana d'edat de 41 anys, la incidència de mort sobtada (recuperada o no) és clarament superior a la mitjana en la població general.

2. El gènere masculí és un factor de risc per mort sobtada. En totes les categories estudiades, els homes tenen un risc més alt que les dones.

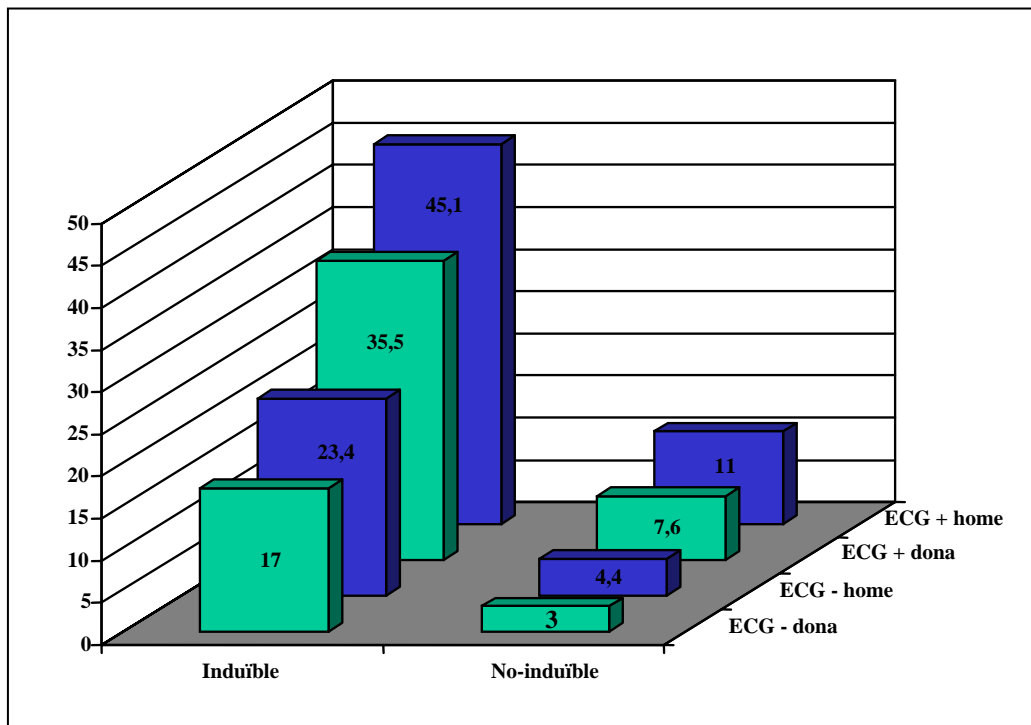
3. La inducibilitat d'arítmies ventriculars és el factor pronòstic més significatiu. Malgrat que la inducibilitat és un tema amb molta controvèrsia entre els diferents investigadors, en la nostra sèrie de pacients l'estimulació ventricular programada continua essent la prova amb més valor pronòstic. Els pacients induïbles tenen un risc quatre vegades més alt de mort sobtada que els no induïbles. Per altra banda, l'interval H-V no té cap significat pronòstic en els nostres pacients, una observació que contrasta amb estudis previs.⁶⁶

4. Les formes familiars no tenen un pronòstic pitjor que les no familiars. Una història familiar de síndrome de Brugada no prediu un pronòstic pitjor. Aquestes observacions han estat també confirmades anteriorment i per altres investigadors.⁶⁷

5. Els individus amb un electrocardiograma basal anormal tenen un pronòstic pitjor que aquells que necessiten bloquejants de sodi. Els individus amb un electrocardiograma basal anormal tenen el doble de risc de desenvolupar arítmies durant la seva vida que els individus que necessiten bloquejants de sodi per a desemmascarar el patró electrocardiogràfic. ⁶⁸

En conclusió doncs, els individus amb un electrocardiograma diagnòstic de síndrome de Brugada tenen una probabilitat de 25% de tenir arítmies malignes durant la seva vida. Aquesta probabilitat augmenta a 45% quan l'afectat és home, té electrocardiograma basal anormal i és induïble a l'estudi electrofisiològic. **(FIGURA 13)**

FIGURA 13. Probabilitat de mort sobtada. Individus amb un electrocardiograma de síndrome de Brugada.



Individus sense mort sobtada prèvia.

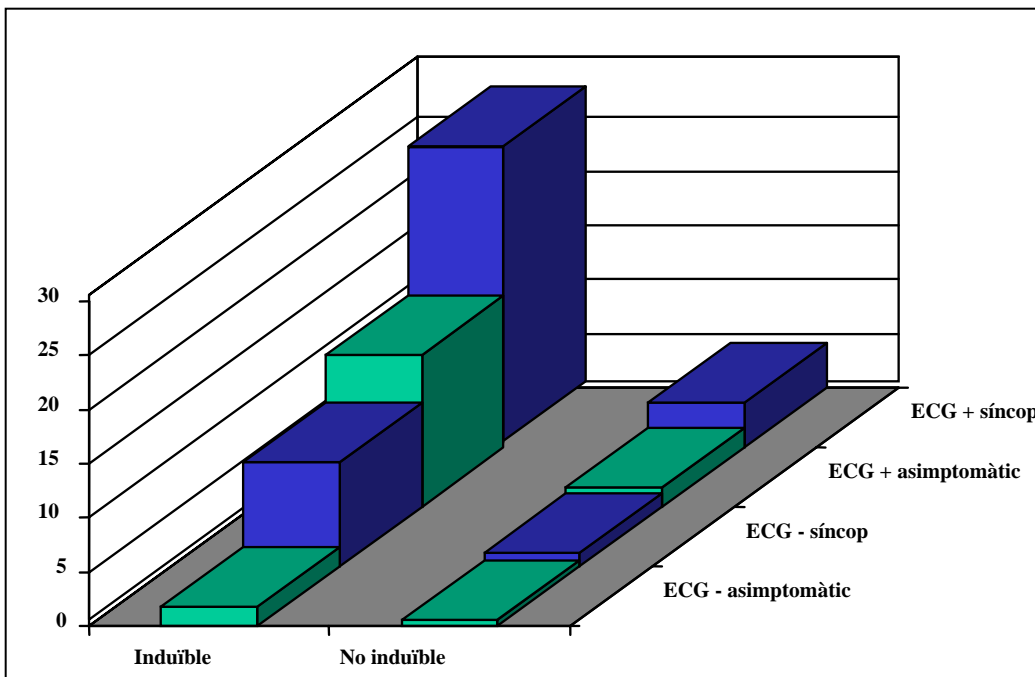
No hi ha gaire dubtes de com s'ha de tractar un individu amb història de mort sobtada (recuperada). Tots els investigadors estan d'acord que aquests individus han de ser protegits amb la implantació d'un desfibril·lador. Però hi ha molt controvèrsia en si s'ha de ser gaire agressiu amb l'individu asimptomàtic. Hi ha actituds diferents davant l'individu asimptomàtic amb un patró tipus I. S'ha de partir de la premissa que els asimptomàtics també tenen un risc (per mínim que sigui) de mort sobtada; tots els malalts simptomàtics han estat asimptomàtics durant molts anys, fins el primer símptoma. La qüestió més important, doncs, no és si els asimptomàtics poden esdevenir simptomàtics, sinó quins d'ells n'esdevindran i quins són els paràmetres clínics que s'han d'utilitzar per a identificar-los. Alguns grups consideren que el risc de mort sobtada en l'asimptomàtic és tan baix que només s'ha de fer un seguiment, d'altres que s'ha d'esperar fins que l'individu faci un síncope. Aquests són models vàlids, però s'ha de tenir en compte que el primer símptoma pot ser també la mort sobtada.

El nostre grup ha defensat sempre l'ús de l'estudi electrofisiològic per a determinar el risc i per decidir la implantació d'un desfibril·lador. Vàrem analitzar les dades en 547 individus asimptomàtics amb un electrocardiograma compatible amb el de síndrome de Brugada. Cap d'ells havia tingut arítmia cardíaca quan l'electrocardiograma havia estat realitzat. L'electrocardiograma anormal va ser identificat durant l'estudi per síncope de causa desconeguda en 124 individus, durant un estudi electrocardiogràfic de rutina en 170 individus i durant un estudi de membres de la família en 253 individus. Hi havia un predomini d'homes (408 i 139). 302 pacients presentaven una història familiar de mort sobtada. L'ECG basal era anormal en 391 casos i anormal després de l'administració de bloquejants de sodi en 156 pacients. Durant l'estudi

electrofisiològic, 163 dels 408 pacients varen ser induïbles a arítmies ventriculars.⁶⁹

Amb un seguiment de 24±33 mesos hi va haver 44 episodis de mort sobtada o de fibril·lació ventricular en el grup de 547 pacients (8%). La presència d'un episodi previ de síncope, un electrocardiograma basal anormal, la inducibilitat a l'estudi electrofisiològic i el gènere masculí eren de nou predictius d'esdeveniments.⁶⁹ (FIGURA 14)

FIGURA 14. Probabilitat de mort sobtada.
Individus amb un electrocardiograma de síndrome de Brugada
sense mort sobtada prèvia.



Individus esporàdics.

El grup que dóna més dubtes terapèutics és el dels individus esporàdics. Aquests són individus que han estat diagnosticats amb un ECG fet durant una prova de rutina, sigui per raons professionals, raons d'assegurança o de cribatge de salut. Aquests individus esporàdics per tant no tenen cap història prèvia de símptomes cardiovasculars. Tampoc tenen cap història familiar de síncope o de mort sobtada. Vàrem recollir 167 casos esporàdics amb un electrocardiograma tipus I. En aquests grup de malalts durant un seguiment de 3 anys hi va haver 11 esdeveniments, indicant una incidència total de 6% o de 2% per any. Tenint en compte que aquests individus tenen una edat mitjana de 40 anys sense patologia cardíaca estructural i altrament en un bon estat de salut, aquest és un percentatge molt elevat.

Dels 11 individus que varen tenir un esdeveniment, 5 varen morir i 6 foren recuperats de fibril·lació ventricular. L'únic factor predictiu d'esdeveniments va ser la inducibilitat durant l'estudi electrofisiològic i l'únic factor que va predir la mort sobtada en els 5 individus va ser el no haver fet l'estudi electrofisiològic. Aquests 5 malalts no varen ser estratificats, no varen rebre la implantació d'un desfibril·lador, i per tant varen morir durant l'arítmia maligna. **(TAULA 4)**⁶⁹

TAULA 4.

Seguiment (3 anys) de 167 casos esporàdics amb síndrome de Brugada

	Induïble (36)	No Induïble (89)	Estudi EP no fet (42)
Fib Ventricular	6 (16.7%)	0 (0%)	0 (0%)
Mort sobtada	0 (0%)	0 (0%)	5 (11.9%)

ASPECTES BÀSICS DE LA SÍNDROME DE BRUGADA.

L'evidència clínica i experimental ha suggerit dues hipòtesis per a explicar els mecanismes fisiopatològics en la síndrome de Brugada.

Hipòtesi de Repolarització. Durant els primers anys de la descripció de la malaltia, la síndrome de Brugada ha estat considerada una malaltia de la repolarització, amb una alteració en el balanç iònic a favor de de la corrent de potassi Ito (*transient outward current*) en l'epicardi del ventricle dret, responsable de la generació d'un gradient transmural de repolarització que crea el medi necessari per desencadenar arítmies malignes^{70, 71}. Hi ha varis factors que indiquen que aquest balanç podria ser crític en la malaltia.

a- Bloquejants dels canals de sodi que accentuen el balanç a favor de Ito quan disminueixen el corrent de sodi. Aquests bloquejants agreugen l'elevació del segment ST en l'electrocardiograma de superfície.⁷⁰ Aquesta és una troballa que té traducció clínica, ja que bloquejants de sodi com l'ajmalina i la procainamida són utilitzats en l'actualitat per a identificar els individus a risc de patir la malaltia.³⁰

b- L'ús de la quinidina, un antiarítmic de classe IA amb acció de bloquejant dels corrents de repolarització, s'ha mostrat que pot normalitzar l'elevació del segment ST. Aquesta és una dada que té correlació clínica també, ja que la quinidina és utilitzada per tractar els malalts que tenen molts xocs.⁷²⁻⁷⁵ Aquestes dades indiquen doncs que el desenvolupament del patró electrocardiogràfic i de les arítmies està lligada a una alteració en el balanç Na/K ventricular a favor del corrent Ito durant la fase 1 del potencial d'acció.

Hipòtesis de despolarització. Hi ha dades que suggereixen que hi ha un important component de despolarització en la síndrome de Brugada, amb un enlentiment de la conducció en el tracte de sortida del ventricle dret com a fet

central de la malaltia. Aquesta hipòtesi ve recolzada per la presència d'enlentiment de la conducció en malalts amb una malaltia molt severa.⁷⁶

Així doncs, les dades experimentals donen suport a la hipòtesi que la disminució en el corrent de sodi és responsable del fenotip de la síndrome de Brugada, segurament relacionat amb una alteració en el balanç despolarització/repolarització. Les dades genètiques, exposades a continuació, també han confirmat aquestes hipòtesis.

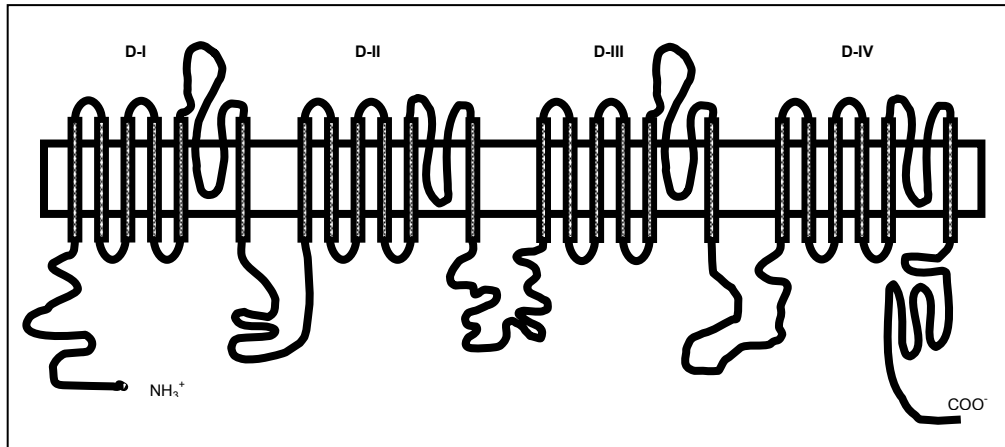
GENÈTICA DE LA SÍNDROME DE BRUGADA

Alguns casos de la síndrome de Brugada estan genèticament determinats. La malaltia segueix un patró genètic autosòmic dominant. A l'any 1998 el nostre grup va identificar el primer gen causant de la malaltia, el gen SCN5A, la subunitat alfa del canal de sodi, responsable de la fase 0 del potencial d'acció cardíac.²³ S'han descobert al voltant de 100 mutacions fins al moment. SCN5A és responsable d'aproximadament 20-25% dels casos de la malaltia.²³

El canal de sodi: SCN5A codifica la subunitat α del canal de sodi cardíac. La proteïna conté quatre repeticions internes, cadascuna amb 5 segments hidrofòbics (S1, S2, S3, S5, S6) i un segment carregat positivament (S4). Els segments S4 són probablement els sensors de voltatge i estan caracteritzats per tenir aminoàcids positius a cada tercera posició. Aquesta proteïna regula la permeabilitat d'ions de sodi a les membranes excitable.⁷⁷ Quan assumeix conformacions obertes o tancades responent a diferències de voltatge a través de la membrana, la proteïna forma un canal de sodi selectiu, pel qual els ions de sodi circulen d'acord a gradients electromecànics. La seqüència genòmica del canal de sodi conté més de 100 kilobases i 28 exons.⁷⁸ La proteïna s'expressa en el múscul auricular i ventricular però no en el múscul esquelètic,

al cervell, al fetge o la melsa. L'expressió en les cèl·lules neurocardíques parasimpàtiques ha estat descobert recentment.⁷⁹ Malgrat que la funció en aquestes cèl·lules no és encara coneguda, s'especula que podrien participar en el control autòmic. (FIGURA 15)

FIGURA 15.
Subunitat alfa del canal de sodi cardíac, SCN5A.



Efectes patofisiològics de les mutacions:

Una tercera part de les mutacions presents a la síndrome de Brugada han estat estudiades en sistemes d'expressió, pel que s'ha mostrat una pèrdua de funció per: 1) un defecte de trànsit de la proteïna, que no pot arribar a la membrana;⁸⁰⁻
⁸² 2) un trencament prematur de la proteïna degut a que la mutació codifica per un codó d'stop; 3) entrada del canal de sodi dins d'un estat intermedi d'inactivació des del qual el canal es recupera més a poc a poc; i 4) inactivació accelerada del canal de sodi. Aquest últim mecanisme inclou un tancament prematur del canal de sodi, a temperatures fisiològiques però no a temperatures ambientals, suggerint que els pacients amb síndrome de Brugada poden veure incrementat el seu risc durant estats febrils.⁸³ Aquest fet té una clara correlació clínica, ja que s'ha observat l'aparició d'arítmies durant episodis febrils en els malalts que tenen el patró electrocardiogràfic.⁸⁴⁻⁸⁷

HIPÒTESI

El fenotip de la síndrome de Brugada ve determinat per factors genètics i ambientals.

OBJECTIUS

- **Identificar les famílies amb base genètica a canal de sodi.**
- **Realitzar correlacions fenotip-genotip en els portadors de mutacions.**
- **Identificar factors externs i genètics addicionals que poden influenciar el fenotip.**

EL PERQUÈ DELS ESTUDIS PROPOSATS

Variació en el fenotip de la síndrome de Brugada. Hi ha una variabilitat important en el fenotip de les arítmies congènites. En la síndrome de Brugada, en la qual l'únic tractament possible és la implantació d'un desfibril·lador, aquesta variabilitat ha estat motiu d'important controvèrsia, sobretot en el tractament, pronòstic i estratificació dels individus asimptomàtics.

Algunes de les dades que apunten a un efecte de la genètica en el fenotip són exposades seguidament:

a) Els pacients simptomàtics tenen un risc molt alt de recurrència. Els pacients simptomàtics amb documentació de fibril·lació ventricular tenen un risc de 50% de tenir un altra aturada cardíaca al llarg de la seva vida.^{66, 88} No se sap què determina que un individu es pugui mantenir asimptomàtic, però creiem que hi ha una combinació de factors genètics i externs.

b) Els portadors genètics amb electrocardiograma basal normal tenen un bon pronòstic.⁶⁶ No se sap si aquests són individus que tenen una estructura genètica que els dona menys predisposició a l'elevació del segment ST i a les arítmies.

c) Hi ha individus que tenen una resposta fals-negativa als bloquejants de canal de sodi. Hi ha molts fàrmacs, bloquejants de sodi, que són utilitzats per al diagnòstic de la síndrome de Brugada³⁰ però hi ha un 20% de falsos negatius (individus amb la mutació que no tenen una prova d'ajmalina positiva). És possible que aquests tinguin uns modificadors genètics que determinin la seva resposta als bloquejants i a la clínica.

d) Hi ha solapament de fenotips. Des de la descripció de la síndrome de Brugada s'han trobat important solapament amb altres malalties aritmogèniques,^{23, 28, 89} especialment amb la malaltia progressiva de la

conducció, amb la síndrome de QT llarg i amb arítmies auriculars.^{90, 91} La variabilitat en l'expressivitat d'una mateixa mutació continua força inexplicada i s'ha suggerit una influència de factors genètics i externs.

e) La presència de variacions addicionals a SCN5A pot determinar el fenotip. Varis estudis biofísics han mostrat que els polimorfismes normals en el gen poden modificar la corrent de sodi.^{82, 92-95} Es creu que l'efecte d'aquests polimorfismes en la funció del canal de sodi és multifactorial, des d'un efecte biofísic directe a una afectació en el transport del canal de sodi a la membrana.

En resum, les dades han mostrat que en la síndrome de Brugada hi ha una heterogeneïtat important en les característiques clíniques i bàsiques. Fins i tot en el cas més clar, la pèrdua completa d'un al·lel degut a una mutació que trunca la proteïna, hi ha una àmplia variabilitat clínica entre els familiars portadors del defecte. En aquest projecte hem decidit fer una investigació de factors genètics i ambientals que puguin determinar el risc de patir una malaltia més severa en els individus i famílies amb la síndrome causada per mutacions en el canal de sodi.

MATERIAL I MÈTODES

MÈTODES CLÍNICS

1- Diagnòstic electrocardiogràfic.

El diagnòstic de la síndrome de Brugada es basa en la presència dels criteris electrocardiogràfics que defineixen el fenotip, i determinats en la reunió d'experts del 2000³⁵. Considerem un electrocardiograma com a positiu i diagnòstic si hi ha una r' terminal amb una elevació del punt J > 0.2 mV amb un segment ST descendent que continua amb una ona T negativa o isoelèctrica en les derivacions V1, V2 i a vegades V3. Aquest tipus d'electrocardiograma és conegut com "*coved-type*" i és l'únic que es considera diagnòstic per a la síndrome. Hi ha dues varietats "*saddle-back-type*" que són sospitoses però que no són diagnòstiques com s'ha explicat anteriorment. L'electrocardiograma és també considerat diagnòstic si després del test d'ajmalina hi ha una r' terminal amb una elevació del punt J > 0.2 mV amb un segment ST descendent que continua amb una ona T negativa o isoelèctrica en les derivacions precordials dretes.

2- Exclusions diagnòstiques.

S'exclou del diagnòstic el pacient que presenta malaltia estructural cardíaca documentada mitjançant mètodes no invasius (ecocardiograma, prova d'esforç, estudis nuclears, ressonància magnètica) i mètodes invasius (angiograma, coronariografia, biòpsia).

3- Altres mesures a l'ECG.

- a- Bloqueig auriculoventricular de primer grau es defineix com una prolongació de l'interval PR de més de 200 ms.
- b- Bloqueig de branca dreta es defineix com la presència d'una prolongació del complex QRS de ≥ 120 ms, *rsr'*, *rsR'* or *rSR'* a V1 i/o V2 i ones S

amples i profundes en les precordial sesquerres i una ona R normal a V5 i V6, però ≥ 50 ms a V1.

c- Bloqueig incomplet de branca dreta es defineix com la presència d'un patró rSR' a V1 i/o V2 i un complex QRS de menys de 120 ms.

d- Tp-Te es defineix com el temps en ms. des del pic fins a la fi de l'ona T.

4- Estudi electrofisiològic.

L'estudi electrofisiològic inclou tant les mesures d'interval·ls de conducció basals així com l'estimulació programada. Vàrem utilitzar el protocol més senzill, amb una sola zona d'estimulació (àpex ventric·le dret), tres cicles basals d'estimulació (600, 500 i 430 ms.) i inducció de 1, 2 i 3 extrasístoles ventriculars fins a un mínim de 200 ms. El pacient és considerat positiu si s'indueixen arítmies ventriculars sostingudes (fibril·lació ventricular, taquicàrdia ventricular polimòrfica o monomòrfica) de més de 30 segons o que requereixen intervenció urgent.

5- Prova d'ajmalina.

La prova d'ajmalina es realitza sota monitorització electrocardiogràfica i en una sala equipada amb capacitat per a reanimació cardiopulmonar. La possibilitat d'una complicació arítmica important durant la prova és baixa, però no nul·la. Es dona un bolus d'ajmalina durant 5 minuts (1 mg/kg) i es fan electrocardiogrames seriats. L'ajmalina té una vida mitja molt curta i per tant al cap de cinc minuts d'haver acabat la infusió, l'electrocardiograma ja es normalitza. L'ajmalina no és disponible arreu. A l'Amèrica del Nord s'utilitza procainamida i al Japó s'utilitza pilsicainida. En l'actualitat és freqüent observar l'ús de flecainida o propafenona oral. No està clar però quina és la sensibilitat de la prova oral. Per a investigar la validesa de la prova en el diagnòstic dels

portadors de mutacions al canal de sodi (estudi genotip-fenotip) només es va utilitzar ajmalina, considerada la droga més potent per al diagnòstic de la síndrome de Brugada.

6- Mètodes estadístics.

Les dades foren analitzades amb *unpaired t test* i es va considerar significatiu un valor de $P < 0.05$. El significat estadístic de la comparació de la incidència de bloqueig de primer grau, bloqueig complet i incomplet de branca dreta entre portadors i no portadors de mutacions al canal de sodi es va calcular amb el *xi quadrat de Pearson*. El significat de la diferència de PR, QTc, elevació ST, i Tp-Te entre els grups de malalts va ser calculat amb ANOVA amb el test Scheffe per anàlisi post hoc. Quan aplicable les dades són presentades com a mitjana \pm una desviació estàndard.

MÈTODES GENÈTICS

1- Recrutament d'individus i de famílies.

Els casos foren recollits a partir de la comunicació directa amb els metges i malalts. A part de fer una anamnesi del malalt, es va demanar la història familiar així com també una còpia de les proves complementàries que se'ls havien fet. Molts dels pacients ens havien contactat directament per Internet o per correu electrònic i continuen en contacte amb nosaltres per al seu seguiment a llarg terme.

En els darrers 15 anys s'ha desenvolupat una base de dades clínic-genètica, recollint-se 1230 casos índex de síndrome de Brugada amb electrocardiograma tipus 1. S'ha obtingut sang de 4226 individus, corresponent a 726 famílies. La majoria de les mostres corresponen a pacients de la societat occidental (Europa i Amèrica).

2- Recollida de sang.

Es va demanar consentiment informat per a la realització d'estudis genètics, tant als malalts com als familiars que varen participar. Després de l'avaluació clínic de les seves dades, es va recollir una mostra de sang, que va ser enviada directament al laboratori per a l'extracció d'ADN. Les mostres foren denominades i es va assignar un número identificatiu únic.

3- Aïllament de DNA.

El DNA és aïllat utilitzant el sistema *Puregene (Gentra)* sota campana biològica. Breument, les cèl·lules són lisades i la proteïna precipitada, deixant el DNA a punt per a la precipitació amb isopropanol. El DNA és hidratat amb solució

d'hidratació i mesurat amb espectrofotometria per a valorar-ne la quantitat i la qualitat.

