

Investigación de Variantes Génicas de Canales Iónicos en Pacientes con Síndrome del QT Largo

Ernesto Curty¹, Fernando Eugênio dos Santos Cruz², Fabiane Santos Lima¹, Jorge Luiz Albuquerque Coutinho², Rosane Silva³, Turán Peter Ürményi³, Antônio Carlos Campos Carvalho^{2,3}, Edson Rondinelli^{1,3}

Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro¹; Instituto Nacional de Cardiologia²; Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ³, Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Resumen

Fundamento: El síndrome del QT largo (SQTL) es un síndrome arrítmico heredado con aumento del intervalo QT y riesgo de muerte súbita. Mutaciones en los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A* responden por 90% de los casos con genotipo determinado, y el genotipaje es informativo para aconsejamiento genético y mejor manejo de la enfermedad.

Objetivo: Investigación molecular y análisis computacional de variantes génicas de *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A* asociadas a la SQTL en familias portadoras de la enfermedad.

Métodos: Las regiones codificantes de los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A* de pacientes con SQTL y familiares fueron secuenciadas y analizadas utilizando el software Geneious Pro®.

Resultados: Fueron investigadas dos familias con criterios clínicos para SQTL. La probanda de la Familia A presentaba $QT_c = 562$ ms, Escore de Schwartz = 5,5. El genotipaje identificó la mutación G1714A en el gen *KCNH2*. Fue observado $QT_c = 521 \pm 42$ ms en los familiares portadores de la mutación contra $QT_c = 391 \pm 21$ ms de no portadores. La probanda de la Familia B presentaba $QT_c = 551$ ms, Escore de Schwartz = 5. El genotipaje identificó la mutación G1600T, en el mismo gen. El análisis de los familiares reveló $QT_c = 497 \pm 42$ ms en los portadores de la mutación, contra $QT_c = 404 \pm 29$ ms en los no portadores.

Conclusión: Fueron encontradas dos variantes génicas previamente asociadas a la SQTL en dos familias con diagnóstico clínico de SQTL. En todos los familiares portadores de las mutaciones fue observada la prolongación del intervalo QT. Fue desarrollada una estrategia para identificación de variantes de los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*, posibilitando el entrenamiento de personal técnico para futura aplicación en la rutina diagnóstica. (Arq Bras Cardiol 2011;96(3):172-178)

Palabras clave: Síndrome del QT largo, canales iónicos, mutación, muerte súbita cardíaca.

Introducción

El síndrome del QT largo (SQTL)^{1,2} es una enfermedad genética con prevalencia de 1:2.000³ que cursa con riesgo de muerte súbita por arritmias ventriculares en un corazón estructuralmente normal⁴. El diagnóstico es hecho a través del escore de Schwartz⁵, que combina criterios electrocardiográficos y de la historia clínica, clasificando la probabilidad de SQTL en “baja” (< 1) “intermedia” (2 y 3) y “alta” (≥ 4). Un escore de Schwartz ≥ 4 tiene especificidad > 99% para el diagnóstico de la SQTL⁶.

Diferentes tipos de SQTL son provocados por variantes en genes de canales iónicos^{7,8} y en el gen de la ankirina⁹. Actualmente son descriptos 12 tipos¹⁰, sin embargo los

tipos 1, 2 y 3 responden por 90% de los casos con genotipo identificado¹¹. Aunque más de 700 variantes hayan sido descriptas¹², en 29% de los casos la base genética no fue identificada¹³. Los varios tipos de SQTL difieren en cuanto al riesgo de muerte súbita¹⁴, a los gatillos para los episodios de arritmia^{15,16} y la respuesta al tratamiento farmacológico^{17,18}. Además de eso, la gravedad depende de la región afectada del canal¹⁹, lo que vuelve la identificación de la mutación importante para el manejo de la enfermedad.

A pesar del gran número de variantes envueltas, la investigación de variantes génicas asociadas a la SQTL (genotipaje) está siendo cada vez más utilizada en la práctica clínica. Que sea de nuestro conocimiento, ninguna unidad del Sistema Único de Salud realiza actualmente el genotipaje de la SQTL. Por esta razón, fueron investigadas variantes génicas asociadas a la SQTL en dos familias con diagnóstico clínico de la enfermedad. Las condiciones de genotipaje de los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A* fueron establecidas, y fue utilizado análisis computacional para la identificación facilitada de mutaciones ya descriptas y de nuevas variantes génicas en la población brasileña.

Correspondencia: Ernesto Curty •

Rua Evaristo da Veiga, 83/509 - Centro - 20031-040 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil

E-mail: ernestocurty@biof.ufrj.br, ernestocurty@gmail.com

Artículo recibido en 23/08/10; revisado recibido en 23/08/10; aceptado en 24/09/10.

Métodos

Pacientes

Pacientes encaminados al Instituto Nacional de Cardiología con sospecha clínica de SQTL fueron sometidos a anamnesis y examen físico por un cardiólogo con experiencia en SQTL (FESCF⁹). Los electrocardiogramas fueron analizados independientemente por dos investigadores (EC y FESCF⁹), y la medida del intervalo QT realizada por el método de la tangente²⁰. Ninguno de los probandos presentaba señales electrocardiográficas de hipertrofia cardíaca, disturbios de la conducción o isquemia miocárdica. Probandos con escore de Schwartz ≥ 4 y familiares en primer grado fueron sometidos a análisis molecular, en un total de 29 individuos de dos familias.

Extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA genómico era extraído de sangre periférica²¹. Los exones correspondientes a las regiones codificantes de los 3 genes investigados eran amplificados por PCR utilizando los iniciadores previamente descriptos^{22,23}. Los exones de los genes KCNQ1 y KCNH2 eran amplificados utilizando, respectivamente, los programas "B" y "C" previamente publicados por Syrris et al²⁴. Para amplificación de los exones 1A de KCNQ1 y 4 de KCNH2 era agregado a la reacción el reactivo *PCRx Enhancer* (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Los exones del gen SCN5A eran amplificados utilizando condiciones establecidas por nosotros: 0,2 mM dXTP, 3 mM MgCl₂, 0,5 μ M de iniciadores (senso+antisenso), 0,625 UI de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen), 200 ng de DNA molde, en un volumen final de 50 μ l. El programa consistía en 94° C/10 min; 30 ciclos de 94° C/1 min, 58° C/1 min., 72° C/2 min.; extensión final a 72° C/10 min.

Secuenciamiento automático de DNA

El secuenciamiento de productos de PCR purificados en filtros *Millipore PCR Cleanup* era realizado utilizando iniciadores senso o antisenso, en un equipamiento MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) con reactivos *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (GE Healthcare Life Systems) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de las secuencias obtenidas para identificación de las mutaciones.

Fue utilizado el *software* Geneious Pro^{®25} para análisis de las secuencias obtenidas y generación de mapas de mutaciones ya descriptas para los genes estudiados. Resumidamente, las secuencias de las regiones codificante y genómicas de los genes KCNQ1 (nº de acceso NM_000218 y NG_008935.1), KCNH2 (nº de acceso NM_000238 y NG_008916) y SCN5A (nº de acceso NM_000335 y NG_008934.1) fueron importadas del GenBank y las mutaciones conocidas (*Inherited Arrhythmias Database*¹²) agregadas a éstas en el *software* con las respectivas referencias bibliográficas. En seguida fueron señalados los lugares de anillamiento de los iniciadores, intrónicos en su mayoría, utilizados en las reacciones de amplificación y las porciones centrales de los intrones fueron

removidas para facilitar el análisis. La comparación directa de los mapas de mutaciones con las secuencias obtenidas de pacientes permite visualizar simultáneamente la calidad del secuenciamiento y las mutaciones previamente descriptas.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Cardiología (proceso nº 0187/4.01.08). Los pacientes y familiares fueron informados de los objetivos y riesgos del estudio y concordaron en participar del mismo a través de firma del término de consentimiento libre y aclarado.

Resultados

Fue realizada investigación de variantes génicas de KCNQ1, KCNH2 y SCN5A en dos familias con diagnóstico clínico de SQTL, incluyendo en el análisis dos probandos y sus respectivos familiares, completando 11 individuos en la Familia A y 17 en la Familia B. El análisis de las variantes fue optimizada mediante creación de mapas de mutación con el *software* Geneious Pro[®] (datos no mostrados).

La probanda de la Familia A (Figura 1A, paciente A2.21), de 36 años, comenzó a sentir palpitaciones a los 15 años; a los 24 años empezó a presentar episodios de palpitaciones seguidas de síncope desencadenados por estrés emocional, ruidos súbitos y en el despertar, siendo hecho el diagnóstico de SQTL. La probanda de la Familia B (Figura 1B, paciente B2.1) presentaba 42 años y episodios de presíncope durante esfuerzos físicos. La misma buscó atención médica y recibió el diagnóstico de SQTL después de que su prima (#B2.9) presentó un episodio de muerte súbita abortada (MSA) en ambiente hospitalario. Los ECGs con medidas del intervalo QT de las probandas están mostrados en la Figura 2. La paciente A2.21 presentaba QT_c = 560 ms (Figura 2A) y la paciente B2.1 QT_c = 551 ms (Figura 2B). En la historia familiar de la probanda A2.21 era posible identificar 10 casos de muerte súbita en edades precoces, compatibles con SQTL (Figura 1A, destacado en verde). En la Familia B había solamente un caso de MSA (#B2.9).

Los datos clínicos y electrocardiográficos de los individuos de ambas familias están presentados en la Tabla 1. La Familia A totalizaba 9 mujeres y 2 hombres, con edad entre 14 y 80 años. La Familia B contenía 17 individuos (7 del sexo masculino), con edades entre 5 meses y 69 años. Pueden ser identificados 8 individuos con Escore de Schwartz ≥ 4 , cuatro en la Familia A (A2.21, A2.23, A3.2, A3.3) y 4 en la Familia B (B1.1, B2.1, B2.9, B3.1). Dos de esos individuos (A2.21 y B2.9) presentaron episodios de muerte súbita abortada (MSA) y fueron tratados con CDI + betabloqueante. Los demás (A1.10, A2.23, A3.2, A3.3, B1.1) eran asintomáticos y fueron tratados con betabloqueantes aisladamente. Uno de los casos de MSA (B2.9) presentaba intervalo QT_c = 448 ms, entre tanto, este ECG fue registrado en la vigencia del tratamiento con betabloqueante, que puede reducir el intervalo QT. Apenas un individuo (A1.10) presentaba probabilidad intermedia de SQTL (Escore de Schwartz = 2,5) y QT_c limítrofe (450 ms). El análisis del heredograma sugirió que ese individuo debería ser portador de mutación causante de SQTL, lo que fue confirmado por el análisis molecular. Apenas un individuo (A2.21) presentaba registro de *Torsades de Pointes*.