4- Transformació limfoblàstica.

Per cada família s'obté una línia cel·lular permanent d'un pacient per a una possible anàlisi de RNA. Les línies són establertes utilitzant virus d'*Epstein-Barr* i ciclosporina A.

5- Amplificació de RNA per anàlisi de *splicing*.

Es va extreure el RNA de les cèl·lules limfoblàstiques utilitzant *RNAeasy* (*Qiagen*). Per a l'amplificació de la regió d'interès, es varen dissenyar dos sets de sondes: 1)Exó23: GTGGTGGTCAATGCCCTG i CATGTTGATGAGGCTTATCTG; 2)Exó27: GGCTTCATATTCGACATTGTGAC i GCAGCAGCCCGATGTTGAAGAGG. La transcripció inversa va ser feta mitjançant *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen).

6- Seqüenciació directa.

Els exons de SCN5A van ser amplificats mitjançant la tècnica de PCR. Els productes van ser purificats amb Exosap (USB Corporation) i directament seqüenciats en ambdues direccions utilitzant el BigDye Terminator (applied biosystems, ABI) en una màquina 3100 o 3130 de ABI. L'anàlisi genètica a SCN5A es va realitzar amb seqüenciació dels exons i les zones intró-exó. La fase cromosòmica va ser establerta analitzant la segregació de variacions en els pares. Tots els membres de la família portadors d'una mutació en el canal de sodi varen ser analitzats per a detectar la presència de polimorfismes funcionals. De moment, dos polimorfismes funcionals han estat descrits en la literatura: R1193Q, en els japonesos i H558R, present en un 20% de la població caucàsica.

Vàrem decidir utilitzar la tecnologia de seqüenciació en comptes de les tècniques de SSCP (single stranded conformation polymorphism) o DHPLC (Denaturing high Pressure liquid chromatography). El motiu és que les tècniques de SSCP i DHPLC, basades en la detecció de diferències en el patró electroforètic entre l'al·lel mutat i el normal, segurament no detectaria una mutació homozigòtica ja que el patró electroforètic romandria idèntic entre els dos al·lells. Tenint en compte que les mutacions homozigòtiques han estat descrites com causants de formes severes de malalties congènites (síndrome de QT llarg recessiva o Jervell-Lange Nielsen) vàrem creure que una tècnica que no ens permetés diagnosticar genèticament els casos més severes aniria en detriment del projecte. A més a més, la sensibilitat de la tecnologia de separació electroforètica de SSCP o DHPLC és menor que la de seqüenciació. Com que només al voltant d'un 20-25 % dels casos de síndrome de Brugada estan causats per mutacions a SCN5A, vàrem creure que la utilització d'una tècnica menys sensible aniria també en detriment del projecte. L'anàlisi de la seqüència ha estat fet de forma automàtica amb *Sequencing Analysis*, *Sequencher* i *Seqscape* i verificat de forma manual.

7- Definició de mutació/variació.

Després de la identificació d'una variació a SCN5A, aquesta es definiria com a mutació si no estava present en 600 al·lells controls. Aquests controls, del mateix origen ètnic, són individus sense patologia cardíaca.

8- Equipament.

Per a la PCR es va utilitzar *Mastercycler* (Eppendorf) amb capacitat per a l'amplificació de 96 o 384 mostres. La seqüenciació va ser feta utilitzant dues seqüenciadores de capil·lars ABI3130 i ABI3100 (Applied Biosystems, CA, USA).

9- Anàlisis estadístiques genètiques

El primer pas en l'estudi de la base genètica d'un fenotip és determinar si hi ha o no agregació familiar del fenotip. La presència de l'agregació familiar es demostra per l'existència més alta d'un tret o malaltia dins la família comparat amb la resta de la població. El poder de detectar un gen que afecta un tret quantitatiu depèn de la seva contribució a l'augment en el risc i la variació total d'aquesta característica. El poder per a detectar l'agregació entre la malaltia i el lloc de la susceptibilitat depèn de la seva contribució a l'augment del risc entre els familiars comparat amb la resta de població.

Després que un tret s'hagi demostrat en les famílies, el següent pas és quantificar la contribució dels factors genètics de l'agregació familiar, és a dir avaluar l'heretabilitat.

Hi ha diferents mètodes per a identificar els gens que contribueixen als fenotips, però en el nostre projecte n'hem utilitzant especialment dos: 1) l'anàlisi de lligam, utilitzat en la primera fase per determinar si el fenotip de la família estava lligada al cromosoma 3, a on hi ha el SCN5A; i 2) l'anàlisi d'associació, per determinar els factors modificadors genètics en els portadors de mutacions en el canal de sodi.

Els **estudis de lligam genètic** busquen demostrar una co-segregació d'uns al·lels d'un locus definits per marcadors amb un fenotip determinat. Es busca un segment cromosòmic (locus) que co-segregui amb el fenotip més freqüentment del que un esperaria a l'atzar. Es considera que dos marcadors polimòrfics estan lligats si la freqüència de recombinació és menor del 50%. El lligam genètic és una anàlisi estadística que genera un resultat anomenat LOD (logaritma d'odds). És una mesura de la probabilitat que dos marcadors (o una malaltia i el marcador) estan de fet lligats genèticament. Un LOD de 3 o més és considerat significatiu per a lligam genètic i un LOD de menys de -2 és

considerat que exclou el lligam genètic. Els resultats de LOD són calculats a varies distàncies entre marcadors. Els marcadors en un locus es poden agrupar en haplotips, que ens permeten deduir la segregació d'una porció del cromosoma a través de les generacions de les famílies. Si aquesta porció està present en tots els afectats i hi ha un nombre suficient d'individus per a tenir un valor estadístic suficient (LOD 3), es pot deduir que en aquella porció cromosòmica (o locus) hi ha el gen que causa la malaltia. Com més membres afectats hi hagi en la família, més probable és que la porció cromosòmica que comparteixen sigui més petita, (més recombinació genètica) i per tant que es pugui localitzar el gen més fàcilment.

L'objectiu final del lligam genètic i l'haplotip és doncs definir els intervals de recombinació més petits a on es troba el gen responsable de la malaltia, fent possible la realització d'una anàlisi de la seqüència del DNA per trobar la variació causal del fenotip (o mutació).

10- Estratègia general per a l'anàlisi genètica.

En el nostre projecte vàrem adoptar una estratègia combinada de estudis de lligam amb seqüenciació directa del gen. Si la família era prou gran primer vàrem utilitzar una anàlisi d'haplotips en el locus que conté SCN5A. Vàrem utilitzar cinc marcadors informatius que voregen el locus. Aquests marcadors són microsatèl·lits amb una alta informació genètica (D3S3659, D3S1609, D3S3567, D3S1277, D3S3521). Si la família estava lligada a SCN5A procedíem a la seqüenciació directa del gen. En les famílies petites o amb pocs afectats procedíem a la seqüenciació sense anàlisi de lligament.

RESULTATS

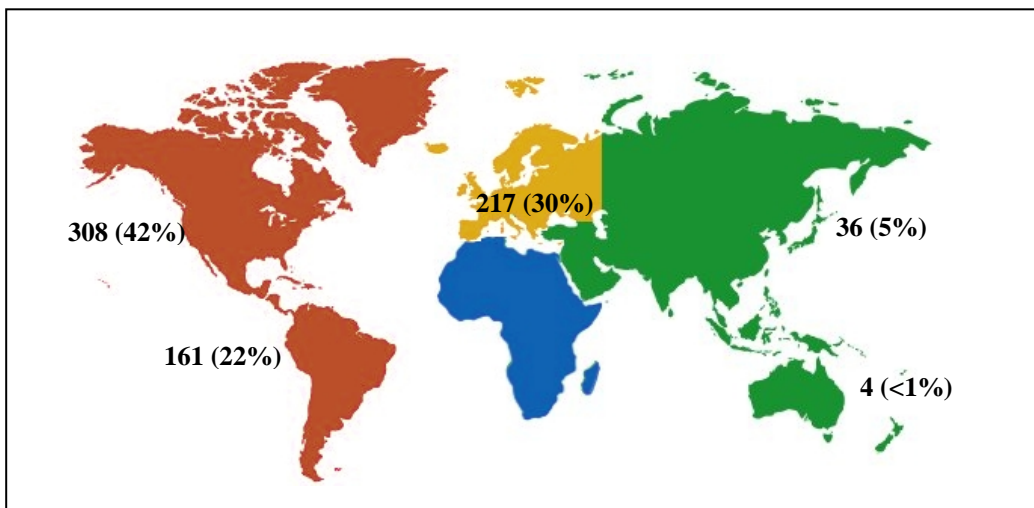
OBJECTIU 1

IDENTIFICAR LES FAMÍLIES AMB DEFECTE GENÈTIC A SCN5A.

a- Recrutament de la població.

Des dels primers casos, es va veure que es tractava d'una malaltia familiar i per tant segurament genètica. El recrutament es va fer doncs pensant en la recollida de individus afectats i els seus familiars. En els darrers 12 anys hem recollit 726 famílies. Tal com s'indica en la figura següent, les famílies són en la seva majoria del món occidental. **(FIGURA 16)**

FIGURA 16. Localització geogràfica de les famílies recrutades.



b- Resultats del cribatge genètic.

L'anàlisi genètica va ser realitzada mitjançant la seqüenciació del canal de sodi cardíac SCN5A, responsable d'un 20-25% de la síndrome de Brugada. L'anàlisi continua en les famílies, i per a aquest treball se n'han analitzat 350, que corresponen a un total de 2438 mostres recollides de DNA. S'han descobert 66 mutacions a SCN5A en 73 famílies (21%), que es correspon amb 187 individus portadors de mutacions. **(TAULA 5).**

La majoria de mutacions (51) són *missense*, a on hi ha un canvi d'aminoàcid sense crear un codó d'aturament (codó d'*stop*). Per tant hi ha 15 mutacions en 18 famílies que creen un codó d'*stop*. Totes les mutacions, menys una, explicada a continuació, estan localitzades en els exons codificants de SCN5A. Només una de les mutacions és *de novo*, o sigui que l'individu la té però no l'ha heretada dels seus pares biològics.

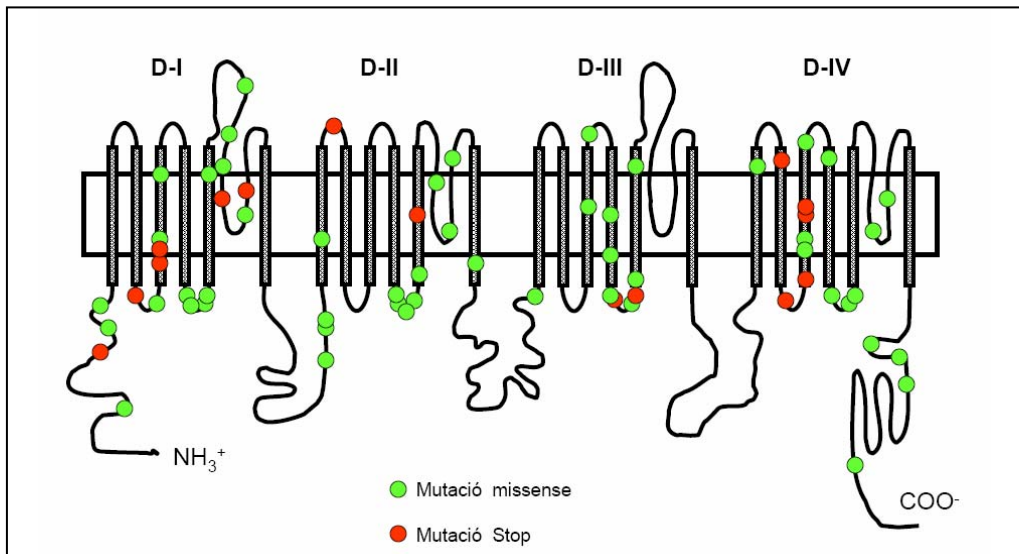
TAULA 5. Estat actual de l'anàlisi genètica de les famílies.

Nombre total de famílies	726
Nombre total de famílies amb cribatge genètic acabat	350 (48%)
Nombre total de famílies amb mutació a SCN5A	73 (21%)
Nombre total de famílies amb mutació stop	18 (25%)
Nombre total d'individus amb mutació a SCN5A	187

c- Localització de les mutacions.

La localització de les mutacions es mostra en la **FIGURA 17**. Es pot observar que tant les mutacions *stop* com les *missense*, estan disperses per tot el gen, sense cap zona de predil.lecció especial.

FIGURA 17. Localització de les mutacions en el canal de sodi.



d- Mutació intrònica.

Es va reclutar una família europea composta de 38 membres després que un dels seus membres fos diagnosticat amb la síndrome de Brugada (**FIGURA 18**). Hi havia una història de mort sobtada en 6 membres, que tenien des de 30 (V-4) a 70 (II-3) anys. Nou individus estaven fenotípicament afectats basat en l'ECG basal o després de l'administració d'un bloquejant de classe I (**FIGURA 19**). 7 individus foren investigats amb estudi electrofisiològic, tres foren induïbles i varen rebre un desfibril·lador implantable.

FIGURA 18. Família 24-011 amb síndrome de Brugada.

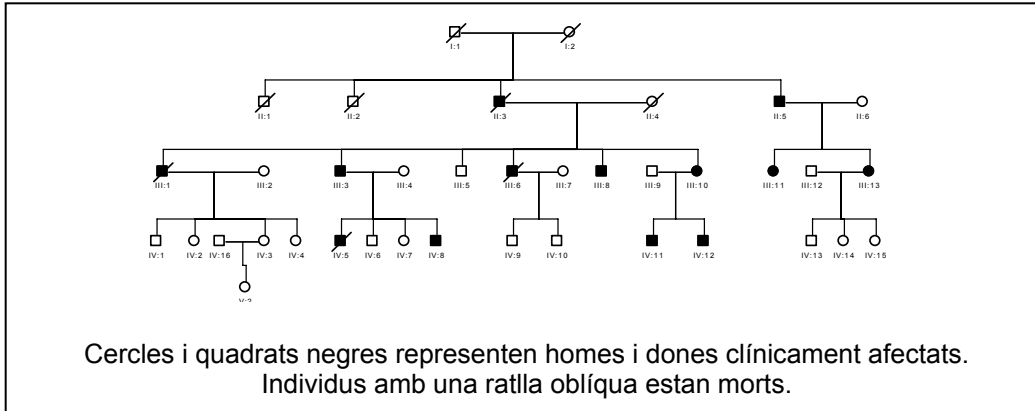
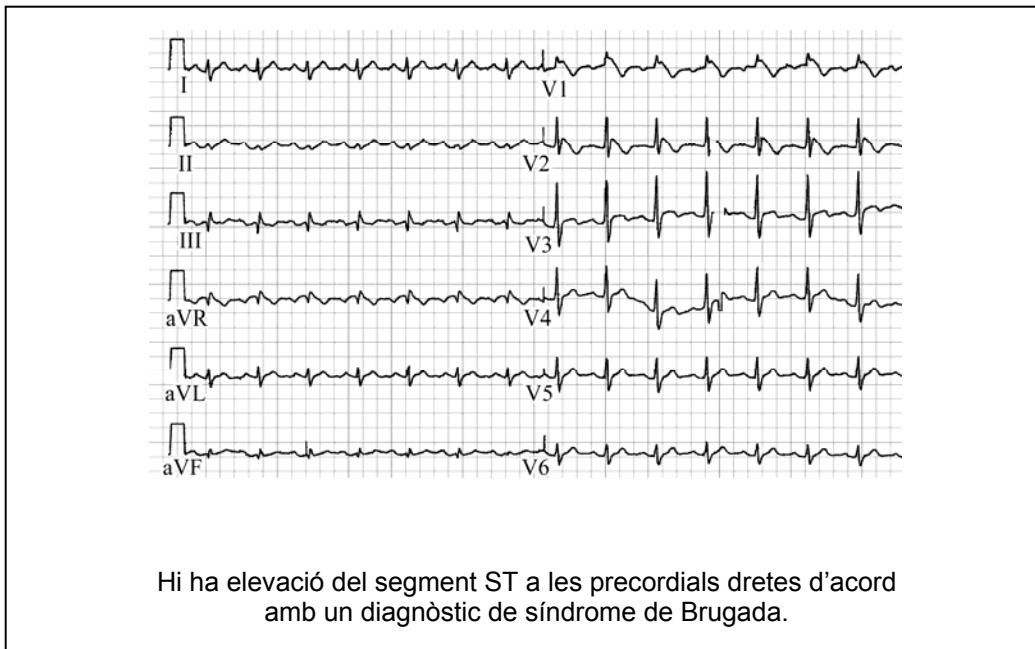


FIGURA 19. Electrocardiograma de l'individu III-3.

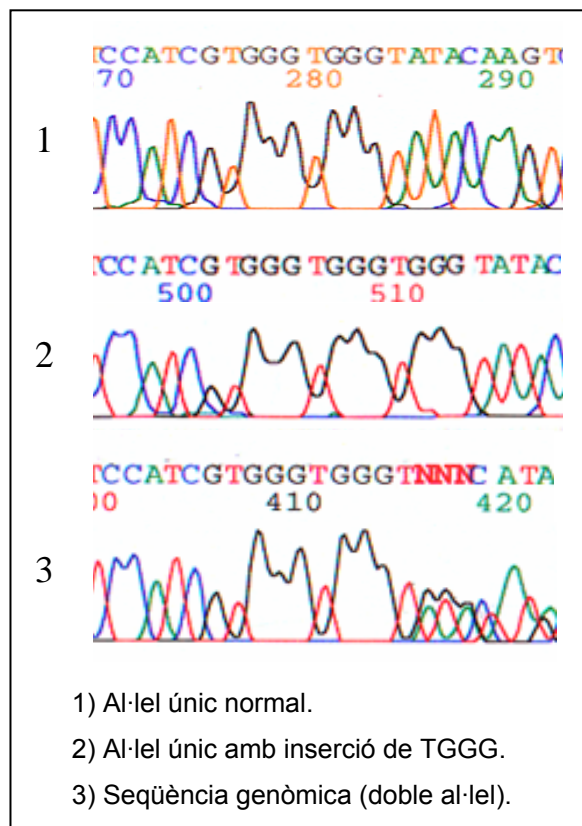


Anàlisi Genètica.

L'anàlisi de la seqüència del gen SCN5A va revelar una inserció de TGGG 5 bases després de la fi de l'exó 27 (**FIGURA 20**). L'anàlisi a la família va confirmar que tots els individus amb un electrocardiograma positiu basalment o després d'ajmalina tenien la mutació. Aquesta variació no va ser detectada en 300 cromosomes controls del mateix grup ètnic.

FIGURA 20.

Resultats de seqüenciació, exó 27.



Anàlisi molecular.

Per a determinar si la mutació provocava una alteració en el patró de *splicing* del mRNA de SCN5A, la millor opció hauria estat realitzar l'anàlisi en RNA de cor de malalt. Aquesta opció no va ser considerada per raons ètiques òbvies. Per tant vàrem investigar si les línies cel·lulars de limfoblasts podien ser utilitzades. Vàrem comparar el patró de *splicing* del mRNA en controls comercials de cor i en pacients. Els experiments de transcripció inversa (RT-PCR) varen confirmar la presència de dues bandes en els individus afectats (**FIGURA 21**). Aquests resultats foren confirmats en diferents preparacions de RNA missatger. La clonació i posterior seqüenciació de les bandes mostraren que la mutació causava una deleció de 96 bases al mRNA de l'exó 27(**FIGURA 22**). Per tant, la proteïna tenia 32 aminoàcids menys que la proteïna normal a causa d'aquesta deleció (des de 1572 to 1604), corresponent a fragments dels segments 2 i 3 del domini IV (**FIGURA 23**). Aquesta troballa suggereix que la mutació intrònica crea un zona críptica de *splicing* a dins l'exó 27.

FIGURA 21. RT-PCR amb línies limfoblàstiques d'un individu afectat.

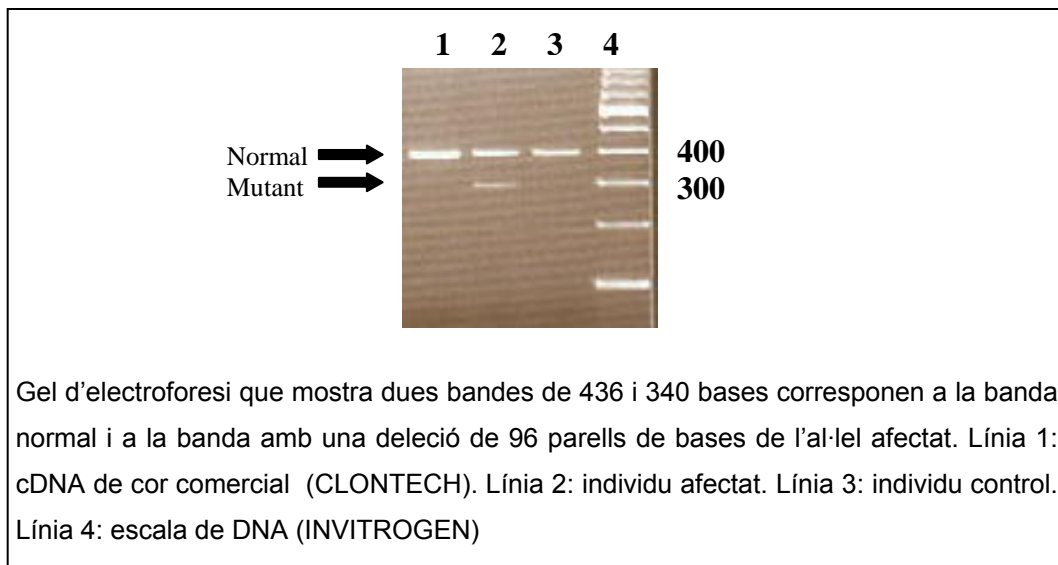


FIGURA 22. Resultats de seqüenciació d'ambdós al·lels d'un afectat.

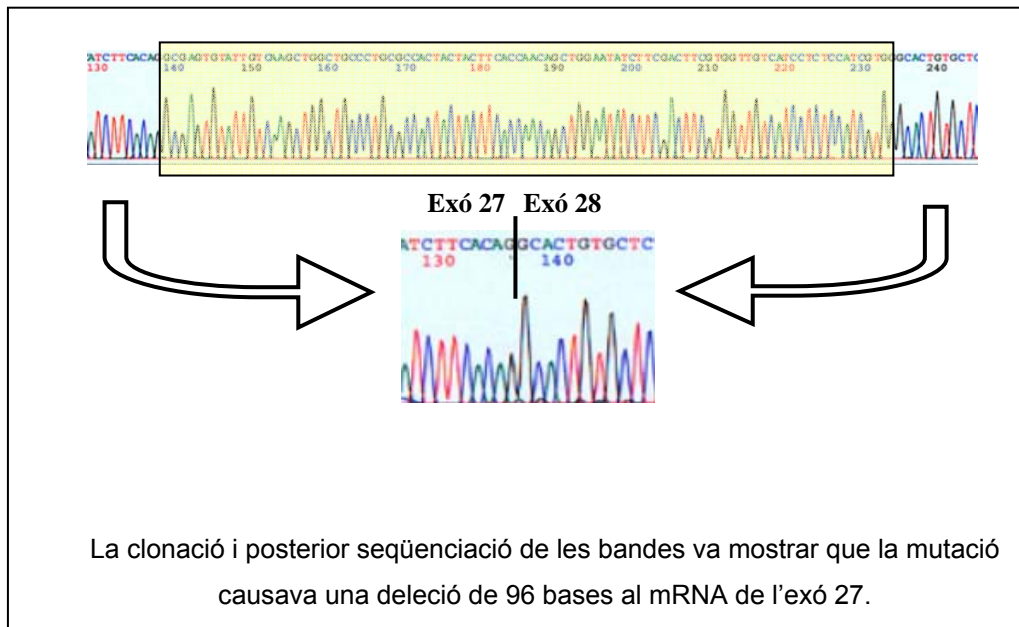
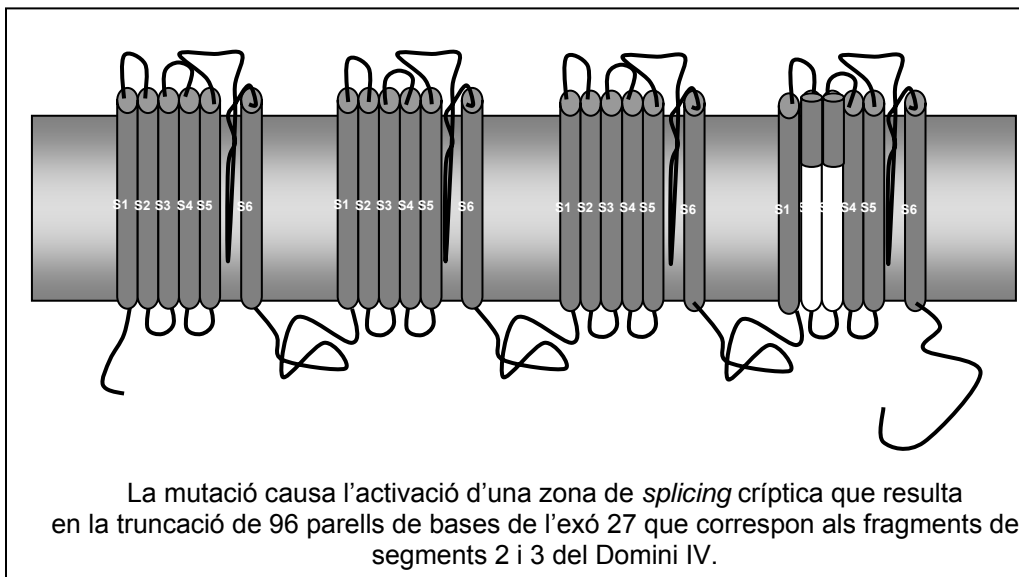


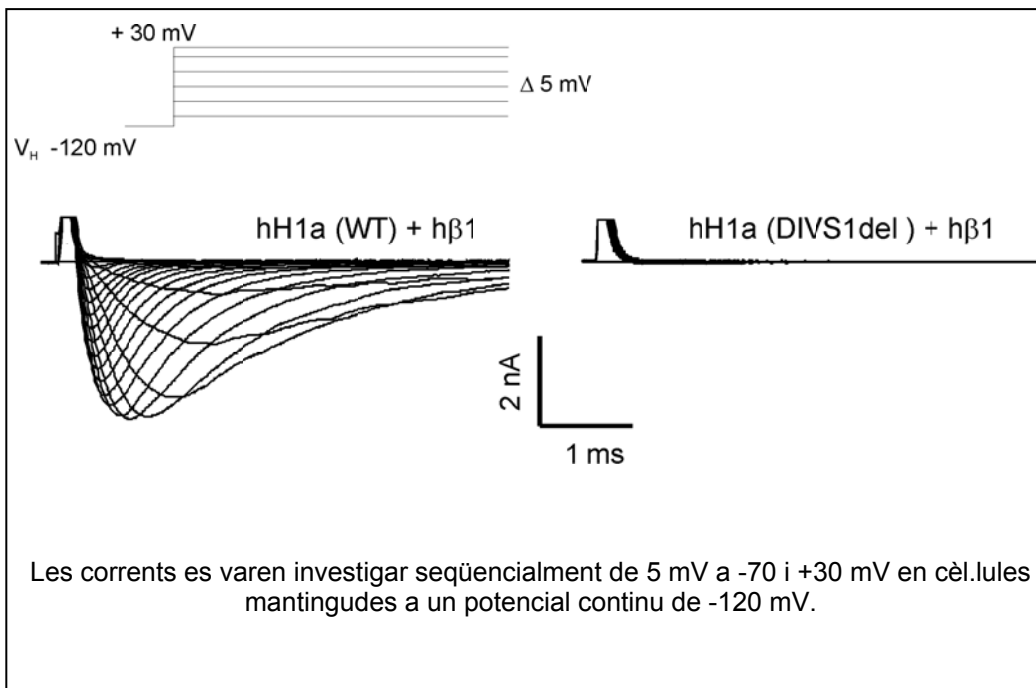
FIGURA 23. Esquema del patró de *splicing* de la proteïna mutada.



Anàlisi biofísica

L'anàlisi electrofisiològica dels canals mutants va demostrar que aquests no expressaven cap corrent, per tant l'efecte observat era una pèrdua de corrent degut a la pèrdua d'un al·lel funcional (**FIGURA 24**).

FIGURA 24. Corrent a cèl.lules TSA201 transfectades amb el canal de sodi cardíac normal (WT) i el mutat (DIVS2/S3del).



OBJECTIU 2

CORRELACIONS FENOTIP-GENOTIP

Algunes companyies privades realitzen un cribatge de gens per malalties monogèniques i per tant, per un import concret, es pot tenir un informe sobre la presència o no de mutacions per una determinada malaltia. El fet de tenir una mutació implica un risc més elevat que el d'una persona sense la mutació. Això ha generat polèmica, ja que la interpretació dels resultats genètics no és senzilla i es demana que hi hagi centres amb metges especialitzats en aquest camp. És molt probable que els metges inexperts en genètica optin per tractaments més agressius quan s'ha descobert que el malalt és portador de la mutació i hagin optat per protegir-lo amb un desfibril·lador implantable. Aquesta és una actitud força discutible, si es té en compte que la majoria de les malalties monogèniques tenen una penetrància (portadors amb fenotip clínic) baixa o molt baixa. Es calcula que en la síndrome de QT llarg la penetrància és d'un 40%. La malaltia aritmogènica que presenta la penetrància més alta és probablement la síndrome de QT curt, amb un 90%, però segurament fins i tot en aquest cas s'està fent una sobreestimació ja que la malaltia és molt nova i és probable que, de moment, només s'identifiquin els casos més severos.

En aquest objectiu volíem fer una valoració de les implicacions de ser portador d'una mutació del canal de sodi, identificar si hi ha un risc tan elevat que convindria prendre mesures preventives en els individus. També com que s'ha descrit una mutació a canal de sodi associada amb miocardiopatia dilatada ens interessava saber si en el seguiment els portadors desenvolupen alteracions estructurals cardíques o si aquest és un fenotip complex associat a un component genètic desconegut que predisposa a la cardiopatia.

De les 350 famílies investigades hem trobat mutacions en el canal de sodi en 73, el que representa un 21%. Aquestes 73 famílies tenen 187 membres amb mutacions, que formen el grup d'estudi.

a- Validesa de la prova d'ajmalina i dels paràmetres electrocardiogràfics en la identificació de portadors genètics.

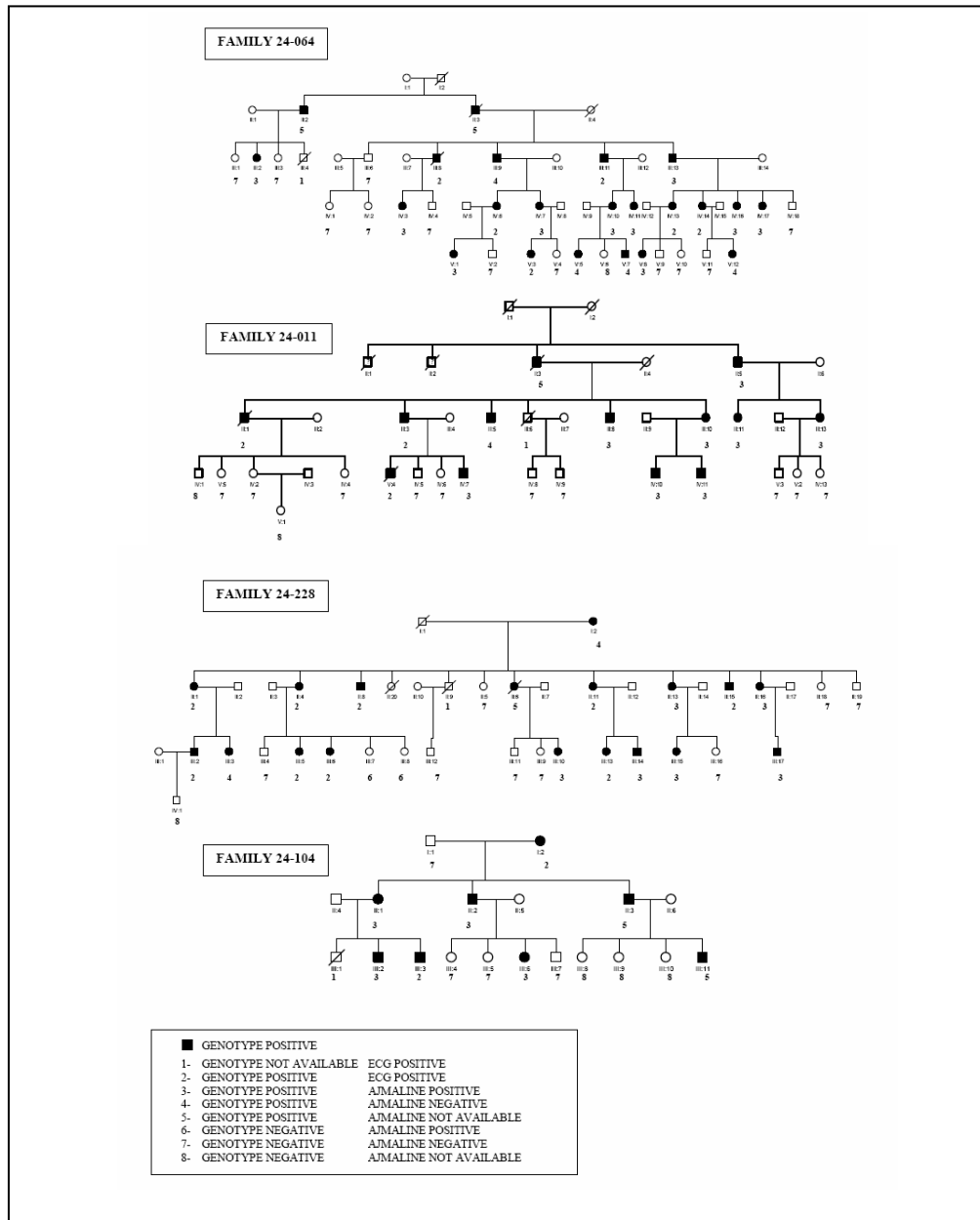
La fluctuació espontània de l'electrocardiograma, fins al punt de normalització temporal del ST, fa que la identificació de l'individu amb risc de mort sobtada sigui complicada. En la síndrome de Brugada es pot provocar l'aparició del patró electrocardiogràfic amb l'ús intravenós de bloquejants potents del canal de sodi. Aquestes proves són bàsiques en el diagnòstic diferencial de les arítmies malignes en malalts amb un cor estructuralment normal. La sensibilitat més baixa d'alguns dels bloquejants de sodi i la manca d'un *gold standard* en el diagnòstic de síndrome de Brugada continua essent un problema en la nostra capacitat d'estratificar adequadament alguns dels individus. No està clar que el defecte genètic pugui ser considerat el *gold standard* en la malaltia, però la presència de la mutació juga un paper important en les decisions clíniques. En una família amb síndrome de Brugada, aquells que no són portadors de la mutació familiar (excepte en aquelles situacions rares de doble mutació) poden ser considerats lliures de la malaltia. Igualment, aquells que són portadors de la mutació en el canal iònic estan potencialment amb risc de patir la malaltia.

La prova genètica en la síndrome de Brugada permet estudiar la validesa de les proves diagnòstiques, com l'ajmalina i els paràmetres electrocardiogràfics bàsics, en la identificació de portadors genètics en una família.

Vàrem utilitzar quatre famílies grans (**FIGURA 25**) amb una mutació coneguda en el canal de sodi amb dos objectius: 1) contrastar els resultats de la prova d'ajmalina amb les dades genètiques, que ens permetés determinar la

sensibilitat i especificitat del test farmacològic 2) fer una valoració d'altres patrons electrocardiogràfics per a identificar portadors genètics.

FIGURA 25. Pedigrís de les quatre famílies amb mutacions a SCN5A.



Les quatre famílies tenien un total de 147 membres. D'aquests, 116 eren individus a risc de síndrome de Brugada, dels quals 8 havien mort i no en teníem informació. 24 individus tenien un electrocardiograma basal positiu. De la resta dels individus 84, amb electrocardiograma basal normal, 71 (29 homes i 42 dones), varen rebre ajmalina. (1mg/kg durant 5 minuts) (**TAULA 7**).

Després de fer una investigació del gen SCN5A mitjançant seqüenciació directa dels exons i zones exó-intró, tal com es mostra en la taula següent, vàrem identificar que les 4 famílies tenien mutacions en el canal de sodi SCN5A. El genotip era positiu en 61 dels 104 individus (27 homes, 34 dones) Els 20 malalts que tenien un electrocardiograma basal positiu tenien la mutació.

TAULA 7. Dades genètiques i resposta a l'ajmalina en les 4 famílies.

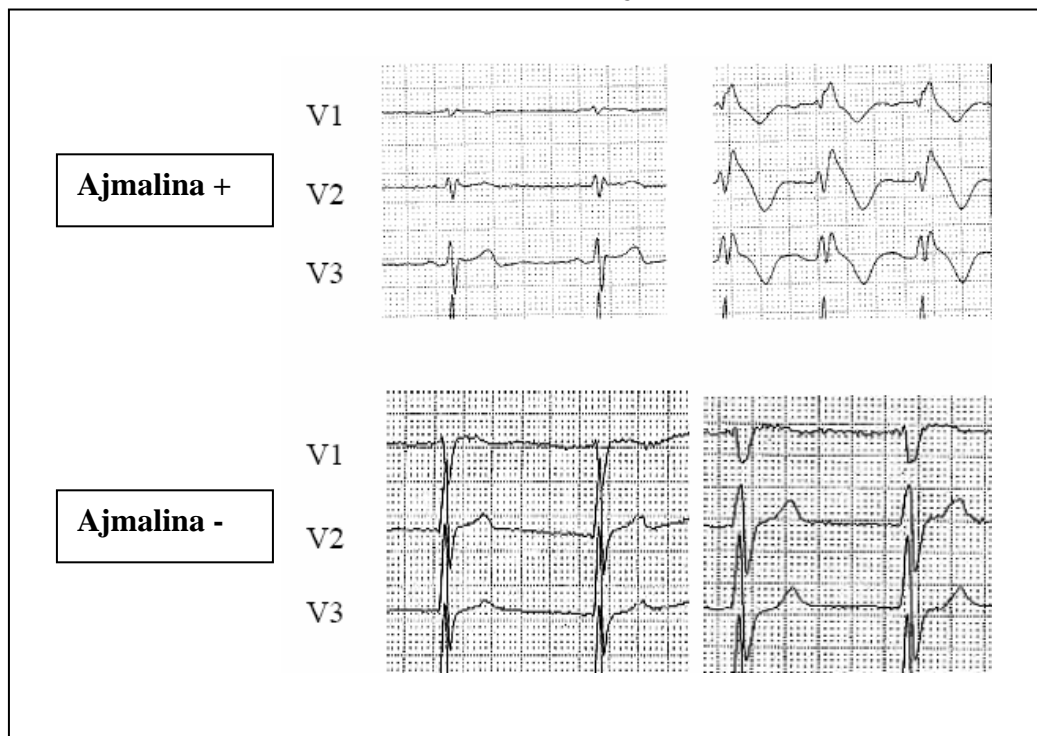
	Família 24-011	Família 24-228	Família 24-064	Família 24-104	Total
Individus a les famílies	38	40	50	19	147
Esposos/es	8	8	12	3	31
Individus amb risc	30	32	38	16	116
Sense informació clínica o genètica.	4	2	2	0	8
Genotip N/A, ECG +	1	1	1	1	4
Genotip +	13	18	22	8	61
Genotip +, ECG +	3	9	6	2	20
Genotip +, AJM +	8	6	10	4	28
Genotip +, AJM -	1	2	4	0	7
Genotip +, AJM N/A	1	1	2	2	6
Genotip -	12	11	13	7	43
Genotip -, AJM +	0	2	0	0	2
Genotip -, AJM -	10	8	12	4	34
Genotip -, AJM N/A	2	1	1	3	7
Mutació	IV27S+7insG	R367H	R769C	T1620M	

AJM: Prova ajmalina. ECG +: individu amb ECG positiu basalment.

Prova d'ajmalina.

Dels 71 individus que varen rebre l'ajmalina, 30 varen desenvolupar l'electrocardiograma típic (prova d'ajmalina positiva) i 41 no (prova d'ajmalina negativa) (**FIGURA 26**). 28 individus amb prova d'ajmalina positiva i 7 amb negativa tenien la mutació. Per tant, dos individus amb la prova positiva no tenien la mutació i 7 amb la prova negativa tenien la mutació. La penetrància del fenotip va augmentar de 32.7 a 78.6% amb l'ús de bloquejants de canal de sodi. La sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu i negatiu de la prova d'ajmalina va ser per tant de 80%, 94.4%, 93.3% and 82.9% respectivament.

FIGURA 26. Prova d'ajmalina.



Paràmetres electrocardiogràfics.

Hi havia 5 pacients que tenien bloqueig de branca dreta (3 amb elevació del segment ST i 2 sense) i que eren portadors del defecte genètic. Cap del no portadors tenia un bloqueig de branca dret complet. Els individus amb mutació tenien un PR més llarg que els individus sense mutació. El bloqueig de primer grau, definit com a PR > 200 ms. era més freqüent en pacients amb la mutació (8/41 BC 2/43) ($P \leq 0.05$). Els intervals QT, Tp-Te i la presència de bloqueig incomplet de branca dreta no eren estadísticament diferents entre portadors i els no portadors. (TAULA 8).

TAULA 8. Paràmetres electrocardiogràfics.

	ECG + Basal	Genotip + no elevació ST	Genotip -	P
	Total (n=24)	Total (n=41)	Total (n=43)	
PR (ms.)	206±32	204±13	164±12	P≤0.001
bloc AV 1r grau	5/24	8/41	2/43	P<0.05
QRS (ms.)	105±10	106±4	91±2	P=0.08
BBD	3/24	2/41	0/43	P=0.16
Rsr'	7/24	6/41	13/43	P=0.09
QTc (ms.)	412±22	413±14	406±13	P=0.347
ST(V2) (mV)	0.21±0.06	0.05±0.007	0.05±0.004	P=0.08
TpTe (ms.)	92±3	82±1	81±1	P=0.30
Ajmalina	N/A	n=35	n=36	
Positiva		28/35	2/36	P<0.001
Negativa		7/35	34/36	P<0.001
No es va fer		6/41	7/43	

BAV: Bloqueig aurículo-ventricular; BBD=bloqueig de branca dreta; Tp-Te=intèrval entre el pic i la fi de l'ona T. La comparació estadística (valor P) va ser feta entre els grups Genotip (+) sense elevació del segment ST i Genotip (-). ECG + Basal: individu amb patró electrocardiogràfic positiu de base.

b- Resultats de seguiment clínic en portadors de mutacions al canal de sodi.

Les 73 famílies tenen 187 membres amb mutacions al canal de sodi. D'elles 18 (24%) tenen història de mort sobtada en un o més membres de les famílies, 24 (33%) tenen història de síncope i la resta (43%) són famílies sense història cardíaca prèvia.

Hem volgut fer un seguiment dels individus amb mutació sense símptomes previs, o sigui trobada després de l'anàlisi del cas índex de la família. Per a fer aquesta anàlisi es varen també excloure els casos índex de portadors de la mutació, doncs aquests eren ja identificats a partir de les dades clíniques. Això ha estat fet, sobretot, per observar si el tenir una mutació és un factor de risc important per als membres de la família.

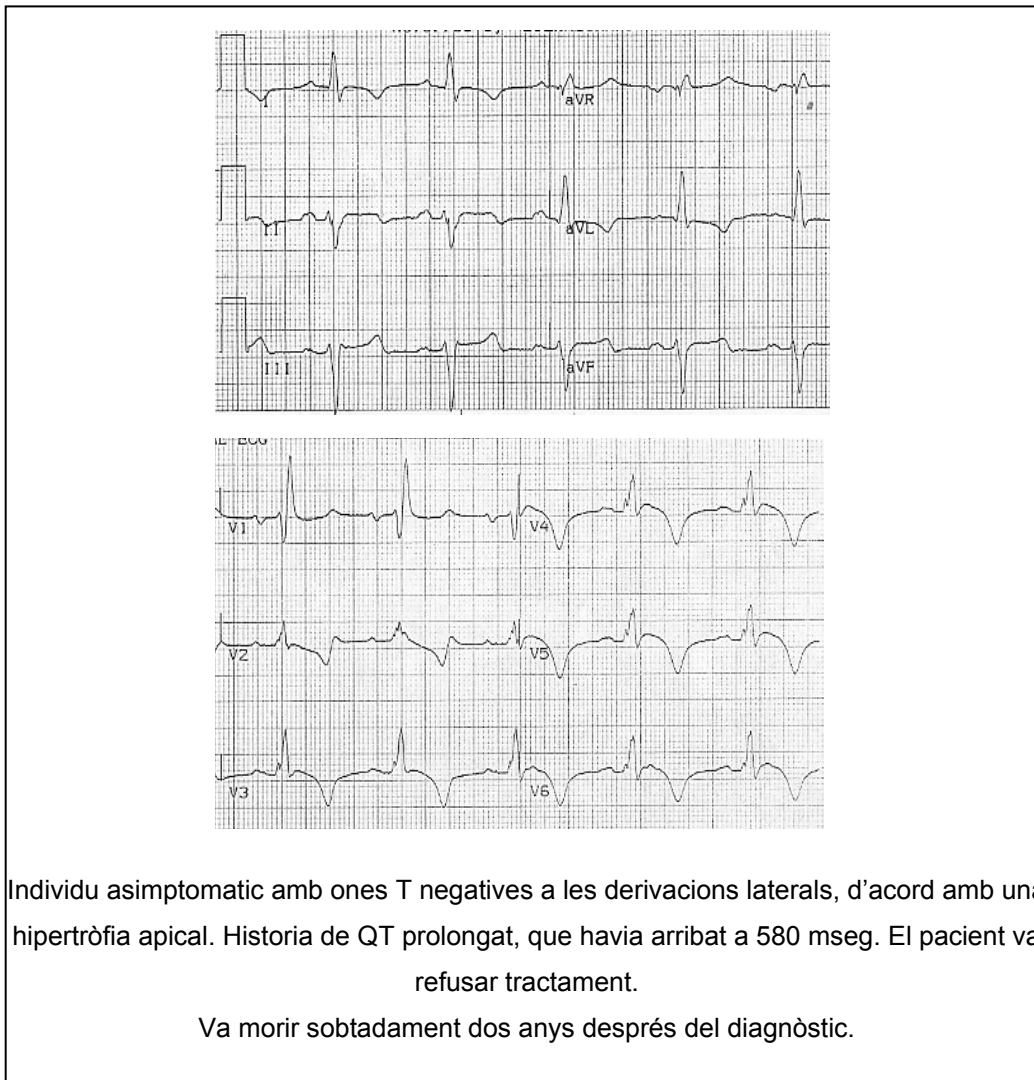
95 individus són doncs asimptomàtics, portadors de la mutació familiar, trobada a partir de la investigació familiar. Els portadors de les mutacions tenen una mitjana d'edat de 31 anys. 18 individus, (20%) tenen un electrocardiograma tipus I basal i 16 (18%) una prolongació de l'interval QTc més gran que 460 ms. L'estudi electrofisiològic va ser realitzat en 37 individus, essent negatiu en 26 i positiu en 11. Es varen implantar 11 desfibril·ladors.

Seguiment clínic.

Hi ha hagut 4 esdeveniments al seguiment d'aquests individus. Tres d'ells presentaven un electrocardiograma basal tipus I i varen ser estratificats amb estudi electrofisiològic i varen rebre un desfibril·lador. Per tant han sobreviscut l'arítmia. Un dels individus tenia un electrocardiograma amb un QT molt allargat, fins a 570 ms. en alguns traçats. Malgrat que havia estat asimptomàtic tota la seva vida, se li va aconsellar un desfibril·lador, però el va rebutjar. Va morir sobtadament dos anys més tard.

Cap dels individus té alteració estructural cardíaca a l'anàlisi ecocardiogràfica o de ressonància, llevat d'un individu, precisament la persona asimptomàtica que es va morir, que tenia una hipertròfia apical severa. Cap dels membres de la seva família tenia la malaltia hipertròfica. (FIGURA 27)

FIGURA 27. Electrocardiograma d'un pacient amb mutació al canal de sodi.

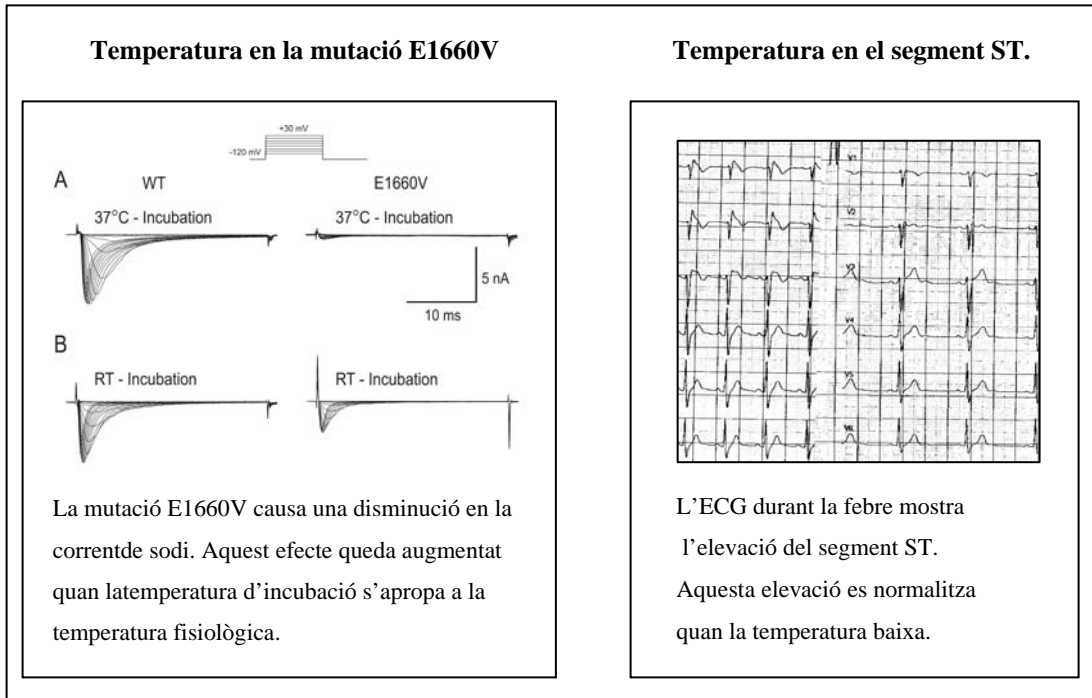


d- Correlació dels símptomes amb el tipus de mutació.

En la síndrome de Brugada les mutacions en el canal de sodi poden causar diferents alteracions biofísiques, des de la pèrdua completa de funció provocada per una proteïna truncada (causada per una deleció, inserció o la creació d'un codó d'aturament) o per una alteració biofísica, fins a la pèrdua parcial. El 25% de les mutacions al canal de sodi causen un insuficiència d'haplotip en les nostres famílies, degut a la creació d'un codó d'stop. Aquest és el cas per exemple de l'individu RB6026 que té la mutació R179X. Fins i tot en les famílies amb una pèrdua absoluta de funció hi ha una variabilitat molt important, i fins i tot en una família hi pot haver individus simptomàtics, però també molts d'asimptomàtics.

Hi ha hagut observacions limitades que han mostrat que hi ha una correlació directa entre el nivell de disfunció del canal de sodi i la severitat del fenotip. Un dels casos més clars és el de la modulació de l'efecte per la temperatura. Quan la temperatura d'incubació s'augmenta en les cèl.lules transfectades amb el canal mutat, hi ha una pèrdua més important de funció. Això té també una correlació clínica, doncs hi ha hagut molts pacients que presenten arítmies malignes durant els episodis febrils. Tal com es mostra en la **FIGURA 28**, la temperatura augmenta el segment ST a les precordials dretes i millora amb la disminució de la temperatura. La correlació entre l'augment del segment ST i l'aparició d'arítmies malignes s'ha observat també en els casos induïts per drogues, com els anestèsics o en l'aparició d'arítmies quan es diagnostica la síndrome durant la infusió d'ajmalina. En alguns d'aquests casos es pot observar un augment de les arítmies a mesura que el segment ST es fa més elevat.

FIGURA 28. Efecte de la temperatura a nivell biofísic i també clínic.



Com que la pèrdua progressiva de funció sembla estar associada a un fenotip més sever vàrem investigar si els individus i les famílies amb una mutació que causa una pèrdua total de funció (proteïna truncada) tenien un fenotip més agressiu, amb més arítmies i mort sobtada. Per a aquesta part del projecte, vàrem dividir les mutacions en truncades (sense funció) i *missense*. (**TAULA 5**). No vàrem trobar cap diferència en el risc de mort sobtada o síncop d'acord a la presència d'una mutació que crea un codó de *stop* comparat amb les mutacions *missense*. (**TAULA 9**).

TAULA 9. Resultats d'acord a mutació i símptomes.

	Mort Sobtada	Síncop	Asimptomàtic	P
Proteïna truncada	9%	21%	68%	NS
Mutació missense	8%	22%	71%	NS

Els individus que tenien un codó d'aturament sí que presentaven una alteració en la conducció més significativa que els individus amb una mutació *missense* (**TAULA 10**).

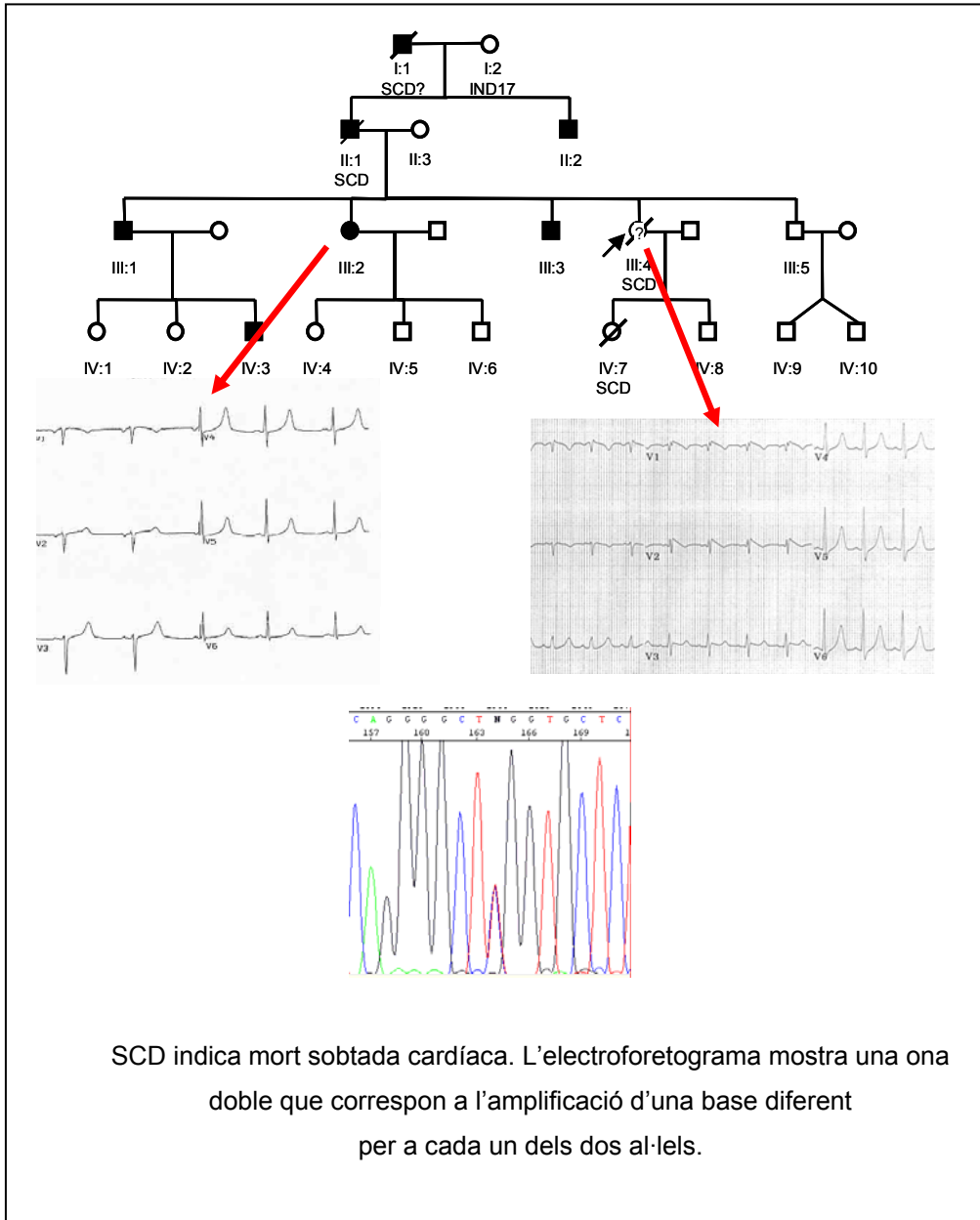
TAULA 10. Resultats d'acord a mutació i paràmetres electrocardiogràfics.

	Interval PR	QRS
Proteïna truncada	205 ms.	113 ms.
Mutació <i>missense</i>	187 ms.	109 ms.
P	0.016	NS

e- Solapament de fenotips causats per una mateixa mutació a *scn5a*.

Cas 1. Família 24-588. El 1990, l'individu RB6899, una nena de 8 anys, va sofrir una mort sobtada mentre era a l'escola. Tretze anys més tard la seva mare, de 40 anys, va patir una mort sobtada d'origen cardíac. Els electrocardiogrames de la mare mostraven un patró electrocardiogràfic de síndrome de Brugada, a la nena no se li havia realitzat mai un electrocardiograma (**FIGURA 29**). L'avaluació clínica de la família va revelar una combinació de síndrome de Brugada i de QT llarg (**TAULA 11**). L'avi, 72 anys, havia estat asimptomàtic durant tota la seva vida i el seu electrocardiograma va mostrar un QTc de fins a 580 msec i ones T negatives a les derivacions laterals que corresponien a una hipertròfia apical (**FIGURA 27**). Malgrat el QT tan llarg, va rebutjar un desfibril·lador i va morir sobtadament dos anys més tard. L'anàlisi genètica de la família va revelar una mutació *missense* (substitució de G a A al nucleòtid 1784), causant la substitució de Glu per Lys (E1784K). (**FIGURA 29**).

FIGURA 29. Pedigrí i electrofretograma de la família 24-588.

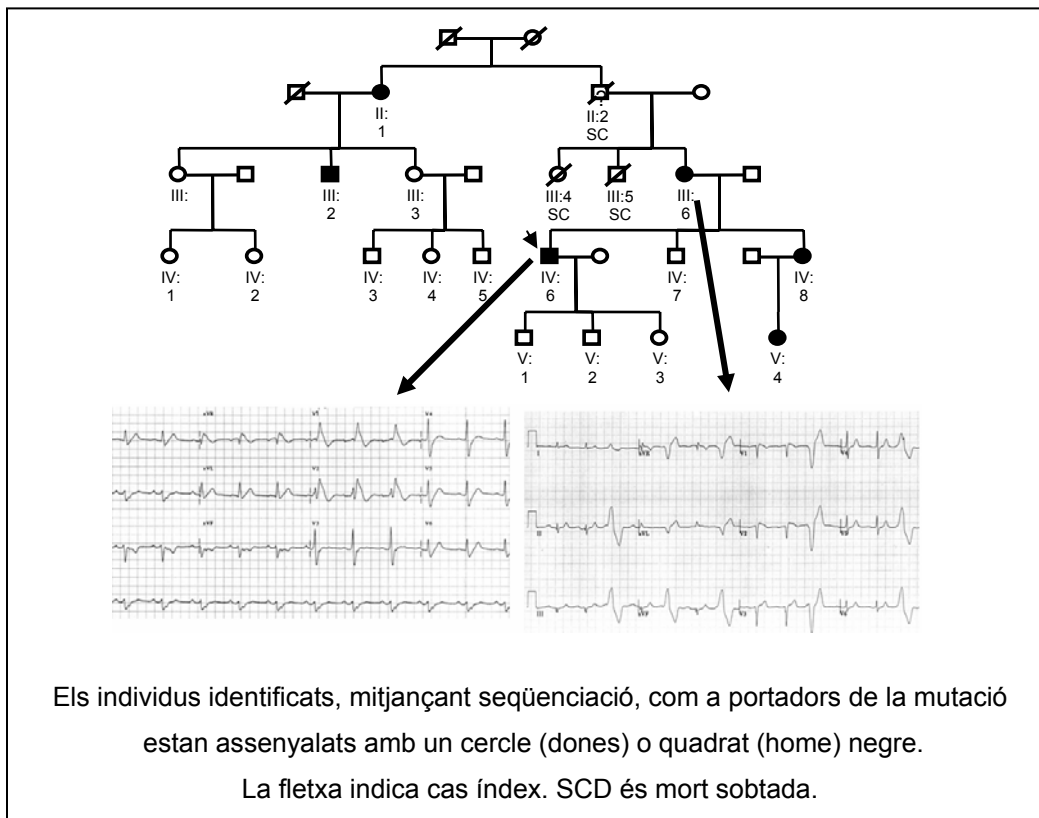


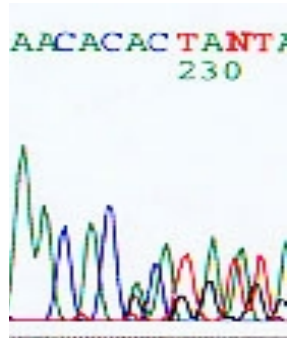
Taula 11.
Anomalies electrocardiogràfiques en els membres de la família 24-588

Pacient No.	Edat anys	QT _c ms.	BBD	ECG a precordials dretes			Mutació
				Tipus 1	Tipus 2	Tipus 3	
II:1	73	<u>569</u>	<u>Sí</u>	No	No	No	<u>Sí</u>
II:2	70	<u>450</u>	No	No	No	No	<u>Sí</u>
III:1	45	<u>444</u>	No	No	No	No	<u>Sí</u>
III:2	44	<u>483</u>	No	No	No	No	<u>Sí</u>
III:3	41	<u>447</u>	No	No	No	<u>Sí</u>	<u>Sí</u>
III:4	40	<u>508</u>	<u>Sí</u>	<u>Sí</u>	<u>Sí</u>	No	?
III:5	31	383	No	No	<u>Sí</u>	No	No
IV:1	10	409	No	No	No	No	No
IV:2	7	395	No	No	No	No	No
IV:3	4	407	No	No	No	No	<u>Sí</u>
IV:4	22	405	No	No	No	No	No
IV:5	14	402	No	No	No	No	No
IV:6	10	392	No	No	No	No	No
IV:8	13	335	No	No	No	No	No
IV:9	1	391	No	No	No	No	?
IV:10	1	408	No	No	No	No	?
II:3	70	426	No	No	No	No	?

Cas 2. Família 24-328. El cas índex és un individu de 36 anys que va fer una aturada cardíaca amb documentació de fibril·lació ventricular i va mostrar un electrocardiograma típic de síndrome de Brugada. L'anàlisi de la resta de la família va mostrar una combinació de síndrome de Brugada i malaltia de la conducció (**TAULA 12**). L'avi va desenvolupar un bloqueig auriculoventricular complet, pel que va rebre un marcapàs. Té un fill que pateix bradicàrdia simptomàtica amb bloqueig de branca dreta i hemibloqueig esquerre anterior. Les anàlisis genètiques varen mostrar una inserció en el domini II de SCN5A (TGins851), causant una alteració en el marc de lectura i creant un codó d'stop amb truncació prematura de la proteïna (**FIGURA 30**).

FIGURA 30. Pedigrees i electroforetograma a la família 24-328.





L'electroforetograma mostra una disrupció de la lectura de la seqüència causada per la inserció de dues bases en l'al·lel mutat. Aquest canvi en el marc de lectura genera un codó d'aturament.

TAULA 12. Anomalies electrocardiogràfiques a la família 24-328.

Pacient No.	Edat anys	QT _c ms.	BBD	ECG a precordials dretes			Mutació
				Tipus 1	Tipus 2	Tipus 3	
II:1	83	<u>MP</u>	N/A	N/A	N/A	N/A	<u>Sí</u>
III:1	56	430	No	No	No	No	No
III:2	61	<u>418</u>	<u>Sí</u>	No	No	No	<u>Sí</u>
III:6	54	<u>404</u>	No	<u>Sí</u>	No	No	<u>Sí</u>
IV:2	26	<u>389</u>	No	No	No	No	<u>No</u>
IV:6	36	<u>472</u>	<u>Sí</u>	<u>Sí</u>	No	No	<u>Sí</u>
IV:7	21	<u>406</u>	<u>No</u>	No	No	No	<u>No</u>
IV:8	32	<u>402</u>	No	No	No	No	Sí
V:1	10	<u>365</u>	No	No	No	<u>Sí</u>	<u>No</u>
V:2	7	<u>394</u>	No	No	No	No	<u>No</u>
V:3	12	<u>434</u>	No	No	No	No	<u>No</u>
V:4	1	420	No	No	No	No	<u>Sí</u>

MP. Marcapàs, BBD bloqueig de branca dreta

OBJECTIU 3

FACTORS EXTERNS I GENÈTICS ADDICIONALS PODEN INFLUENCIAR EL FENOTIP.

Treballs nostres i d'altres investigadors han suggerit que la severitat del fenotip pot estar relacionada amb el grau d'alteració de la corrent de sodi. La modulació de la corrent pot estar afectada per factors externs (com per exemple la temperatura)⁹⁶, per mutacions addicionals (individus amb mutacions homozigòtiques i mutacions dobles tenen un fenotip més sever).^{29, 97-99} i per variacions genètiques normals a la població.^{89, 99, 100} Varis estudis han revelat que les variacions normals poden modular significativament l'alteració biofísica en la corrent de sodi causada per un defecte genètic,^{82, 92-95} fins i tot quan la mutació i la variació estan presents en al·lels diferents.¹⁰¹ Una d'aquestes variacions (H558R) ha mostrat que millora els efectes *in vitro* de les mutacions causals i que millora la corrent.⁹³ Una segona variació (R1193Q), molt freqüent en japonesos, ha estat associada amb la síndrome de Brugada i amb la síndrome de QT llarg.^{26, 94, 95} Els mecanismes pels quals els polimorfismes alteren la corrent no són del tot coneguts. Les dades indiquen que és possible que hi hagi una modulació biofísica de la corrent,⁹² un efecte genètic independent⁸⁹, modulacions en el trànsit de la proteïna o en els seus nivells d'expressió^{81, 92}. Dades preliminars en famílies petites han suggerit que aquestes variacions poden modular el fenotip, però com que es parla només de dos o tres malalts, els resultats no són concloents.

L'expressió del fenotip i la penetrància de la malaltia no són del tot clares, i sembla que estan afectades per diferències de gènere, edat i altres factors que poden alterar el balanç iònic en la fase 0 i 1 del potencial d'acció. Semblant als estudis en QT llarg, és possible que la presència de factors genètics addicionals

pugui afectar el fenotip final. Amb aquest objectiu, per tant, vàrem investigar possibles factors genètics i ambientals que podrien influenciar en la severitat de la malaltia.

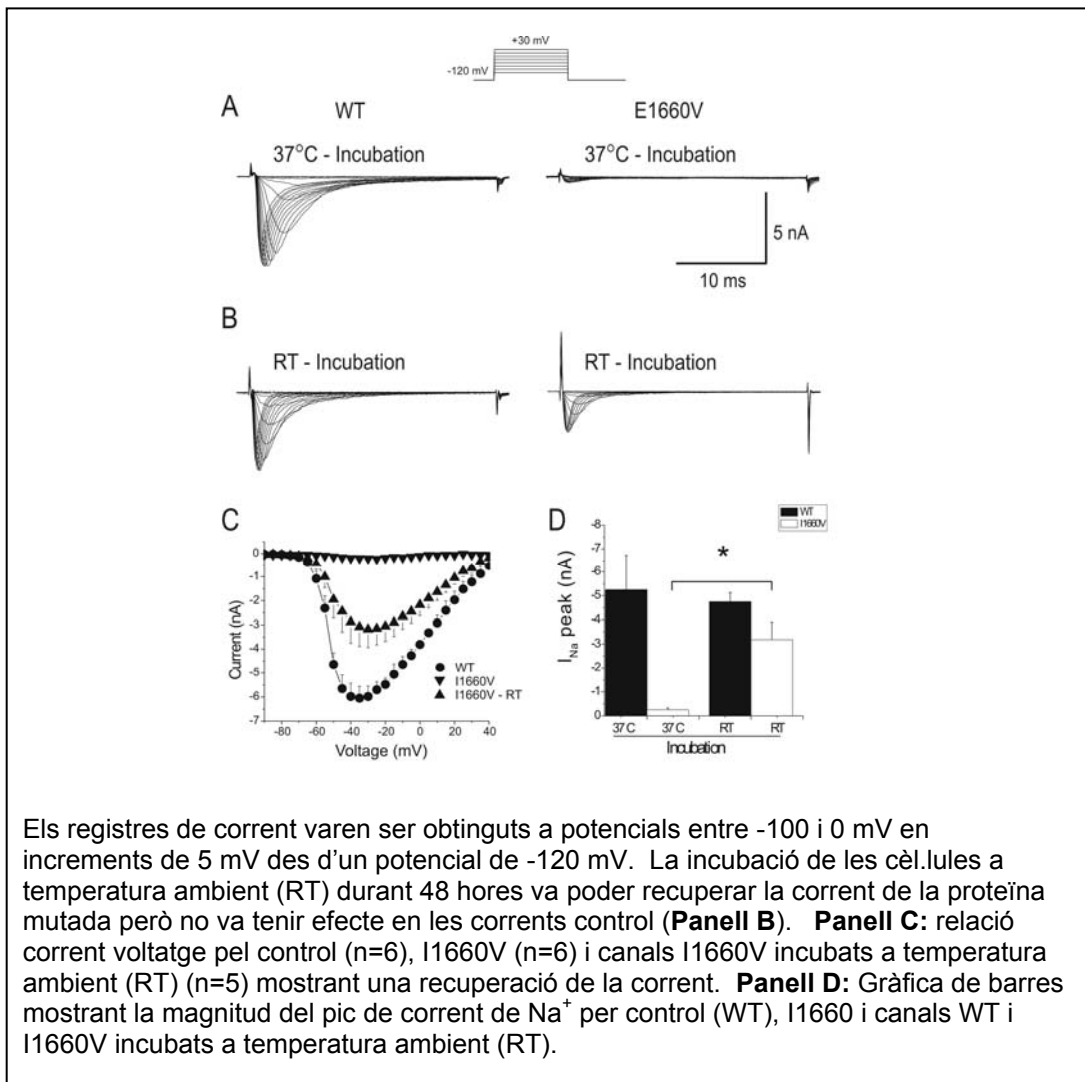
FACTORS GENÈTICS

a- Mutacions dobles.

Vàrem identificar una família en la qual es segregaven dues mutacions, P336L i I1660V, en el canal *SCN5A* en un cas índex asimptomàtic de síndrome de Brugada. Nomes el cas índex, amb ambdues mutacions, mostrava un patró electrocardiogràfic de tipus 1 amb un bloqueig AV de primer grau amb un PR molt allargat 280 ms. Una de les filles (III-2), que va heretar la mutació P336L, mostrava un bloqueig AV de primer grau, però menys sever que el del seu pare (210 ms). La filla III-1, que va heretar I1660V (III-1), mostrava un electrocardiograma relativament normal (PR 160 ms). L'interval QT eren normals en tots els individus. (**FIGURA 31**).

temperatures d'incubació més baixes, vàrem incubar les cèl·lules transfectades amb la mutació a 32°C graus i aquestes mostraven corrents normals (**FIGURA 32**). Per tant I1660V era una mutació que tenia una funció dependent de la temperatura.

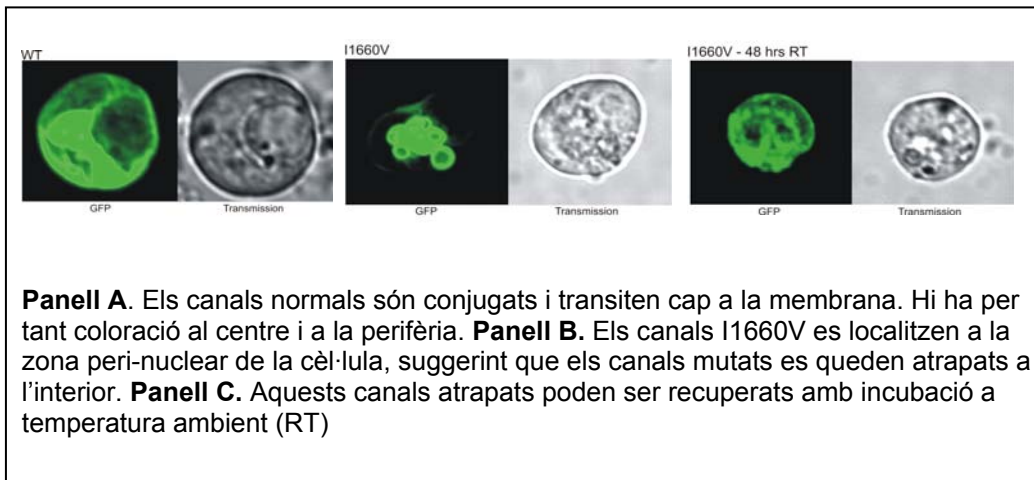
FIGURA 32. Registre de corrent pel canal mutat I1660V i el control.



Els registres de corrent varen ser obtinguts a potencials entre -100 i 0 mV en increments de 5 mV des d'un potencial de -120 mV. La incubació de les cèl·lules a temperatura ambient (RT) durant 48 hores va poder recuperar la corrent de la proteïna mutada però no va tenir efecte en les corrents control (**Panel B**). **Panel C:** relació corrent voltatge pel control (n=6), I1660V (n=6) i canals I1660V incubats a temperatura ambient (RT) (n=5) mostrant una recuperació de la corrent. **Panel D:** Gràfica de barres mostrant la magnitud del pic de corrent de Na⁺ per control (WT), I1660 i canals WT i I1660V incubats a temperatura ambient (RT).

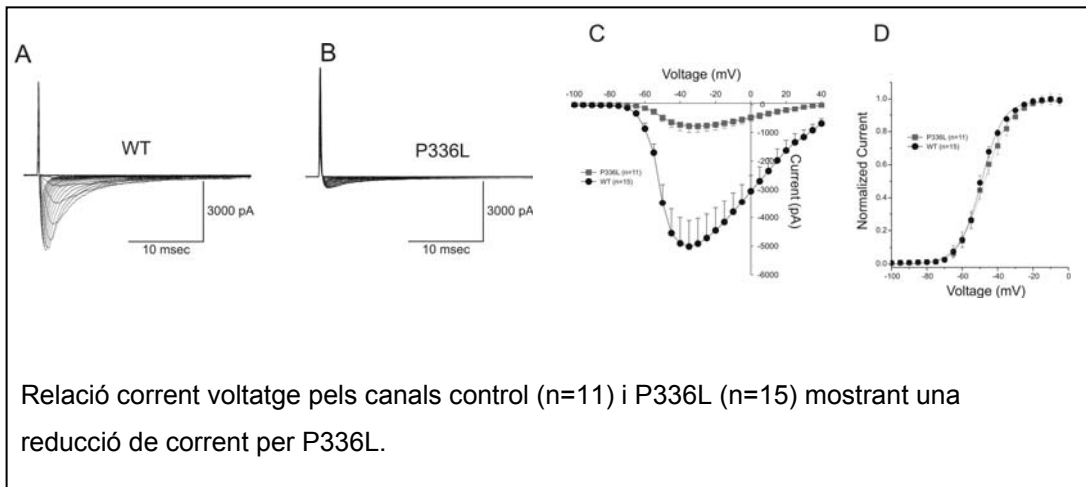
Aquests resultats suggerien que la mutació I1660V provocava una pèrdua de corrent causada per un defecte en el trànsit a la membrana. Per confirmar aquesta hipòtesi, vàrem marcar els canals mutants amb la proteïna *green fluorescent protein* (GFP) i vàrem localitzar les proteïnes amb microscopia confocal. Mentre que els canals normals tenien un trànsit normal, els mutants I1660V tenien una localització en els orgànuls intracel·lulars, suggerint que els canals romanien atrapats a dins les cèl·lules, probablement en el reticle endoplasmàtic. Després d'una incubació a temperatures baixes (22) les cèl·lules transfectades amb la mutació I1660V, mostraven un trànsit normal dels canals mutants (**FIGURA 33**).

FIGURA 33. Localització dels canals de Na⁺ en les cèl·lules TSA210.



L'amplitud de la corrent màxima de P336L estava reduïda en un 69% i suggeria que la reducció en la corrent era sobretot causada per una reducció en l'expressió dels canals o canvis en la seva conductivitat. El canvi en temperatura no va afectar la mutació P336L (**FIGURA 34**).

FIGURA 34. Registre de corrent pel canal mutat P336L i el control



b- Variacions normals com a modificadors genètics del fenotip.

Es desconeix encara en profunditat el paper que tenen les variacions normals a SCN5A en la seva funció. Una variació, S1103Y, ha estat associada amb un augment en el risc d'arítmies en la població afro-americana¹⁰⁰ i amb un augment de mort sobtada en el nadó.¹⁵ Aquestes publicacions varen consolidar el concepte que les variacions normals en el genoma poden també predisposar a mort sobtada. Una altra variació, H558R, està present en el 20% de la població caucàsica.¹⁰² Estudis *in vitro* han mostrat que aquesta variació pot modular els efectes de les mutacions en el canal de sodi, millorant la corrent, fins i tot si la mutació i la variació estan localitzades en al·lels diferents. Com que la presència d'arginina (R) millora la funció del canal, vàrem especular que això s'acompanyaria d'una millora en els paràmetres de conducció i en la simptomatologia. Resumint, vàrem fer una investigació de la rellevància clínica de la variant H558R en els pacients amb síndrome de Brugada amb mutació a SCN5A.

Per a aquesta anàlisi vàrem utilitzar estudis d'associació entre el polimorfisme funcional (H558R) amb els paràmetres electrocardiogràfics i els símptomes. Vàrem analitzar l'electrocardiograma dels casos índex consecutius amb una mutació confirmada en el canal de sodi i vàrem excloure de l'anàlisi els membres de les famílies per a evitar que els nostres resultats fossin sesgats per altres factors genètics.

L'edat mitjana de diagnòstic era de 39 ± 15 anys i el 62% eren homes. Els individus amb síncope, mort sobtada o taquicàrdia ventricular sostinguda o fibril·lació ventricular varen ser considerats simptomàtics. Vint-i-quatre individus (30%) tenien símptomes relacionats amb la síndrome de Brugada. La presència de l'al·lel G era de 29%.

Els individus amb el genotip AA tenien més símptomes comparat amb els individus portadors de AG i GG (52% v. 27%, $p= 0.043$). Dels paràmetres electrocardiogràfics, la duració de l'interval QRS en la derivació II era significativament més llarga en el genotip AA que en AG o GG (A: 118 ± 25 ms AG/GG: 105 ± 25 ms, $p= 0.025$). També el signe aVR i l'amplitud de l'ona R' era més gran (aVR signe: AA: 0.77 ± 0.64 AG/GG: 0.47 ± 0.53 , $p= 0.034$; R': AA: 2.6 ± 1.2 mV AG/GG: 1.7 ± 1.3 mV, $p= 0.007$) en el genotip AA com era també l'amplitud de l'elevació del punt J (AA: 0.48 ± 0.24 mV AG/GG: 0.35 ± 0.19 mV, $p= 0.018$) i la ràtio QRS/QTc ràtio a la derivació II (AA: 0.28 ± 0.06 AG/GG: 0.25 ± 0.05 , $p= 0.004$) (**TAULA 13**).

TAULA 13.

Paràmetres electrocardiogràfics i símptomes comparant els genotips.

N= 73	AA (HH)	AG (HR) or GG (RR)	p
Símptomes	52%	27%	0.043
PR II	202 ± 50 ms	190 ± 29 ms	0.201
PR V ₂	198 ± 49 ms	184 ± 30 ms	0.164
QRS II	118 ± 25 ms	105 ± 25 ms	0.025
QRS V ₂	120 ± 28 ms	111 ± 22 ms	0.114
QTc II	417 ± 38 ms	426 ± 46 ms	0.342
QTc V ₂	432 ± 41 ms	435 ± 54 ms	0.758
“signe aVR”	0.77 ± 0.64	0.47 ± 0.53	0.034
amplitud R'	2.6 ± 1.2 mV	1.7 ± 1.3 mV	0.007
punt J V ₁₋₃	0.48 ± 0.24 mV	0.35 ± 0.19 mV	0.018

FACTORS EXTERNS.

Semblant al que succeeix en la síndrome de QT llarg, la síndrome de Brugada té formes congènites i adquirides (o induïdes); aquestes darreres han estat identificades fa pocs anys. A més dels bloquejants de canal de sodi i la febre, agents vagotònics,³⁷ agonistes α ,¹⁰³ β bloquejants,¹⁰³ antidepressius tricíclics,¹⁰⁴,¹⁰⁵ antihistamínics,¹⁰⁶ cocaïna^{60, 107, 108} i anestèsics¹⁰⁹ han mostrat que poden desencadenar un patró electrocardiogràfic de síndrome de Brugada o empitjorar l'elevació del segment ST en els pacients amb la síndrome.¹⁰³ Alguns d'aquests pacients han sofert també arítmies malignes, suggerint que, o bé aquests malalts tenen una mutació genètica que els predisposa a la síndrome, o l'electrocardiograma és un indicador d'instabilitat elèctrica i un risc d'arítmia tant en les formes familiars com en les no familiars. La identificació de força casos de síndrome de Brugada induïda ens ha permès fer un seguiment clínic d'aquests malalts, determinar quins són els factors externs més importants en la malignitat i si hi ha factors genètics que predisposen als casos induïts.

Per a la investigació dels factors externs predisposants a la síndrome, vàrem recollir 40 casos. En 13 d'aquests pacients l'electrocardiograma va aparèixer durant un episodi febril, en 22 durant l'administració d'un medicament o droga (cocaïna, anestèsics, antiarítmics, antidepressius) i en 5 per una alteració electrolítica. No vàrem poder aconseguir mostres d'ADN de tots els casos i per tant es va fer anàlisi genètica en 19 individus, dels quals tres tenien una mutació en el canal de sodi i que es descriuen seguidament.

a- Fenotip identificat després de l'administració de Bupivacaina.

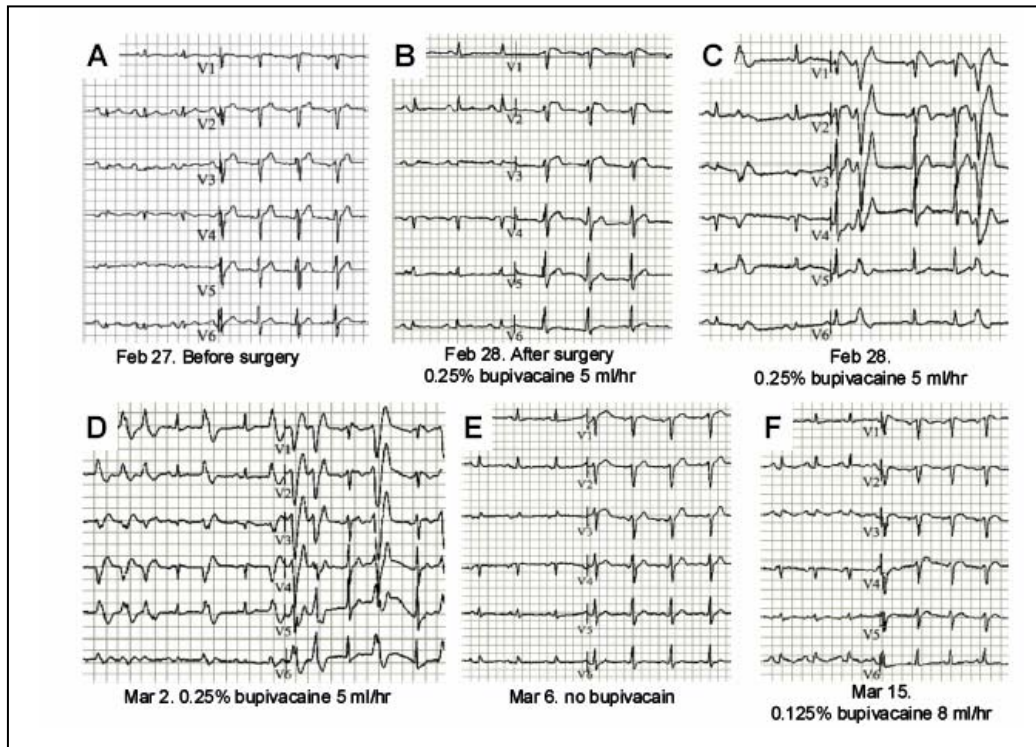
La Bupivacaina es un anestèsic potent, recomanat per a la infiltració subcutània, i l'anestesia radicular i epidural. Bloqueja la formació i conducció

d'impulsos nerviosos mitjançant la inhibició de la corrent de sodi en les membranes nervioses. El resultat és un enlentiment de la propagació de l'impuls i un enlentiment en l'activació i formació del potencial d'acció a la membrana nerviosa. Quan s'administra adequadament la bupivacaina té pocs efectes secundaris, però pot produir arítmies ventriculars i depressió cardíaca quan s'administra a nivells tòxics.¹¹⁰

Un home de 56 anys va ser sotmès a una intervenció quirúrgica d'un pulmó. L'electrocardiograma abans de l'operació mostrava un ritme sinusal amb una freqüència de 90 ppm amb canvis no específics de l'ona T i dilatació auricular. Les analítiques eren normals. Abans de la inducció anestèsica, es va col·locar un catèter peridural i es va començar una infusió de bupivacaina 0.25%. En el postoperatori mostrava un patró de bloqueig de branca dreta, elevació de segment ST en les precordials dretes, típic de síndrome de Brugada. A mesura que passaven les hores l'elevació del segment ST es va fer més evident, així com la presència d'arítmies ventriculars, que varen desencadenar una tempesta elèctrica. Cinc dies més tard, el catèter peridural va ser retirat per obstrucció i, sorprenentment, les arítmies van cedir.

Quatre dies més tard es va realitzar una nova operació quirúrgica que va necessitar de nou l'administració de bupivacaina, aquesta vegada a la meitat de concentració que l'anterior. Va sortir de nou el patró electrocardiogràfic (**FIGURA 35**).

FIGURA 35.
ECGs en el pacient que va rebre bupivacaïna.



L'anàlisi genètica va revelar una nova mutació *missense* (G1743E) en la subunitat α del canal de sodi SCN5A. Aquesta mutació està localitzada entre els segments 5 i 6 del domini IV, en una zona altament conservada. No hi havia cap altra variació en els exons codificants de SCN5A. Com a part del seguiment rutinari en un pacient amb síndrome de Brugada, la família va ser investigada. Només un dels germans va estar d'acord a participar. El germà tenia un electrocardiograma basal positiu, i tenia també la mateixa mutació, confirmant per tant que es tractava d'una malaltia familiar. Aquest era el primer cas de síndrome de Brugada induït i genèticament determinat i que havia estat desemmascarat amb l'ús d'un anestèsic bloquejant dels canals de sodi.

(FIGURA 36)

FIGURA 36. Electroforetograma del pacient índex.

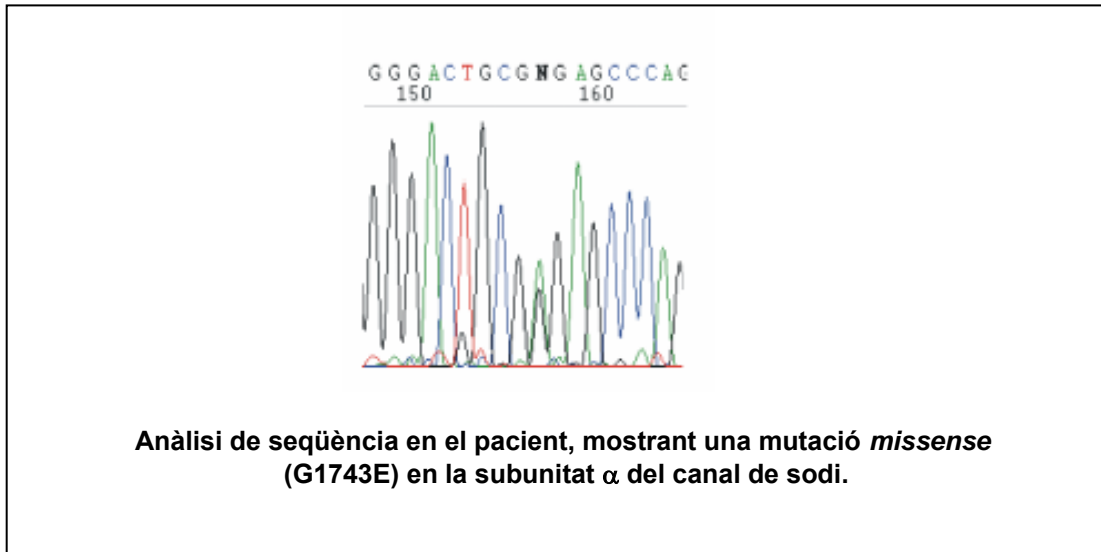
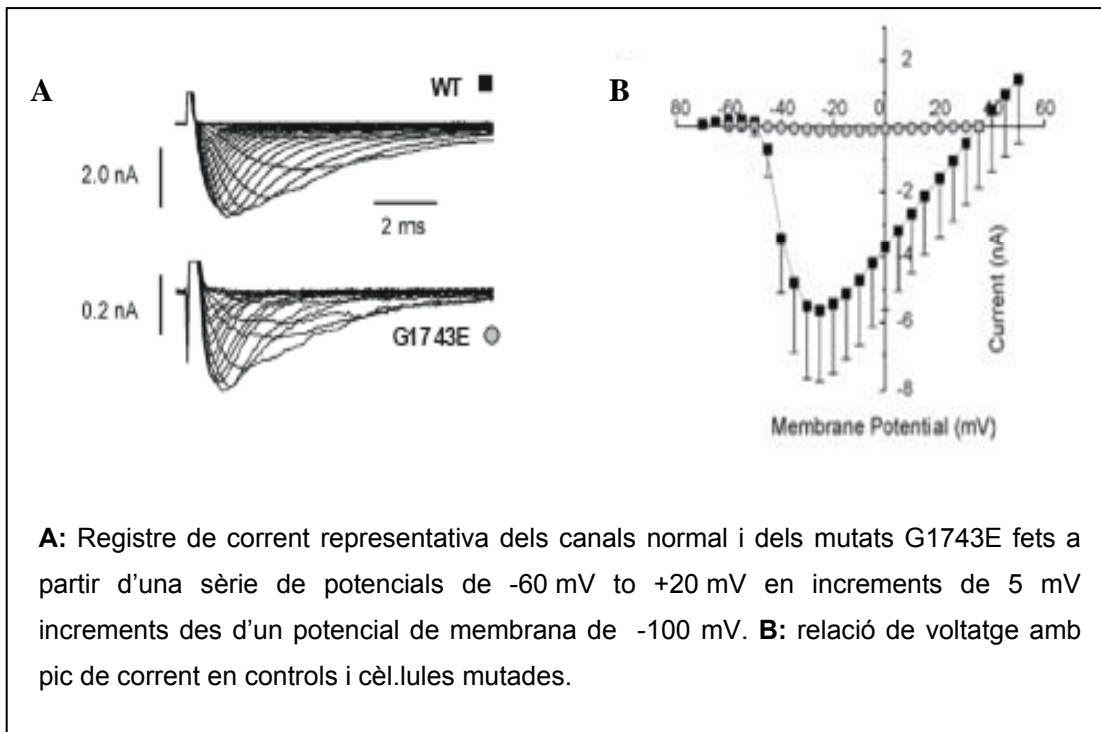


FIGURA 37. La mutació G1743E redueix l'expressió de $\text{Na}_v1.5$.

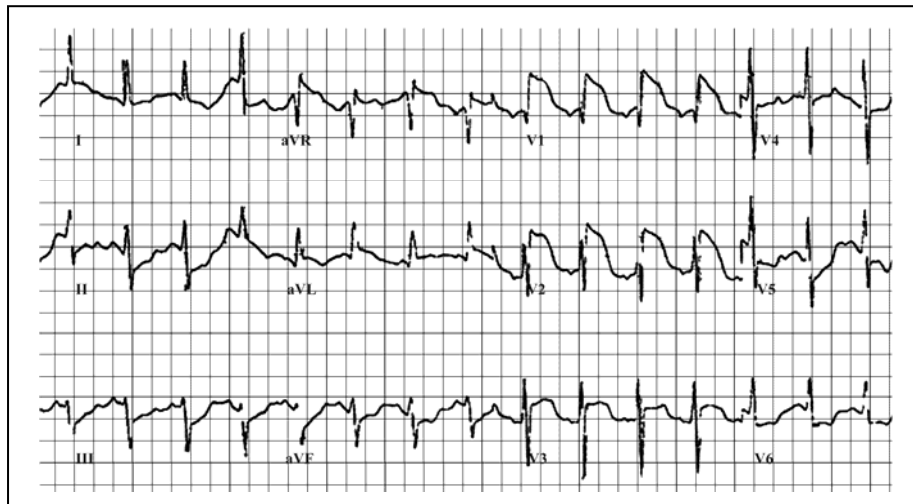


b- Fenotip identificat després de l'administració de lidocaïna.

Un home de 45 anys sense història prèvia de malaltia cardíaca es va presentar a urgències després d'una crisi convulsiva. El seu electrocardiograma inicial no presentava alteracions electrocardiogràfiques típiques de síndrome de Brugada, però durant la seva estada es va tornar agressiu i va patir una taquicàrdia monomòrfica amb QRS ample. Es va administrar lidocaïna (bolus de 70mg seguit per una infusió de 1 mg/min i es va desenvolupar un patró electrocardiogràfic de síndrome de Brugada. Els marcadors cardíacs varen ser negatius i sense evidència d'infart de miocardi. (FIGURA 38).

FIGURA 38.

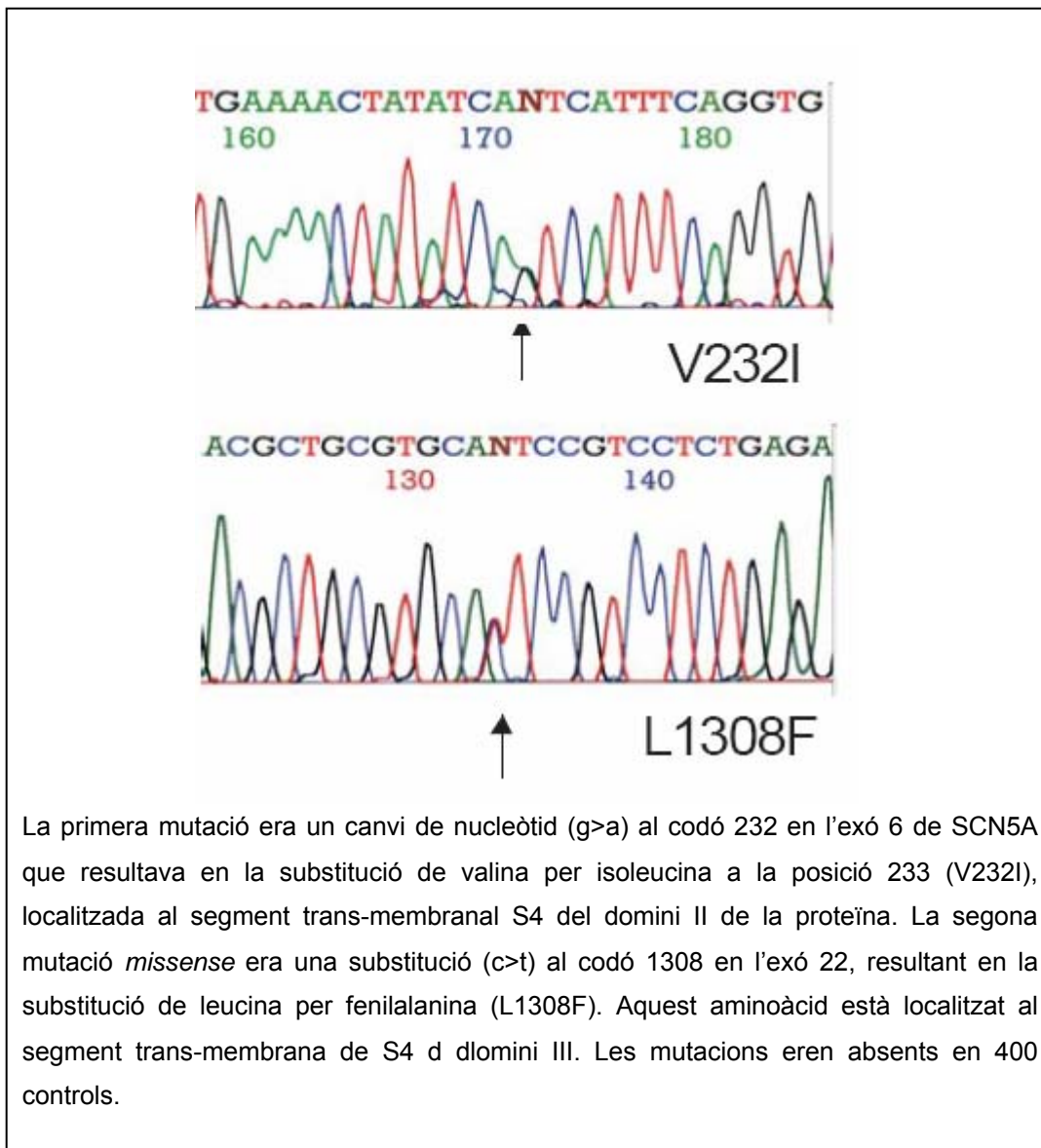
Electrocardiograma després de l'administració de lidocaïna.



Anàlisi Genètica.

La seqüenciació genètica va revelar una doble mutació al canal de sodi SCN5A, mutacions V232I i L1308F. (FIGURA 39).

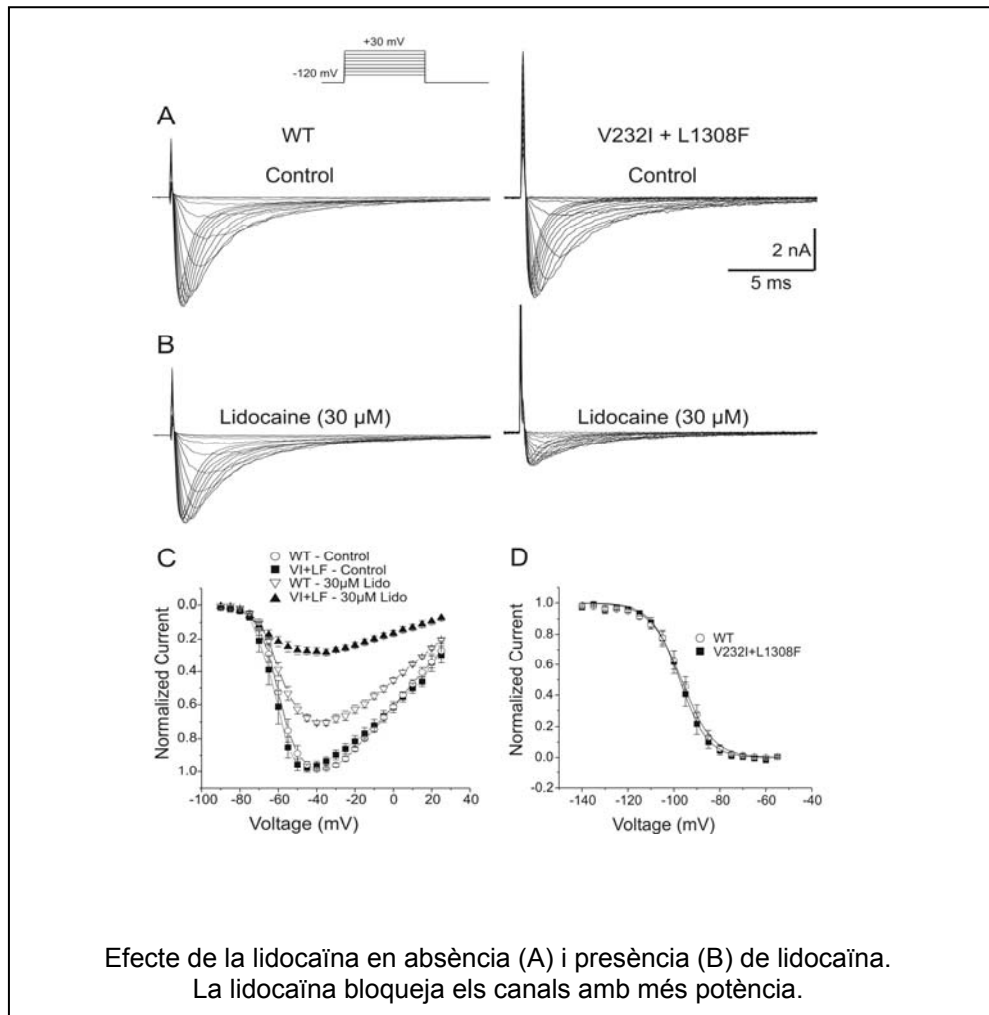
FIGURA 39. Seqüenciació genètica amb doble mutació a SCN5A.



Anàlisi biofísica.

Les anàlisis biofísiques varen mostrar que les mutacions V232I i L1308F no produïen cap canvi significatiu en la relació corrent-voltatge, que coincidia amb el fet que el malalt presentava un electrocardiograma normal en condicions basals. La presència de lidocaïna però causava una marcada reducció en la corrent de sodi en els canals mutats respecte els normals. (FIGURA 40).

FIGURA 40. Efecte de la lidocaïna en la relació corrent-voltatge.



c- Fenotip identificat després de l'administració d'amiodarona.

Un pacient de 30 anys es va presentar a urgències amb història de crisis convulsives repetitives i d'aturades respiratòries mentre dormia. L'electrocardiograma mostrava fibril·lació auricular amb una resposta ventricular de 70 bpm. Va rebre una infusió d'amiodarona durant la qual el malalt va desenvolupar una fibril·lació ventricular que va ser cardiovertida a ritme sinusal amb un xoc de 300 Joules. L'electrocardiograma va revelar una elevació del segment ST a les derivacions inferiors i una elevació *saddle back* a V2 (**FIGURA 41**). No tenia factors de risc cardiovasculars significatius, i no tenia història familiar de mort sobtada. La coronariografia va ser normal i la prova de flecainida va mostrar una elevació diagnòstica en les precordials dretes i en les derivacions inferiors (**FIGURA 42**). Durant l'estudi electrofisiològic l'individu va ser induïble, pel que se li va implantar un desfibril·lador. L'individu ha tingut quatre xocs apropiats en els darrers 3 anys.

FIGURA 41. Electrocardiograma a l'admissió (a) i després de retornar a ritme sinusal (b).

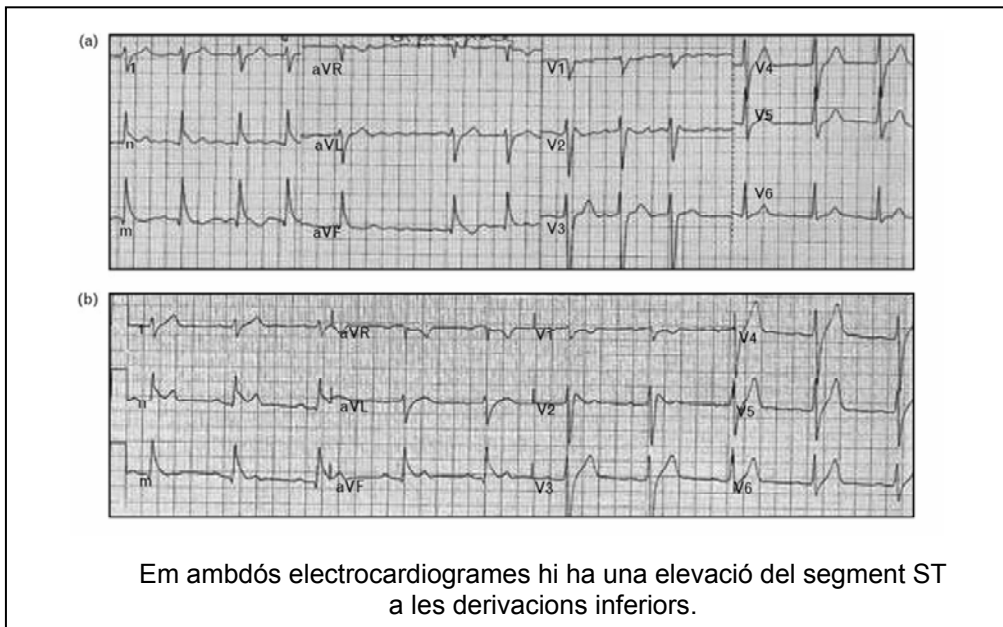
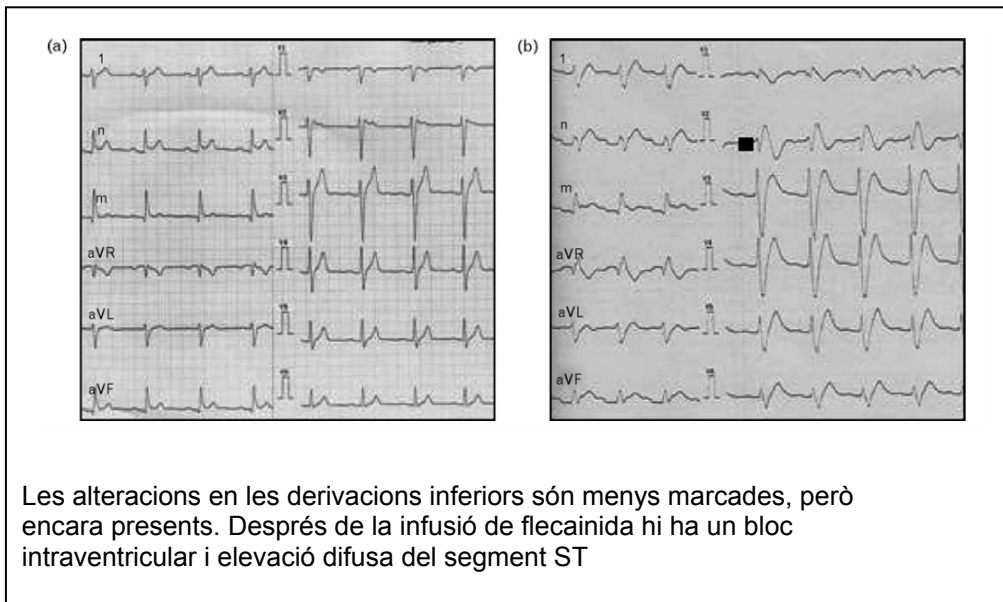


FIGURA 42. Electrocardiograma abans i després de la infusió de flecainida.



Anàlisi Genètica

L'anàlisi genètica va mostrar una mutació *nonsense* (R179X) a l'exó 5 de la subunitat alpha del canal de sodi SCN5A. Aquesta mutació no estava present en 300 controls. Degut al truncament prematur de la proteïna, l'efecte biofísic era probablement el de pèrdua de funció, per tant insuficiència d'haplotip.

DISCUSSIÓ

La síndrome de Brugada és una malaltia que causa mort sobtada sobretot a la gent jove. La malaltia es hereditària, autosòmica dominant, hi ha un risc de transmissió de pares a fills i per tant porta implicacions molt importants, especialment també de caire psicològic, per als membres de la família.³³ S'ha vist que un subgrup de pacients amb la síndrome, al voltant del 20%, tenen mutacions en la subunitat alfa del canal de sodi cardíac SCN5A.^{23, 40} Les anàlisis biofísiques de les mutacions han mostrat que aquestes provoquen una pèrdua de corrent majoritàriament per una pèrdua de funció o una inactivació més ràpida. El tractament dels pacients simptomàtics no genera cap dubte, requereixen la implantació d'un desfibril·lador. Hi ha però molta controvèrsia en el grup d'asimptomàtics. Hi ha investigadors que aconsellen el seguiment i d'altres que suggereixen l'estratificació del risc mitjançant l'estudi electrofisiològic.^{67, 68}

Des que hi ha la possibilitat de fer un test genètic a la malaltia s'ha generat un nou grup d'individus, el dels portadors genètics asimptomàtics, que ha esdevingut el més complex de tractar. En aquest grup hi sol haver gent jove, normalment els fills i germans d'un afectat. La identificació d'una mutació comporta discussions i decisions difícils per als metges i per a la família.¹¹¹

La presència d'una mutació associada a una malaltia indica que aquests individus tenen un risc de patir-la. Però en la síndrome de Brugada, amb una penetrància del 32%, hi ha molt dubtes de si els portadors asimptomàtics requereixen tractament agut o s'ha d'esperar a que desenvolupin símptomes. Molts metges, davant la incertesa de les proves clíniques (i la certesa de la prova genètica), han optat per protegir els portadors asimptomàtics amb un desfibril·lador. Aquesta ha estat una decisió aleatòria, sense cap fonament científic, ja que no hi ha hagut estudis que recolzin aquesta actitud. Cal tenir en

compte que molts dels afectats són nens i la implantació d'un desfibril·lador els comporta cirurgies cada 4-5 anys amb risc d'infeccions i xocs inapropiats.

Hi ha un altre subgrup que també és problemàtic, els individus que desenvolupen el patró electrocardiogràfic durant un problema agut com la febre o durant la ingesta d'un medicament o droga. Encara hi ha dubtes de si la presència del patró és un indicador de malaltia genètica o de risc de mort sobtada.

En aquest treball hem volgut contestar algunes d'aquestes preguntes i hem recollit centenars de pacients i malalts. L'objectiu era sobretot descriure la base genètica de les famílies, investigar les implicacions de ser portador d'una mutació al canal de sodi i intentar comprendre el paper que juguen factors genètics addicionals i factors externs en el fenotip de la malaltia i en el risc de patir mort sobtada.

1- Localització geogràfica de les famílies.

La majoria dels malalts han estat localitzats a la societat occidental, malgrat que la malaltia sembla ser més endèmica al Sud-est asiàtic. Hi ha diferents raons per aquest fet, des de raons econòmiques d'extraure sang i transportar-la, fins a raons legals, ja que hi ha països que no permeten que surti sang del seu territori. Aquest darrer fet ens ha impedit per exemple l'estudi de poblacions xineses. Tanmateix, la presència cada vegada més nombrosa d'individus en la població occidental ens ha permès acumular suficients casos i també ens permet de tenir una població ètnicament més homogènia.

2- Tipus de mutació i símptomes.

Hem identificat 73 mutacions en el canal de sodi en 350 famílies consecutives. Hem volgut fer una correlació entre el tipus de mutació i la simptomatologia a diferents nivells, i hem mostrat les dades següents:

a) Localització de la mutació en la proteïna.

L'estudi de les mutacions ens suggereix que no hi ha cap predominança de mutacions en uns segments de la proteïna, sinó que les mutacions estan tant a segments inter-membrana com a intra i extra-citoplasmàtics. Igualment, a diferència del que s'ha vist en la síndrome de QT llarg, a on la localització de les mutacions en el gen sembla estar associada a un risc més elevat de mort sobtada, en la síndrome de Brugada no hem observat cap correlació entre la severitat de la malaltia i la localització de la mutació.

b) Efecte biofísic.

Haviem proposat la hipòtesi que els individus amb un truncament complet de la proteïna, o una pèrdua total de funció, tindrien més símptomes i mort sobtada. Això venia recolzat pel fet que la pèrdua progressiva de funció en mutacions sensibles a la temperatura està associat a augment del segment ST i a més aparició d'arítmies malignes. En el nostre cas hem trobat que el 20% de les mutacions creen un codó d'stop, però la nostra hipòtesi s'ha complert només parcialment. Els malalts amb una mutació de truncament tenen un PR més llarg i per tant més alteració en la conducció, però aquest fenotip més sever no es tradueix en més símptomes. Les raons per la manca d'efecte en la simptomatologia poden ser multifactorials: 1) que una pèrdua de funció parcial sigui tan maligna com una pèrdua total; 2) que una alteració parcial sigui més aritmogènica pel fet que pugui ser més modulada per factors externs, autonòmics o drogues que una pèrdua total; 3) que la pèrdua total de funció des

del naixement comporti una compensació de la funció de l'al·lel no mutat. Aquestes serien explicacions biològiques, però tampoc cal oblidar que hi ha una altra possibilitat, que és una limitació del nostre treball. La majoria de les mutacions *missense* no han estat estudiades biofísicament i per tant és possible que algunes d'elles comportin també una pèrdua total de la funció del canal i que dilueixin els resultats. Com a resum per tant, en la síndrome de Brugada, la localització o el tipus de mutacions no sembla que tinguin cap valor predictiu per l'estratificació de risc.

c) Mutacions intròniques.

La majoria de les mutacions que causen la síndrome de Brugada estan localitzades als exons. Només una ha estat prèviament descrita a la zona de *splicing* de l'intró 7, però no hi ha hagut mai estudis funcionals per a determinar si afecta la formació de la proteïna.²³ En aquest treball descrivim la primera família amb una mutació intrònica estudiada funcionalment. Hem identificat una família en la qual l'anàlisi de lligam i per haplotips ens indicava que estava associada a SCN5A, però sense mutació als exons. Després de trobar la mutació intrònica hem comprovat que la disfunció del canal ve causada per l'activació d'un lloc de *splicing* diferent, forçat per una mutació en la zona de reconeixement de l'*splicing*.

El *splicing* correcte del pre-mRNA és un pas crític en l'expressió genètica en eucariotes i depèn del reconeixement de les zones 5' i 3' de *splicing* als límits intró-exó. Hi ha una estimació que el 15% de les malalties hereditàries són causades per errors en el *splicing* degut a mutacions en les zones de *splicing* o en seqüències de control de *splicing*¹¹². L'*splicing* adequat en els límits exó-intró és imprescindible per al desenvolupament adequat del mRNA. La zona de *splicing* és reconeguda pels aparells de *splicing* basant-se en la presència d'una seqüència de consens que està formada per nou nucleòtids parcialment

conservats al límit exó-intró. ¹¹³ L'alteració de la zona de *splicing* autèntica per una mutació pot activar zones de *splicing* críptiques que poden causar una truncació del mRNA. La zona críptica serà seleccionada d'acord a la seva similitud amb una seqüència de consens. Les anàlisis estadístiques han indicat que la puntuació més alta en la seqüència de consens està present en la zona de *splicing* autèntica, però que el valor pot ser disminuït, per sota el de la zona críptica, per una mutació, com en aquest cas. Aquest factor determinarà que la zona escollida per *splicing* sigui la críptica. ¹¹³

Hi pot haver patrons de *splicing* diferents causant per una mutació en una zona donadora: oblidar un exó, retenció d'un intró, o ús d'una zona de *splicing* alternativa. ¹¹³. Malgrat que la majoria d'aquests *splicings* alternatius no són caracteritzats a nivell de mRNA, alguns estudis han mostrat que només el 42% de les zones de *splicing* conserven el marc de lectura genètica. Les mutacions que causen una alteració en el marc de lectura normalment causen una degradació del mRNA abans que aquest sigui traduït. ¹¹³ L'efecte de les delecions que mantenen el marc és difícil de predir. En el cas exposat, i pel fet de tractar-se d'un canal iònic, hem pogut fer anàlisis funcionals de corrents i hem demostrat que, malgrat mantenir el marc de lectura, es perden porcions de dos segments i es crea un canal no funcional, que descriu un nou mecanisme molecular per la disrupció del canal de sodi en la síndrome de Brugada.

Implicacions de les mutacions intròniques:

Hi ha moltes malalties causades per mutacions intròniques. És interessant que aquestes mutacions poden afectar l'*splicing*, fins i tot si estan col·locades a centenars de bases de la zona de *splicing*.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Aquest és un fet important, doncs és possible que hi hagi més mutacions intròniques en la síndrome de Brugada però que no han estat identificades per un problema econòmic i de tecnologia; l'anàlisi d'introns és poc assequible degut a la grandària del gen que

codifica SCN5A. Tanmateix, el fet que les mutacions intròniques puguin ser responsables de la síndrome de Brugada implica que les mutacions a SCN5A puguin representar més del 20% actualment descrit.

3- Correlació fenotip-genotip.

Per a la realització d'estudis de correlació de genotip-fenotip es requereix un nombre important d'individus genotipats. La síndrome de Brugada està causada per defectes al canal de sodi només en un 20%, per tant s'han hagut de recollir i analitzar centenars de famílies per a tenir dades suficients per a l'anàlisi. Hem considerat important l'estudi de dues cohorts de portadors diferents, la dels casos índex, per a fer estudis d'associació; i la de tota la població amb mutacions al canal de sodi, que ens ha permès d'investigar la validesa de les proves clíniques, com el test d'ajmalina o els paràmetres electrocardiogràfics, utilitzant sempre la prova genètica com a *gold standard*. No és clar encara que sigui la prova genètica el test per predir la validesa de les altres proves, però hem pensat que és el més encertat tal com s'interpreten els resultats genètics en la síndrome en l'actualitat.

Valor de l'ajmalina en el diagnòstic.

La penetrància en les malalties hereditàries cardíques sense patologia estructural és baixa. En la síndrome de QT llarg es calcula que hi ha una penetrància del voltant del 40%. La síndrome de QT curt és de moment la malaltia amb la penetrància més alta, al voltant del 90%, però estem encara en les fases inicials de descripció de la malaltia i és possible que només estem diagnosticant individus i famílies amb casos clars de la malaltia. En la síndrome de Brugada l'electrocardiograma canvia constantment, i es calcula que, en un 40% dels individus, es pot fins i tot normalitzar. Vàrem fer una anàlisi profunda

de la validesa de l'ajmalina, utilitzant com a *gold standard* la prova genètica. Ens interessava saber, en una malaltia monogènica, si hi havia cap prova clínica adequada per a identificar els individus a risc. La possibilitat de tenir una prova clínica que es correlacionés amb el resultat genètic era per tant interessant des d'un punt de vista diagnòstic.

A l'any 2000 vàrem mostrar que l'aparició de l'elevació del segment ST en les precordials dretes durant la infusió d'ajmalina estava molt ben correlacionada amb la presència d'una mutació al canal de sodi SCN5A. La validesa d'aquest test no ha deixat mai de provocar controvèrsia. Altres investigadors varen dubtar dels resultats indicant que els bloquejants de canal de sodi no eren tan bons com indicàvem. Amb les dades presentades en aquest treball ratifiquem les nostres observacions anteriors. La sensibilitat i especificitat de l'ajmalina en portadors de mutacions a SCN5A és de 80% i 94% respectivament. L'ajmalina augmentava la penetrància d'un 32 a un 78%, confirmant la seva validesa per a la identificació d'individus a risc.

Paràmetres electrocardiogràfics.

La síndrome de Brugada té un patró electrocardiogràfic molt característic, l'elevació del segment ST a les precordials dretes tipus convexa. Però hi poden haver també elevacions més dubtoses del segment ST. Aquests altres patrons (tipus II i III) estan presents en molts dels individus, sense ser diagnòstics de la malaltia. Igualment, com que la malaltia va ser originàriament descrita com a síndrome de bloqueig de branca dreta, elevació persistent del segment ST i mort sobtada, la presència de bloqueig complet i incomplet en un familiar, s'ha cregut que suggeria que aquest era portador genètic.

En les 4 famílies més grans vàrem fer una valoració de la presència d'alteracions electrocardiogràfiques, comparant els portadors de la mutació amb els no portadors. Hem mostrat que en una família amb la síndrome de Brugada,

l'electrocardiograma basal té una validesa limitada si no hi ha elevació del segment ST. Només es pot fer el diagnòstic quan hi ha l'elevació convexa del ST. En les famílies estudiades, 32% dels portadors de la mutació a SCN5A tenien el patró basament. També hem confirmat que es pot sospitar que una persona és portadora si té una prolongació de l'interval PR o una elevació en *cadira de muntar* o tipus II, que estava present en el 19% dels portadors. Però aquestes alteracions poden estar presents en la població general i poden confondre el diagnòstic. Es aquests casos s'aconsella la realització d'altres proves per confirmar el diagnòstic. Finalment, mentre que el bloqueig de branca dreta complet només estava present en portadors de la mutació, el bloqueig incomplet o alteracions intraventriculars de la conducció són molt freqüents en la població normal indicant que no poden ser utilitzats per a identificar possibles portadors.

Expressivitat de la canalopatia.

Les mutacions en el canal de sodi SCN5A no només causen la síndrome de Brugada sinó també de la malaltia de conducció familiar i de la síndrome de QT llarg tipus III. Es molt freqüent veure en una mateixa família la presència de les tres malalties. Les decisions terapèutiques en aquests casos són complexes ja que una mateixa teràpia pot protegir uns i perjudicar els altres. Per exemple en aquells membres que tenen prolongació de l'interval QT, aquest pot ser millorat amb mexiletina o flecainida, però l'ús de bloquejant de sodi està contraindicat en famílies amb mutacions causants de síndrome de Brugada ja que poden desencadenar arítmies. Igualment, la quinidina pot ser recomanada en la síndrome de Brugada, però els efectes de prolongació de l'interval QT podrien ser contraproductius en les famílies amb síndrome de QT llarg. Finalment la malaltia de la conducció podria beneficiar-se de la implantació d'un marcapàs sense desfibril·lador, però hi ha un risc elevat que algun d'aquests malalts

puguin tenir una síndrome de Brugada latent i faci una mort sobtada per una taquiarítmia, per tant no recuperable amb marcapàs. Amb la descripció del solapament de diagnòstic demostrem que cal fer un anàlisi clínic exhaustiu dels portadors, i que un determinat tractament pot no ser vàlid per a tothom.

Risc per a un portador d'una mutació al canal de sodi.

Hem analitzat 95 individus amb mutacions al canal de sodi. Aquests individus pertanyen a 73 famílies en les quals hi ha almenys un cas índex amb síndrome de Brugada. Hem decidit fer un seguiment d'individus portadors, una història natural, perquè ens acostava més a la realitat de la pràctica mèdica, quan la família consulta després d'una mort sobtada o del diagnòstic de la malaltia. Hem fet una valoració del risc dels membres de la família que han estat investigats genèticament i són portadors de la mutació. Hem demostrat que la presència de la mutació no està lligada a una mortalitat més elevada si no hi ha algun paràmetre clínic que suggereixi aquest risc. Així, els individus que han fet una arítmia maligna o mort sobtada són els que tenien o un electrocardiograma basal anormal, (prolongació de l'interval QT o elevació del segment ST). Això indica que una mutació del canal de sodi hauria de ser considerada un factor de risc, un resultat que justifica que la persona sigui seguida d'aprop a la consulta, que ens permeti adoptar mesures preventives (com prevenir la febre i evitar bloquejants de sodi), potser fins i tot que determini que l'individu ha de ser investigat més a fons per saber si està en risc. Però la presència només d'una mutació no justifica, d'acord amb les dades, que es prenguin mesures terapèutiques com la implantació d'un desfibril·lador. Les dades mostren que el risc del malalt ha de definir-se a partir de les proves clíniques.

4- Determinants del fenotip

Hem mostrat en aquest treball que el grau d'alteració del canal de sodi pot ser determinant en la presència del fenotip i en el risc de mort sobtada. La corrent de sodi pot ser influenciada sobretot per drogues i per la base genètica de l'individu. Els medicaments que bloquegen el corrent de sodi no causen un patró electrocardiogràfic de síndrome de Brugada a tothom qui els pren, suggerint que hi ha un component genètic important. Hem mostrat però tres casos a on hi ha una combinació de genètica i medicament que és suficient per a que l'equilibri es trenqui i la persona desenvolupi el patró electrocardiogràfic i fins i tot pateixi arítmies malignes.

Modificadors genètics.

Hi ha hagut ja algunes publicacions que han mostrat que hi ha una relació entre el grau d'alteració de la corrent de sodi i el fenotip final. Per exemple, individus homozigots per una mutació al canal de sodi tenen un fenotip més sever.⁹⁷ La presència d'una doble mutació pot ser responsable de formes severes de malaltia del sinus,²⁹ de l'alteració de la conducció familiar,⁹⁸ o d'estar associat a un fenotip més sever que en els familiars amb una sola mutació.⁹⁹ El paper dels polimorfismes i la seva associació amb la mort sobtada ha estat també suggerida per la identificació de polimorfismes lligats a un risc més elevat d'arítmies malignes¹⁰⁰ i també pel risc afegit d'arítmies que tenen els individus amb una mutació i un polimorfisme funcional addicional.^{89, 99} En la síndrome de Brugada no s'ha investigat a fons la correlació entre el nivell de disfunció del canal de sodi i els símptomes, malgrat que les dades observacionals indiquen que segurament els individus que fan la mort sobtada tenen la corrent de sodi més alterada.

Presència de dues mutacions.

En aquesta tesi hem descrit el primer cas de síndrome de Brugada a on el fenotip només és observat quan s'hereten dues mutacions, recolzant la hipòtesi que la disfunció per mutacions genètiques està directament associada a la gravetat del fenotip. Els portadors d'una única mutació, avis i filles, no presenten un electrocardiograma amb elevació del segment ST a les precordials dretes. L'anàlisi indica que el pare va heretar una mutació de cada avi, i per tant estaven col·locades en al·lells diferents, i va transferir una mutació diferent a cada filla.

Les anàlisis biofísiques han revelat que els canals mutats P336L causen una reducció del 75% en la corrent de sodi comparat amb el normal. Els canals mutats I1660V produïen poca corrent que podia ser recuperada amb la incubació de les cèl·lules a temperatura ambient o amb l'exposició a bloquejants del canal de sodi. La mexiletina era la droga que més efectivament recuperava la corrent fins pràcticament normalitzar-la, indicant que els canals mutats I1660V són funcionals però queden atrapats en el reticle endoplasmàtic, un fenomen que ha estat prèviament descrit en altres mutacions.^{80, 81} Els mecanismes pels quals aquests canals queden atrapats a l'interior cel·lular i poden ser recuperats amb drogues o temperatura són desconeguts. Una explicació possible és que la droga estabilitzi la proteïna i atenuï els canvis conformacionals causats per la mutació. El fet que la mexiletina sigui la més efectiva pot també estar relacionat amb el fet que aquesta tingui l'habilitat de potenciar millor la interacció entre els canals mutats i les subunitats β .

Es creu que hi ha factors diversos que determinen l'expressió fenotípica d'aquesta canalopatia. En la síndrome de Brugada el gènere juga segurament un paper important, doncs hi ha més homes que dones afectats malgrat que la malaltia és autosòmica dominant. Un altre factor podria ser el de l'edat, ja que les filles són molt més joves que el pare. Aquests dos factors són difícils de

justificar en el cas de l'avi, que també té una mutació en el canal de sodi, però que té un fenotip completament normal.

Variacions normals i efecte en el fenotip.

Molts estudis biofísics anteriors han mostrat que, per a la caracterització correcta de les mutacions, s'ha de tenir en compte la presència de polimorfismes en el gen, ja que poden modificar significativament la corrent de sodi.^{92 82} Viswanathan et al.⁹³ també van demostrar que el polimorfisme H558R millorava la funció de les mutacions properes.¹⁰¹

Basant-nos en l'efecte protector de l'arginina a la posició 558 en les mutacions del canal de sodi, hem volgut analitzar l'efecte tant a nivell de paràmetres electrocardiogràfics com a nivell de símptomes. La presència de la mutació sense l'arginina ha estat associada a una prolongació més important del QRS, més alteracions en la repolarització (punt J més elevat en les precordials dretes), i un signe AVR més alt. Aquests pitjors paràmetres de conducció i repolarització estan associats a una prevalença més alta de símptomes indicant que la variant H558R és un modulador del fenotip de la síndrome de Brugada. Seria especulatiu en aquest punt pensar que aquest paràmetre ens podria servir per estratificar el risc de mort sobtada, però confirma la hipòtesi del paper de les variacions normals en la modulació del fenotip final d'una malaltia.

Modificadors externs. Interacció medicament-genètica.

Es creu que l'elevació del segment ST i la inestabilitat elèctrica del miocardi poden ser el resultat d'una alteració en l'equilibri de corrents durant la fase 1 del potencial d'acció. Els agents vagotònics, els activadors de I_{K-ATP} , i els nivells elevats de potassi poden facilitar aquesta alteració per l'augment de les corrents externes de potassi, mentre que els bloquejants de sodi, com la cocaïna i els antidepressius ho fan a través d'una reducció de les corrents d'entrada de

sodi.¹¹⁷ La pèrdua de funció al canal de sodi SCN5A degut a les mutacions, canvia el balanç de la corrent a fase 1 degut a la disminució de la corrent de sodi. Un estat febril també pot facilitar l'aparició de l'elevació del segment ST en la síndrome de Brugada degut a la seva capacitat per a reduir la corrent de sodi.

En els casos induïts per drogues, no hem investigat si els individus tenen una alteració genètica en els mecanismes de metabolisme de les drogues. Això és un treball que depassa les nostres intencions originals i que seria més d'acord a un projecte de farmacogenòmica. Però hem desenvolupat la hipòtesi que els individus que han tingut una resposta amb elevació del segment ST, tenen una corrent basal disminuïda genèticament. Aquesta era una hipòtesi que ja havia estat desenvolupada en la síndrome de QT llarg i que va donar lloc al terme de **reserva de repolarització**,¹¹⁸ que definia el nivell d'alteració a les corrents de repolarització que era possible tenir abans que la persona desenvolupés un fenotip de QT llarg. Es va veure que aquesta reserva de repolarització era més baixa en individus amb mutacions als canals de potassi, i que desenvolupaven l'allargament del QT quan estaven sota medicaments que disminuïen aquestes corrents. Vàrem recollir 47 individus amb alteracions típiques de síndrome de Brugada durant la ingestió de medicaments o un episodi febril. Hem vist que pràcticament la meitat, 23, varen fer una arítmia maligna o mort sobtada poques hores després de documentar l'ECG, indicant que la presència d'un electrocardiograma anormal en una situació aguda és una urgència mèdica. Hem pogut analitzar un subgrup d'aquests malalts i hem trobat que, en un 20%, hi ha alteracions genètiques que redueixen la corrent de sodi. Aquest fet, sumat a la presa de medicaments que bloquegen el canal de sodi, és suficient per a que el pacient desenvolupi el patró electrocardiogràfic i també les arítmies. Un cas molt interessant es el de la bupivacaïna, un anestètic molt utilitzat. Ja hi havia hagut abans una publicació d'un cas que va desenvolupar

l'electrocardiograma durant la infusió peridural de bupivacaïna. En aquest cas però, no hi varen haver arítmies.¹⁰⁹ No es va fer anàlisi genètica. Com ocorre amb la flecainida o l'ajmalina, bloquejants de sodi utilitzats per al diagnòstic de síndrome de Brugada, la bupivacaïna també inhibeix la corrent de sodi.¹¹⁹ Les dades experimentals han mostrat que la bupivacaïna pot facilitar l'aparició d'arítmies per reentrada perquè enlenteix la conducció i allarga el període refractari efectiu ventricular.

És la presència d'elevació del segment ST una indicació de mort sobtada imminent?

Davant la dificultat òbvia de tenir un electrocardiograma en els pacients amb síndrome de Brugada just abans de fer una arítmia maligna, no existeix cap evidència directa que el nivell de ST estigui associat amb millor o pitjor pronòstic, especialment perquè hi ha una variabilitat molt gran en el patró electrocardiogràfic. Tanmateix hi ha hagut moltes observacions interessants en aquest sentit que ens donen una evidència indirecta que l'aparició de l'elevació del segment ST pot ser un precursor d'arítmies malignes posteriors.

- Els pacients amb el patró anormal basalment tenen un pronòstic pitjor que els que requereixen un bloquejant de sodi per a desemmascarar-lo.⁶⁹
- L'aparició del patró durant la febre o durant la recuperació després de l'exercici pot estar associat amb l'aparició d'arítmies malignes.¹²⁰
- Les formes induïdes per drogues han estat associades amb arítmies malignes. Hi ha moltes medicacions que poden causar el patró electrocardiogràfic. En alguns casos es requerirà una sobredosi de la droga (cocaïna, antidepressius tricíclics)¹⁰⁵ però en altres circumstàncies és possible que només es necessiti una dosi terapèutica si els pacients tenen una predisposició genètica a una disminució de la corrent de sodi. Això ho mostrem

en els tres casos de pacients que reben drogues antiarítmiques i que desenvolupen el patró electrocardiogràfic.

Implicacions clíniques

En una situació aguda, els pacients que presenten un electrocardiograma amb elevació del segment ST a les precordials dretes tenen risc d'arítmies malignes i s'hauria de considerar com una urgència mèdica. És per tant imprescindible que en la presència de l'electrocardiograma es prenguin mesures urgents. Algunes d'aquestes mesures poden ser tan senzilles com prendre un antipirètic si el patró apareix en el context d'un episodi febril.

Això també indica que els pacients amb síndrome de Brugada i els familiars que són portadors d'una mutació genètica estan amb risc de patir arítmies si són exposats a alguns medicaments com els antiarítmics i antidepressius que bloquegen el canal de sodi.

CONCLUSIONS

En aquest treball hem investigat la síndrome de Brugada causada per mutacions en el canal de sodi. Hem realitzat les investigacions genètiques i clíniques per a identificar els portadors genètics. Hem també investigat com el component genètic i els modificadors externs modulen el fenotip de la malaltia. Hem pogut demostrar que en la síndrome de Brugada el test genètic té una validesa important per dues raons fonamentals: primer, perquè en una família amb mutació descoberta ens permetrà diagnosticar els no-portadors, amb la qual cosa aquests individus estan lliures de la malaltia familiar; i en segon lloc, perquè amb la identificació de la mutació, podem adoptar mesures preventives també en els portadors asimptomàtics, com és per exemple el tractament precoç de la febre, o l'evitar medicaments que bloquegen el canal de sodi. Només per aquestes dues raons es justifica fer l'anàlisi genètica.

Finalment hem mostrat que ni el tipus de mutació, ni la localització en la proteïna ens permet de fer una estimació de risc de mort sobtada. En l'individu asimptomàtic amb ECG normal la presència d'una mutació és únicament indicativa d'un risc de desenvolupar la malaltia, però no és un fet que la patirà. Malgrat la tendència en ascens de la realització d'estudis genètics, en l'actualitat no sembla justificada aquesta pràctica amb l'únic objectiu de justificar l'agressivitat terapèutica. Els individus asimptomàtics portadors que pateixen símptomes al seguiment presenten alteracions clíniques clares, com una prolongació de l'interval QT o elevació del ST. Aquests paràmetres electrocardiogràfics ja defineixen la necessitat de realitzar probes addicionals o de tractaments preventius. En conclusió, el fet de tenir només una mutació no justifica de moment un tractament més agressiu, sinó que aquest ha de venir determinat pels resultats de les proves clíniques.

BIBLIOGRAFIA

Reference List

- (1) Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH, Mensah GA. Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* 2001 October 30;104(18):2158-63.
- (2) de Vreede-Swagemakers JJ, Gorgels AP, Dubois-Arbouw WI, van Ree JW, Daemen MJ, Houben LG, Wellens HJ. Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival. *J Am Coll Cardiol* 1997 November 15;30(6):1500-5.
- (3) Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation* 1998 November 24;98(21):2334-51.
- (4) Roberts R, Brugada R. Genetic aspects of arrhythmias. *Am J Med Genet* 2000;97(4):310-8.
- (5) Brugada R, Roberts R. The molecular genetics of arrhythmias and sudden death. *Clin Cardiol* 1998 August;21(8):553-60.
- (6) Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000 June 1;525 Pt 2:285-98.
- (7) Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999 May;42(2):377-90.
- (8) Brugada R. Role of molecular biology in identifying individuals at risk for sudden cardiac death. *Am J Cardiol* 2000 November 2;86(9 Suppl 1):K28-K33.
- (9) Wever EF, Robles de Medina EO. Sudden death in patients without structural heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2004 April 7;43(7):1137-44.
- (10) Brugada R, Brugada J, Brugada P. [Genetics and arrhythmias]. *Rev Esp Cardiol* 2002 April;55(4):432-7.

- (11) Roden DM, George AL, Jr., Bennett PB. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995 November;6(11):1023-31.
- (12) Vernoooy K, Sicouri S, Dumaine R, Hong K, Oliva A, Burashnikov E, Timmermans C, Delhaas T, Crijns HJ, Antzelevitch C, Rodriguez LM, Brugada R. Genetic and biophysical basis for bupivacaine-induced ST segment elevation and VT/VF. Anesthesia unmasked Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2006 September;3(9):1074-8.
- (13) Cambien F, Richard JL, Ducimetiere P. [Familial history of coronary heart diseases and high blood pressure in relation to the prevalence of risk factors, and the incidence of coronary heart diseases. The Paris Prospective Study (author's transl)]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1980 April 30;28(1):21-37.
- (14) Friedlander Y, Siscovick DS, Arbogast P, Psaty BM, Weinmann S, Lemaitre RN, Raghunathan TE, Cobb LA. Sudden death and myocardial infarction in first degree relatives as predictors of primary cardiac arrest. *Atherosclerosis* 2002 May;162(1):211-6.
- (15) Plant LD, Bowers PN, Liu Q, Morgan T, Zhang T, State MW, Chen W, Kittles RA, Goldstein SA. A common cardiac sodium channel variant associated with sudden infant death in African Americans, SCN5A S1103Y. *J Clin Invest* 2006 February;116(2):430-5.
- (16) Sotoodehnia N, Siscovick DS, Vatta M, Psaty BM, Tracy RP, Towbin JA, Lemaitre RN, Rea TD, Durda JP, Chang JM, Lumley TS, Kuller LH, Burke GL, Heckbert SR. Beta2-adrenergic receptor genetic variants and risk of sudden cardiac death. *Circulation* 2006 April 18;113(15):1842-8.
- (17) Viskin S, Lesh MD, Eldar M, Fish R, Setbon I, Laniado S, Belhassen B. Mode of onset of malignant ventricular arrhythmias in idiopathic ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1997 October;8(10):1115-20.
- (18) Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ,

Escande D, Le MH, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. Nature 2003 February 6;421(6923):634-9.

- (19) *Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. Circulation 2006 November 14;114(20):2104-12.*
- (20) *Thierfelder L. [Genetic aspects of the etiology of arrhythmia]. Z Kardiol 2000;89 Suppl 3:1-5.*
- (21) *Bowles NE, Bowles KR, Towbin JA. The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy. Herz 2000 May;25(3):168-75.*
- (22) *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 March 10;80(5):805-11.*
- (23) *Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. Nature 1998 March 19;392(6673):293-6.*
- (24) *Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le MH. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. Circulation 2001 December 18;104(25):3081-6.*
- (25) *Priori SG, Napolitano C, Giordano U, Collisani G, Memmi M. Brugada syndrome and sudden cardiac death in children. Lancet 2000 March 4;355(9206):808-9.*

- (26) Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademanee K, Brugada R, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C, Towbin JA. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet* 2002 February 1;11(3):337-45.
- (27) McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 2004 October 12;110(15):2163-7.
- (28) Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balsler JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001 February 22;409(6823):1043-7.
- (29) Benson DW, Wang DW, Dymont M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL, Jr. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest* 2003 October;112(7):1019-28.
- (30) Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA, Brugada P. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000 February 8;101(5):510-5.
- (31) Hong K, Brugada J, Oliva A, Berruezo-Sanchez A, Potenza D, Pollevick GD, Guerchicoff A, Matsuo K, Burashnikov E, Dumaine R, Towbin JA, Nesterenko V, Brugada P, Antzelevitch C, Brugada R. Value of electrocardiographic parameters and ajmaline test in the diagnosis of Brugada syndrome caused by SCN5A mutations. *Circulation* 2004 November 9;110(19):3023-7.
- (32) Ruskin JN. The cardiac arrhythmia suppression trial (CAST). *N Engl J Med* 1989 August 10;321(6):386-8.

- (33) *Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. J Am Coll Cardiol 1992 November 15;20(6):1391-6.*
- (34) *Brugada P, Brugada R, Brugada J. The Brugada syndrome. Curr Cardiol Rep 2000 November;2(6):507-14.*
- (35) *Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. Circulation 2002 November 5;106(19):2514-9.*
- (36) *Eckardt L, Kirchhof P, Loh P, Schulze-Bahr E, Johna R, Wichter T, Breithardt G, Haverkamp W, Borggrefe M. Brugada syndrome and supraventricular tachyarrhythmias: a novel association? J Cardiovasc Electrophysiol 2001 June;12(6):680-5.*
- (37) *Mizumaki K, Fujiki A, Tsuneda T, Sakabe M, Nishida K, Sugao M, Inoue H. Vagal activity modulates spontaneous augmentation of ST elevation in the daily life of patients with Brugada syndrome. J Cardiovasc Electrophysiol 2004 June;15(6):667-73.*
- (38) *Hisamatsu K, Morita H, Fukushima KK, Takenaka S, Nagase S, Nakamura K, Emori T, Ohe T. Evaluation of the usefulness of recording the ECG in the 3rd intercostal space and prevalence of Brugada-type ECG in accordance with recently established electrocardiographic criteria. Circ J 2004 February;68(2):135-8.*
- (39) *Maury P, Couderc P, Delay M, Boveda S, Brugada J. Electrical storm in Brugada syndrome successfully treated using isoprenaline. Europace 2004 March;6(2):130-3.*
- (40) *Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome. Eur Heart J 2002 November;23(21):1648-54.*

- (41) *Brugada P, Brugada R, Antzelevitch C, Brugada J. The Brugada Syndrome. Arch Mal Coeur Vaiss 2005 February;98(2):115-22.*
- (42) *Viskin S, Fish R, Eldar M, Zeltser D, Lesh MD, Glick A, Belhassen B. Prevalence of the Brugada sign in idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls. Heart 2000 July;84(1):31-6.*
- (43) *Greer RW, Glancy DL. Prevalence of the Brugada electrocardiographic pattern at the Medical Center of Louisiana in New Orleans. J La State Med Soc 2003 September;155(5):242-6.*
- (44) *Bigi MA, Aslani A, Shahrzad S. Prevalence of Brugada sign in patients presenting with palpitation in southern Iran. Europace 2007 April;9(4):252-5.*
- (45) *Liang P, Liu WL, Hu DY, Wu D, Liu J. [A survey of Brugada-type electrocardiogram recorded from high right precordia spaces in healthy Chinese]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 2007 June;46(6):454-7.*
- (46) *Bozkurt A, Yas D, Seydaoglu G, Acarturk E. Frequency of Brugada-type ECG pattern (Brugada sign) in Southern Turkey. Int Heart J 2006 July;47(4):541-7.*
- (47) *Shin SC, Ryu HM, Lee JH, Chang BJ, Shin JK, Kim HS, Heo JH, Yang DH, Park HS, Cho Y, Chae SC, Jun JE, Park WH. Prevalence of the Brugada-type ECG recorded from higher intercostal spaces in healthy Korean males. Circ J 2005 September;69(9):1064-7.*
- (48) *Blangy H, Sadoul N, Coutelour JM, Rebmann JP, Joseph M, Scherrer C, de CC, Magnin-Poull I, Aliot E. [Prevalence of Brugada syndrome among 35,309 inhabitants of Lorraine screened at a preventive medicine centre]. Arch Mal Coeur Vaiss 2005 March;98(3):175-80.*
- (49) *Junttila MJ, Raatikainen MJ, Karjalainen J, Kauma H, Kesaniemi YA, Huikuri HV. Prevalence and prognosis of subjects with Brugada-type ECG pattern in a young and middle-aged Finnish population. Eur Heart J 2004 May;25(10):874-8.*
- (50) *Oe H, Takagi M, Tanaka A, Namba M, Nishibori Y, Nishida Y, Kawarabayashi T, Yoshiyama M, Nishimoto M, Tanaka K, Yoshikawa*

J. Prevalence and clinical course of the juveniles with Brugada-type ECG in Japanese population. Pacing Clin Electrophysiol 2005 June;28(6):549-54.

- (51) *Miyasaka Y, Tsuji H, Yamada K, Tokunaga S, Saito D, Imuro Y, Matsumoto N, Iwasaka T. Prevalence and mortality of the Brugada-type electrocardiogram in one city in Japan. J Am Coll Cardiol 2001 September;38(3):771-4.*
- (52) *Matsuo K, Akahoshi M, Nakashima E, Suyama A, Seto S, Hayano M, Yano K. The prevalence, incidence and prognostic value of the Brugada-type electrocardiogram: a population-based study of four decades. J Am Coll Cardiol 2001 September;38(3):765-70.*
- (53) *Furuhashi M, Uno K, Tsuchihashi K, Nagahara D, Hyakukoku M, Ohtomo T, Satoh S, Nishimiya T, Shimamoto K. Prevalence of asymptomatic ST segment elevation in right precordial leads with right bundle branch block (Brugada-type ST shift) among the general Japanese population. Heart 2001 August;86(2):161-6.*
- (54) *Atarashi H, Ogawa S, Harumi K, Sugimoto T, Inoue H, Murayama M, Toyama J, Hayakawa H. Three-year follow-up of patients with right bundle branch block and ST segment elevation in the right precordial leads: Japanese Registry of Brugada Syndrome. Idiopathic Ventricular Fibrillation Investigators. J Am Coll Cardiol 2001 June 1;37(7):1916-20.*
- (55) *Yamakawa Y, Ishikawa T, Uchino K, Mochida Y, Ebina T, Sumita S, Kobayashi T, Matsushita K, Matsumoto K, Ohkusu Y, Nishizawa T, Takigiku K, Iwamoto M, Kimura K, Umemura S. Prevalence of right bundle-branch block and right precordial ST-segment elevation (Brugada-type electrocardiogram) in Japanese children. Circ J 2004 April;68(4):275-9.*
- (56) *Wilde AA, Priori SG. Brugada syndrome and sudden death. Eur Heart J 2000 September;21(17):1483-4.*
- (57) *Nademanee K. Sudden unexplained death syndrome in Southeast Asia. Am J Cardiol 1997 March 20;79(6A):10-1.*

- (58) Tada H, Sticherling C, Oral H, Morady F. Brugada syndrome mimicked by tricyclic antidepressant overdose. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001 February;12(2):275.
- (59) Darbar D, Yang T, Churchwell K, Wilde AA, Roden DM. Unmasking of Brugada syndrome by lithium. *Circulation* 2005 September 13;112(11):1527-31.
- (60) Littmann L, Monroe MH, Svenson RH. Brugada-type electrocardiographic pattern induced by cocaine. *Mayo Clin Proc* 2000 August;75(8):845-9.
- (61) Guazon M. Algunas notas sobre bangungut. *Revista Filipina de Medicina Y Farmacia* 8, 437-442. 1917.
Ref Type: Generic
- (62) Sugai MA. Pathological study on sudden and unexpected death, especially on the cardiac death autopsied by medical examiners in Tokyo. *Acta Pathol Jpn.* 9 (suppl), 723-752. 1959.
Ref Type: Generic
- (63) Sangwatanaroj S, Ngamchareon C, Prechawat S. Pattern of inheritance in three sudden unexplained death syndrome ("Lai-tai") families. *J Med Assoc Thai* 2001 June;84 Suppl 1:S443-S451.
- (64) Hong K, Berruezo-Sanchez A, Pongvarin N, Oliva A, Vatta M, Brugada J, Brugada P, Towbin JA, Dumaine R, Pinero-Galvez C, Antzelevitch C, Brugada R. Phenotypic characterization of a large European family with Brugada syndrome displaying a sudden unexpected death syndrome mutation in SCN5A. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004 January;15(1):64-9.
- (65) Brugada J, Brugada R, Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation* 1998 February 10;97(5):457-60.
- (66) Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C, Towbin J, Nademanee K, Brugada P. Long-term follow-up of individuals with the

electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. Circulation 2002 January 1;105(1):73-8.

- (67) *Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della BP, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De NR, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G, Nastoli J. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. Circulation 2002 March 19;105(11):1342-7.*
- (68) *Brugada P, Brugada R, Mont L, Rivero M, Geelen P, Brugada J. Natural history of Brugada syndrome: the prognostic value of programmed electrical stimulation of the heart. J Cardiovasc Electrophysiol 2003 May;14(5):455-7.*
- (69) *Brugada J, Brugada R, Brugada P. Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. Circulation 2003 December 23;108(25):3092-6.*
- (70) *Antzelevitch C. Ion channels and ventricular arrhythmias: cellular and ionic mechanisms underlying the Brugada syndrome. Curr Opin Cardiol 1999 May;14(3):274-9.*
- (71) *Antzelevitch C. Brugada syndrome: clinical, genetic, molecular, cellular and ionic aspects. Expert Rev Cardiovasc Ther 2003 July;1(2):177-85.*
- (72) *Alings M, Dekker L, Sadee A, Wilde A. Quinidine induced electrocardiographic normalization in two patients with Brugada syndrome. Pacing Clin Electrophysiol 2001 September;24(9 Pt 1):1420-2.*
- (73) *Belhassen B, Glick A, Viskin S. Efficacy of quinidine in high-risk patients with Brugada syndrome. Circulation 2004 September 28;110(13):1731-7.*
- (74) *Hermida JS, Denjoy I, Clerc J, Extramiana F, Jarry G, Milliez P, Guicheney P, Di FS, Rey JL, Cauchemez B, Leenhardt A.*

Hydroquinidine therapy in Brugada syndrome. J Am Coll Cardiol 2004 May 19;43(10):1853-60.

- (75) Mok NS, Chan NY, Chiu AC. Successful use of quinidine in treatment of electrical storm in Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2004 June;27(6 Pt 1):821-3.
- (76) Coronel R, Casini S, Koopmann TT, Wilms-Schopman FJ, Verkerk AO, de G, Jr., Bhuiyan Z, Bezzina CR, Veldkamp MW, Linnenbank AC, van der Wal AC, Tan HL, Brugada P, Wilde AA, de Bakker JM. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation* 2005 November 1;112(18):2769-77.
- (77) Moric E, Herbert E, Trusz-Gluza M, Filipecki A, Mazurek U, Wilczok T. The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (SCN5A). *Europace* 2003 October;5(4):325-34.
- (78) Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* 1996 May 15;34(1):9-16.
- (79) Scornik FS, Desai M, Brugada R, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C, Perez GJ. Functional expression of "cardiac-type" Nav1.5 sodium channel in canine intracardiac ganglia. *Heart Rhythm* 2006 July;3(7):842-50.
- (80) Baroudi G, Pouliot V, Denjoy I, Guicheney P, Shrier A, Chahine M. Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ Res* 2001 June 22;88(12):E78-E83.
- (81) Valdivia CR, Tester DJ, Rok BA, Porter CB, Munger TM, Jahangir A, Makielski JC, Ackerman MJ. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res* 2004 April 1;62(1):53-62.

- (82) Baroudi G, Acharfi S, Larouche C, Chahine M. Expression and intracellular localization of an SCN5A double mutant R1232W/T1620M implicated in Brugada syndrome. *Circ Res* 2002 January 11;90(1):E11-E16.
- (83) Dumaine R, Towbin JA, Brugada P, Vatta M, Nesterenko DV, Nesterenko VV, Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C. Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ Res* 1999 October 29;85(9):803-9.
- (84) Mok NS, Priori SG, Napolitano C, Chan NY, Chahine M, Baroudi G. A newly characterized SCN5A mutation underlying Brugada syndrome unmasked by hyperthermia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003 April;14(4):407-11.
- (85) Ortega-Carnicer J, Benezet J, Ceres F. Fever-induced ST-segment elevation and T-wave alternans in a patient with Brugada syndrome. *Resuscitation* 2003 June;57(3):315-7.
- (86) Porres JM, Brugada J, Urbistondo V, Garcia F, Reviejo K, Marco P. Fever unmasking the Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2002 November;25(11):1646-8.
- (87) Saura D, Garcia-Alberola A, Carrillo P, Pascual D, Martinez-Sanchez J, Valdes M. Brugada-like electrocardiographic pattern induced by fever. *Pacing Clin Electrophysiol* 2002 May;25(5):856-9.
- (88) Alings M, Wilde A. "Brugada" syndrome: clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation* 1999 February 9;99(5):666-73.
- (89) Groenewegen WA, Bezzina CR, van Tintelen JP, Hoorntje TM, Mannens MM, Wilde AA, Jongsma HJ, Rook MB. A novel LQT3 mutation implicates the human cardiac sodium channel domain IVS6 in inactivation kinetics. *Cardiovasc Res* 2003 March 15;57(4):1072-8.
- (90) Grant AO, Carboni MP, 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 October;110(8):1201-9.

- (91) Bezzina C, Veldkamp MW, van den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, Van L, I, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA. A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res* 1999 December 3;85(12):1206-13.
- (92) 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 October 31;93(9):821-8.
- (93) Viswanathan PC, Benson DW, Balsler JR. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest* 2003 February;111(3):341-6.
- (94) Wang Q, Chen S, Chen Q, Wan X, Shen J, Hoeltge GA, Timur AA, Keating MT, Kirsch GE. The common SCN5A mutation R1193Q causes LQTS-type electrophysiological alterations of the cardiac sodium channel. *J Med Genet* 2004 May;41(5):e66.
- (95) Huang H, Zhao J, Barrane FZ, Champagne J, Chahine M. Nav1.5/R1193Q polymorphism is associated with both long QT and Brugada syndromes. *Can J Cardiol* 2006 March 15;22(4):309-13.
- (96) Cordeiro JM, Barajas-Martinez H, Hong K, Burashnikov E, Pfeiffer R, Orsino AM, Wu YS, Hu D, Brugada J, Brugada P, Antzelevitch C, Dumaine R, Brugada R. Compound heterozygous mutations P336L and I1660V in the human cardiac sodium channel associated with the Brugada syndrome. *Circulation* 2006 November 7;114(19):2026-33.
- (97) 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 July 20;89(2):E16-E21.

- (98) *Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A, Jeron A, Erdmann J, Koopmann TT, Bhuiyan ZA, Wilders R, Mannens MM, Tan HL, Luft FC, Schunkert H, Wilde AA. A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. Cardiovasc Res 2003 July 1;59(1):27-36.*
- (99) *Westenskow P, Splawski I, Timothy KW, Keating MT, Sanguinetti MC. Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. Circulation 2004 April 20;109(15):1834-41.*
- (100) *Splawski I, Timothy KW, Tateyama M, Clancy CE, Malhotra A, Beggs AH, Cappuccio FP, Sagnella GA, Kass RS, Keating MT. Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. Science 2002 August 23;297(5585):1333-6.*
- (101) *Poelzing S, Forleo C, Samodell M, Dudash L, Sorrentino S, Anaclerio M, Troccoli R, Iacoviello M, Romito R, Guida P, Chahine M, Pitzalis M, Deschenes I. SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. Circulation 2006 August 1;114(5):368-76.*
- (102) *Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, Tester DJ, Will ML, Timothy KW, Keating MT, Jones G, Chadha M, Burrow CR, Stephens JC, Xu C, Judson R, Curran ME. 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 November;1(5):600-7.*
- (103) *Wilde AA, Remme CA, Derksen R, Wever EF, Hauer RN. Brugada syndrome. Eur Heart J 2002 April;23(8):675-6.*
- (104) *Babalarios VC, Hurst JW. Tricyclic antidepressants and the Brugada syndrome: an example of Brugada waves appearing after the administration of desipramine. Clin Cardiol 2002 August;25(8):395-8.*
- (105) *Goldgran-Toledano D, Sideris G, Kevorkian JP. Overdose of cyclic antidepressants and the Brugada syndrome. N Engl J Med 2002 May 16;346(20):1591-2.*

- (106) Pastor A, Nunez A, Cantale C, Cosio FG. Asymptomatic brugada syndrome case unmasked during dimenhydrinate infusion. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001 October;12(10):1192-4.
- (107) Ortega-Carnicer J, Bertos-Polo J, Gutierrez-Tirado C. Aborted sudden death, transient Brugada pattern, and wide QRS dysrrhythmias after massive cocaine ingestion. *J Electrocardiol* 2001 October;34(4):345-9.
- (108) Grigorov V, Goldberg L, Foccard JP. Cardiovascular complications of acute cocaine poisoning: a clinical case report. *Cardiovasc J S Afr* 2004 May;15(3):139-42.
- (109) Phillips N, Priestley M, Denniss AR, Uther JB. Brugada-type electrocardiographic pattern induced by epidural bupivacaine. *Anesth Analg* 2003 July;97(1):264-7, table.
- (110) de La Coussaye JE, Brugada J, Allessie MA. Electrophysiologic and arrhythmogenic effects of bupivacaine. A study with high-resolution ventricular epicardial mapping in rabbit hearts. *Anesthesiology* 1992 July;77(1):132-41.
- (111) Oliva A, Bjerregaard P, Hong K, Evans S, Vernoooy K, McCormack J, Brugada J, Brugada P, Pascali VL, Brugada R. Clinical Heterogeneity in Sodium Channelopathies. What is the Meaning of Carrying a Genetic Mutation? *Cardiology* 2007 October 7;110(2):116-22.
- (112) Krawczak M, Ball EV, Fenton I, Stenson PD, Abeysinghe S, Thomas N, Cooper DN. Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum Mutat* 2000;15(1):45-51.
- (113) Roca X, Sachidanandam R, Krainer AR. Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic Acids Res* 2003 November 1;31(21):6321-33.
- (114) Harland M, Mistry S, Bishop DT, Bishop JA. A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Hum Mol Genet* 2001 November 1;10(23):2679-86.

- (115) *Tuffery-Giraud S, Saquet C, Chambert S, Claustres M. Pseudoexon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy. Hum Mutat 2003 June;21(6):608-14.*
- (116) *King K, Flinter FA, Nihalani V, Green PM. Unusual deep intronic mutations in the COL4A5 gene cause X linked Alport syndrome. Hum Genet 2002 December;111(6):548-54.*
- (117) *Antzelevitch C, Brugada P, Borggreffe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. Circulation 2005 February 8;111(5):659-70.*
- (118) *Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. N Engl J Med 2004 March 4;350(10):1013-22.*
- (119) *Valenzuela C, Snyders DJ, Bennett PB, Tamargo J, Hondeghem LM. Stereoselective block of cardiac sodium channels by bupivacaine in guinea pig ventricular myocytes. Circulation 1995 November 15;92(10):3014-24.*
- (120) *Wakita R, Watanabe I, Okumura Y, Yamada T, Takagi Y, Kofune T, Okubo K, Masaki R, Sugimura H, Oshikawa N, Saito S, Ozawa Y, Kanmatsuse K. Brugada-like electrocardiographic pattern unmasked by fever. Jpn Heart J 2004 January;45(1):163-7.*

PUBLICACIONS DE L' AUTOR

1. Juntilla, J, Gonzalez M, Benito B, Lizotte E, Vernooy K, Sarkozy A, Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. Induced Brugada Type ECG, a Sign for Imminent Malignant Arrhythmias. *Circulation* (in press)
2. Sovari A, Cesario D, Kocheril A, **Brugada R**. "Multiple Episodes of Ventricular Tachycardia Induced by Silent Coronary Vasospasm" *J Interv Cardiac Electrophysiol*. (in press)
3. Oliva, A, Bjerregaard P, Hong K, Evans S, Vernooy K, McCormack J, Brugada J, Brugada P, Pascali VL, **Brugada R**. Clinical heterogeneity in sodium channelopathies. What is the meaning of carrying a genetic mutation? *Cardiology* 2008, 110(2):116-122.
4. Sovari AA, Prasun MA, Kocheril AG, **Brugada R**. Brugada syndrome unmasked by pneumonia. *Tex Heart Inst J*. 2006;33(4):501-4.
5. Junttila MJ, Raatikainen MJ, Perkiomaki JS, Hong K, **Brugada R**, Huikuri HV. Familial clustering of lone atrial fibrillation in patients with saddleback-type ST-segment elevation in right precordial leads. *Eur Heart J*. 2007;28(4):463-8.
6. Mansour F, Thibault B, Dubuc M, Guerra PG, Macle L, **Brugada R**, Roy D, Talajic M, Khairy P. Shocking Truths about Implantable Cardioverter Defibrillator Monitoring Zones. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2007 Sep;30(9):1146-8.
7. Hong K, Oliva A, Cheng XS, Brugada P, Brugada J, Sternick EB, **Brugada R**. Same genotype and different phenotypes in a family with PRKAG2 gene mutation. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2007 ;35(6):552-4.
8. Hu D, Viskin S, Oliva A, Carrier T, Cordeiro JM, Barajas-Martinez H, Wu Y, Burashnikov E, Sicouri S, **Brugada R**, Rosso R, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. Novel mutation in the SCN5A gene associated with

- arrhythmic storm development during acute myocardial infarction. *Heart Rhythm*. 2007 Aug;4(8):1072-80.
9. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P. Channelopathies: a new category of diseases causing sudden death. *Herz*. 2007 May;32(3):185-91. Review.
 10. Junttila MJ, Raatikainen MJ, Perkiomaki JS, Hong K, **Brugada R**, Huikuri HV. Familial clustering of lone atrial fibrillation in patients with saddleback-type ST-segment elevation in right precordial leads. *Eur Heart J*. 2007 Feb;28(4):463-8.
 11. Juntilla MJ, Brugada P, Hong K, Lizotte E, De Zutter M, Sarkozy A, Brugada J, Benito B, Perkiomaki JS, Makikallio TH, Huikuri HV, **Brugada R**. Differences in 12 lead electrocardiogram between symptomatic and asymptomatic Brugada syndrome patients. *J cardiovasc Electrophysiol* 2007 (epub ahead of print)
 12. Hookana E, Juntilla MJ, Sarkioja T, Sormunen R, Niemela M, Raatikainen MJ, Uusimaa P, Lizotte E, Peuhkuriene K, **Brugada R**, Huikuri HV. Cardiac arrest and left ventricular fibrosis is a Finnish family with the lamin AC mutation. *J cardiovasc Electrophysiol* 2007 (epub ahead of print)
 13. Lehnart SE, Ackerman MJ, Benson DW Jr, **Brugada R**, Clancy CE, Donahue JK, George AL Jr, Grant AO, Groft SC, January CT, Lathrop DA, Lederer WJ, Makielski JC, Mohler PJ, Moss A, Nerbonne JM, Olson TM, Przywara DA, Towbin JA, Wang LH, Marks AR. Inherited Arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function. *Circulation*. 2007;116(20):2325-45.

14. Lombardi F, Potenza S, Beltrami A, Verzoni A, Brugada P, **Brugada R**. Simultaneous ST-segment elevation in the right precordial and inferior leads in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2007 Mar;8(3):201-4.
15. Junttila MJ, Raatikainen MJ, Perkiomaki JS, Hong K, **Brugada R**, Huikuri HV. Familial clustering of lone atrial fibrillation in patients with saddleback-type ST-segment elevation in right precordial leads. *Eur H J.*;28(4):463-8.
16. Sovari AA, Prasun MA, Kocheril AG, **Brugada R**. Brugada syndrome unmasked by pneumonia. *Tex Heart Inst J*. 2006;33(4):501-4.
17. Cordeiro JM, Barajas-Martinez H, Hong K, Burashnikov E, Pfeiffer R, Orsino AM, Wu YS, Hu D, Brugada J, Brugada P, Antzelevitch C, Dumaine R, **Brugada R**. Compound heterozygous mutations P336L and I1660V in the human cardiac sodium channel associated with the Brugada syndrome. *Circulation*. 2006 Nov 7;114(19):2026-33.
18. Vernooy K, Delhaas T, Cremer OL, Di Diego JM, Oliva A, Timmermans C, Volders PG, Prinzen FW, Crijns HJ, Antzelevitch C, Kalkman CJ, Rodriguez LM, **Brugada R**. Electrocardiographic changes predicting sudden death in propofol-related infusion syndrome. *Heart Rhythm*. 2006 Feb;3(2):131-7.
19. Vernooy K, Sicouri S, Dumaine R, Hong K, Oliva A, Burashnikov E, Timmermans C, Delhaas T, Crijns HJ, Antzelevitch C, Rodriguez LM, **Brugada R**. Genetic and biophysical basis for bupivacaine-induced ST segment elevation and VT/VF. Anesthesia unmasked Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2006 Sep;3(9):1074-8.

20. **Brugada R**, Brugada P, Brugada J. Electrocardiogram interpretation and class I blocker challenge in Brugada syndrome. *J Electrocardiol.* 2006 Oct;39(4 Suppl):S115-8. Epub 2006 Aug 28.
21. Sternick EB, Oliva A, Magalhaes LP, Gerken LM, Hong K, Santana O, Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. Familial pseudo-Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006 Jul;17(7):724-32.
22. Scornik FS, Desai M, **Brugada R**, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C, Perez GJ. Functional expression of "cardiac-type" Nav1.5 sodium channel in canine intracardiac ganglia. *Heart Rhythm.* 2006 Jul;3(7):842-50.
23. Oliva A, Pascali VL, Hong K, **Brugada R**. Molecular Autopsy of Sudden Cardiac Death (SCD): The Challenge of Forensic Pathologist to the Complexity of Genomics. *Am J Forensic Med Pathol* 2005 ;26(4):369-70.
24. **Brugada R**, Hong K, Cordeiro JM, Dumaine R. Short QT syndrome. *CMAJ* 2005 Nov 22;173(11):1349-54.
25. Maury P, Hollington L, Duparc A, **Brugada R**. Short QT syndrome: Should we push the frontier forward? *Heart Rhythm.* 2005 Oct;2(10):1135-7.
26. Cordeiro JM, **Brugada R**, Wu YS, Hong K, Dumaine R. Modulation of I(Kr) inactivation by mutation N588K in KCNH2: a link to arrhythmogenesis in short QT syndrome. *Cardiovasc Res.* 2005 Aug 15;67(3):498-509.
27. Hong K, Piper DR, Diaz-Valdecantos A, Brugada J, Oliva A, Burashnikov E, Santos-de-Soto J, Grueso-Montero J, Diaz-Enfante E, Brugada P, Sachse F, Sanguinetti MC, **Brugada R**. De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res.* 2005 68(3):433-40.
28. Sanatani S, Mahkseed N, Vallance H, **Brugada R**. The Brugada ECG pattern in a neonate. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005 Mar;16(3):342-4.

29. Brugada P, **Brugada R**, Brugada J. Should patients with an asymptomatic Brugada electrocardiogram undergo pharmacological and electrophysiological testing? *Circulation*. 2005 Jul 12;112(2):279-92
30. Wolpert C, Schimpf R, Giustetto C, Antzelevitch C, Cordeiro J, Dumaine R, **Brugada R**, Hong K, Bauersfeld U, Gaita F, Borggrefe M. Further insights into the effect of quinidine in short QT syndrome caused by a mutation in HERG. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2005 Jan;16(1):54-8.
31. **Brugada R**. Is atrial fibrillation a genetic disease? *JCE* 2005 May;16(5):553-6
32. **Brugada R**. Genetics, ethics and ethnicity (editorial) *Heart Rhythm*, 2004 Nov;1(5):608-9
33. The Brugada syndrome. Brugada P, Brugada R, Antzelevitch C, Brugada J. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2005 Feb;98(2):115-22.
34. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, **Brugada R**, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Riera ARP, Tan H, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Wilde A. Brugada Syndrome. Consensus Report. *Circulation*, 2005;111(5):659-70.
35. Hong K, Guerchicoff A, Pollevick G, Brugada P, Oliva A, Dumaine R, De Zutter M, Burashnikov E, Brugada J, Antzelevitch C and **Brugada R**. Cryptic 5' Splice-site Activation in SCN5A Associated with Brugada Syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005 Apr;38(4):555-60.
36. Brugada R (March 2005) Brugada Syndrome. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2005. Available at <http://www.genetests.org>.
37. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. Brugada syndrome: from cell to bedside. *Curr Probl Cardiol*. 2005 Jan;30(1):9-54.

38. Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, **Brugada R**. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* *In press*
39. Hong K, Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Ohe T, **Brugada R**. Brugada Syndrome 12 Years of Progression. *Acta Medica Okayama*, Vol.58, No.6. 2004 Dec;58(6):255-61.
40. Hong K, Brugada J, Oliva A, Berruzo-Sanchez A, Potenza D, Pollevick GD, Guerchicoff A, Matsuo K, Burashnikov E, Dumaine R, Towbin J, Nesterenko V, Brugada P, Antzelevitch C, **Brugada R**. Value of electrocardiographic parameters and ajmaline test in the diagnosis of Brugada syndrome caused by SCN5A mutations. *Circulation*, 2004 Nov 9;110(19):3023-7.
41. Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Schimpf R, Haissaguerre M, Calo L, **Brugada R**, Antzelevitch C, Borggrefe M, Wolpert C. Short QT syndrome: pharmacological treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Apr 21;43(8):1494-9.
42. **Brugada R**. Molecular biology of atrial fibrillation. *Minerva Cardioangiol*. 2004 Apr;52(2):65-72.
43. Hong K, Berruzo-Sanchez A, Pongvarin N, Oliva A, Vatta M, Brugada J, Brugada P, Towbin JA, Dumaine R, Pinero-Galvez C, Antzelevitch C, **Brugada R**. Phenotypic characterization of a large European family with Brugada syndrome displaying a sudden unexpected death syndrome mutation in SCN5A. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2004 Jan;15(1):64-9.
44. **Brugada R**, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation*. 2004 Jan 6;109(1):30-5. Epub 2003 Dec 15.

45. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P. Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation*. 2003 Dec 23;108(25):3092-6.
46. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, **Brugada R**, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992-2002: a historical perspective. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 21;41(10):1665-71.
47. Brugada P, **Brugada R**, Mont L, Rivero M, Geelen P, Brugada J. Natural history of Brugada syndrome: the prognostic value of programmed electrical stimulation of the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003 May;14(5):455-7.
48. Antzelevitch C, **Brugada R**. Expert's opinion. *J Electrocardiol*. 2003 Apr;36(2):165.
49. Brugada J, Brugada P, **Brugada R**. The ajmaline challenge in Brugada syndrome: a useful tool or misleading information? *Eur Heart J*. 2003 Jun;24(12):1085-6.
50. Roberts R, **Brugada R**. Genetics and arrhythmias. *Annu Rev Med*. 2003;54:257-67.
51. Antzelevitch C, **Brugada R**. Fever and Brugada syndrome. *PACE*;25(11):1537-9
52. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, **Brugada R**, Shimizu W, Gussak I, Perez Riera AR. Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res* 2002;91(12):1114-8
53. Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, **Brugada R**, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome. *Eur Heart J*;23(21):1648-54
54. Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, **Brugada R**, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA;

- Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation*. 2002 Nov 5;106(19):2514-9.
55. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. The Brugada syndrome. *Card Electrophysiol Rev*. 2002 Feb;6(1-2):45-8.
 56. Vatta M, Dumaine R, Antzelevitch C, **Brugada R**, Li H, Bowles NE, Nademanee K, Brugada J, Brugada P, Towbin JA. Novel mutations in domain I of SCN5A cause Brugada syndrome. *Mol Genet Metab* 2002 Apr;75(4):317-24
 57. **Brugada R**, Brugada J, Brugada P. Genetics and arrhythmias. *Rev Esp Cardiol*. 2002 Apr;55(4):432-7.
 58. Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademanee K, **Brugada R**, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C, Towbin JA. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet*. 2002 Feb 1;11(3):337-45.
 59. Brugada J, Brugada P, **Brugada R**. The syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation in V1-V3 and sudden cardiac death *Med Clin (Barc)*. 2002 Feb 9;118(4):150-6.
 60. Shah G, **Brugada R**, Gonzalez O, Czernuszewicz G, Gibbs RA, Bachinski L, Roberts R. The cloning, genomic organization and tissue expression profile of the human DLG5 gene. *BMC Genomics* 2002; 3(1):6.
 61. Brugada J, Brugada P, **Brugada R**. The syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation in V1 to V3 and sudden death. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16(1):25-7
 62. Brugada J, **Brugada R**, Antzelevitch C, Towbin J, Nademanee K, Brugada P. Long-Term Follow-Up of Individuals With the Electrocardiographic

- Pattern of Right Bundle-Branch Block and ST-Segment Elevation in Precordial Leads V(1) to V(3). *Circulation*. 2002 Jan 1;105(1):73-8.
63. **Brugada R**. Single nucleotide polymorphisms and life-threatening arrhythmias: causal or casual? *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001 Nov;12(11):1230-1.
64. Turban S, Fuentes F, Ferlic L, **Brugada R**, Gotto AM, Ballantyne CM, Marian AJ. A prospective study of paraoxonase gene Q/R192 polymorphism and severity, progression and regression of coronary atherosclerosis, plasma lipid levels, clinical events and response to fluvastatin. *Atherosclerosis*. 2001;154(3):633-40.
65. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. The yet unresolved dilemma of syncope in Brugada syndrome. *Europace*. 2001;3(2):157-8.
66. **Brugada R**, Roberts R. Brugada syndrome: why are there multiple answers to a simple question?. *Circ* 2001; 104:3017-3019.
67. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. Dealing with biological variation in the Brugada syndrome. *Eur Heart J*. 2001 Dec;22(24):2231-2.
68. Li D, Czernuszewicz GZ, Gonzalez O, Tapscott T, Karibe A, Durand JB, **Brugada R**, Hill R, Gregoritch JM, Anderson JL, Quinones M, Bachinski LL, Roberts R. Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2001 Oct 30;104(18):2188-93.
69. Brugada P, Geelen P, **Brugada R**, Mont L, Brugada J. Prognostic value of electrophysiologic investigations in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001; (9): 1004-1007
70. **Brugada R**, Bosch X, Villacastin JP, Alfonso F. Molecular biology for the clinical cardiologist: from an entelchy to a necessity. *Rev Esp Cardiol*. 2001 Jan;54(1):89-90.
71. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. The Brugada syndrome. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001 15(1):15-7.

72. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P. Asymptomatic patients with a Brugada electrocardiogram: are they at risk? *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2001;12(1):7-8.
73. Brugada J, Brugada P, **Brugada R**. Brugada Syndrome: The Syndrome of Right Bundle Branch Block, ST segment Elevation in V(1) to V(3) and Sudden Death. *Indian Pacing Electrophysiol J.* 2001 Oct 1;1(1):6-11.
74. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. 'Localized' right ventricular morphological abnormalities in patients with the Brugada syndrome: what is their significance? *Eur Heart J.* 2001 Jun;22(12):982-4.
75. Brugada P, **Brugada R**, Brugada J. Sudden death in high-risk family members: Brugada syndrome. *Am J Cardiol.* 2000;86(9 Suppl 1):K40-K43.
76. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P. Pharmacological and device approach to therapy of inherited cardiac diseases associated with cardiac arrhythmias and sudden death. *J Electrocardiol.* 2000;33 Suppl:41-7.
77. Asensio E, Alvarez B, Lozano E, Farias A, Brugada R, Brugada P, Brugada J. [ST segment elevation, right bundle branch block and sudden death: Brugada's syndrome] *Arch Inst Cardiol Mex.* 2000 May-Jun;70(3):301-11.
78. Brugada P, **Brugada R**, Brugada J. The Brugada syndrome. *Current Cardiology Reports,* 2000,2:507-514.
79. **Brugada R** The role of molecular biology to identify individuals at risk for sudden cardiac death. *Am J Cardiol,* 2000, 86(9 Suppl 1):K28-K33.
80. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P, et al. For the Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology. 'Proposed Diagnostic Criteria for the Brugada Syndrome'. *Eur Heart J,* 23(21):1648-1654.
81. **Brugada R**. Use of intravenous antiarrhythmics to identify concealed Brugada syndrome. *Cur Control Trials Cardiovasc Med* 2000, 1:45-47

82. **Brugada R**, Roberts R. Gene therapy for cardiovascular diseases. *Exp. Opin Ther. Patents* 2000 10(9):1385-1393
83. Bowles KR, Abraham SE, **Brugada R**, Zintz C, Comeaux J, Sorajja D, Tsubata S, Li H, Brandon L, Gibbs RA, Scherer SE, Bowles NE, Towbin JA. Construction of a high-resolution physical map of the chromosome 10q22-q23 dilated cardiomyopathy locus and analysis of candidate genes. *Genomics* 2000; 67, 109-127
84. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. Arrhythmia induction by antiarrhythmic drugs. *PACE* 2000, 23:291-292
85. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. The Brugada Syndrome. *ANE* 2000, 5(1):88-91
86. **Brugada R**, Brugada P, Brugada J, Towbin JA, Antzelevitch C. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000;101:510-515.
87. Brugada J, Brugada P, **Brugada R**. Sudden death (VI). The Brugada syndrome and right myocardopathies as a cause of sudden death. The differences and similarities. *Rev Esp Cardiol.* 2000;53(2):275-85.
88. Brugada P, **Brugada R**, Brugada J Sudden death in patients and relatives with the syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation and sudden death. *Eur Heart J* 2000, 21: 321-326
89. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P Pharmacological and device approach to therapy of inherited cardiac diseases associated with cardiac arrhythmias and sudden death.. *J Electrocardiol.* 2000;33 Suppl:41-7.
90. Marian AJ, Wu Y, McCluggage M, Youker K, Yu Qt, **Brugada R**, deMayo F, Quiñones M, Roberts R. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1999;104:1683-1692

91. Brugada J, Brugada P, **Brugada R**. The syndrome of right bundle branch block ST segment elevation in V1 to V3 and sudden death—the Brugada syndrome. *Europace*. 1999;1(3):156-66
92. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P. Brugada syndrome. *Arch Mal Coeur Vaiss*.1999;92(7):847-50.
93. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. The Brugada syndrome. *CEPR* 1999 (3),3:42-44
94. Dumaine R, Towbin JA, Brugada P, Brugada J, **Brugada R**, Antzelevitch C. Ionic Mechanisms Responsible for the Electrocardiographic Phenotype of the Brugada Syndrome are Temperature Dependent. *Circulation Research* 1999; 85:803-809
95. Brugada P, Brugada J, **Brugada R**. The puzzle behind chaos and sudden cardiac death in the structurally normal heart. *Eur Heart J*. 1999; 20 (6):401-406
96. **Brugada R**, Roberts R Molecular biology and atrial fibrillation. *Curr Op in Cardiol*. 1999; 14:269-273
97. Sing K, Ballantyne CM, **Brugada R**, et al. Lipoprotein Lipase Gene Mutations, Plasma Lipid Levels, Progression/Regression of Coronary Atherosclerosis, Response to Therapy, and Future Clinical Events. *Atherosclerosis*, 1999; 144:(2),435-442.
98. **Brugada R**,. Brugada J, Roberts R. Genetics of cardiovascular disease with emphasis on atrial fibrillation. *JICE* 1999; 3:7-13
99. Brugada P, **Brugada R**, Brugada J, Geelen P. 'Use of the prophylactic implantable cardioverter defibrillator for patients with normal hearts'. *Am J Cardiol* 1999;83:98D-100D.
100. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, **Brugada R**, et al. Genetic basis and molecular mechanisms for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*, 1998; 392:293-296

101. Brugada J, Brugada P, **Brugada R**. 'Síndrome de bloqueo de rama derecha, elevación del segmento ST en V1-V3 y muerte súbita. *Heartbeat* 1998;3:5-6.
102. Oberst L, Zhao G, Park JT, **Brugada R**, et al. Dominant-negative effect of a mutant cardiac troponin T mutation on cardiac structure and function in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 1998;102:1498-1505.
103. **Brugada R**. Bases genéticas de las arritmias. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51: 274-285
104. **Brugada R**, Roberts R. The molecular genetics of arrhythmias and sudden death. *Clin Cardiol*, 1998; 21, 553-560
105. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P. Right bundle branch block and ST segment elevation in leads V1 through V3. A marker for sudden death in patients without demonstrable heart disease. *Circulation*, 1998; 97:457-460
106. Brugada J, **Brugada R**, Brugada P. Síndrome del bloqueo de rama derecha, elevación del segmento ST en V1 a V3 y muerte súbita cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 1998, 51:170.
107. **Brugada R**, Bachinski LL, Roberts R. Genetics of atrial Fibrillation. *Cardiología al día*. 1998; 1:48-54
108. **Brugada R**, Kelsey W, Abchee A, Lechin M, Zoghbi W, Quinones M, Sole M, Wigle D, Liew C, Roberts R, Marian AJ. Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig. Med*, 1997 ; 45:542-551
109. Brugada J, Mont L, **Brugada R**. Displasia arritmogénica del ventrículo derecho *Rev Esp Cardiol* 1997; 50: 541-547
110. Girona J, Domingo A, Albert D, Casaldàliga J, Mont L, Brugada J, **Brugada R**. Fibrilación auricular familiar. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50: 548-551

111. **Brugada R**. Fibrilacion auricular: La solucion esta en los genes? Rev Esp Cardiol 1997;50:367
112. **Brugada R**, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias AM, Mont L, Brugada J, Girona J, Domingo A, Bachinski LL, Roberts R. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. N Engl J Med 1997;336:905-911.
113. **Brugada R**, Marian AJ. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk factor for coronary artery disease or myocardial infarction. Atherosclerosis; 1997;128:107-112
114. **Brugada R**, Wenger NK, Jacobson T, Clark S, Iglesias A, Cotsonis G. Changes in plasma cholesterol levels after hospitalization for acute coronary events. Cardiology 1996;87:194-199.
115. Durand JB, Bachinski L, Beiling L, Czernuszewicz G, Abchee A, Yu QT, Tapscott T, Hill R, Ifegwu J, Marian AJ, **Brugada R**, Roberts R. A disease locus for familial idiopathic dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1q32. Circulation 1995; 92:3387-3389.
116. Gursoy S, **Brugada R**, Brugada P, Brugada J, Andries E. Which ventricular tachycardia is dangerous? Clinical Cardiology 1992;15:43-44.

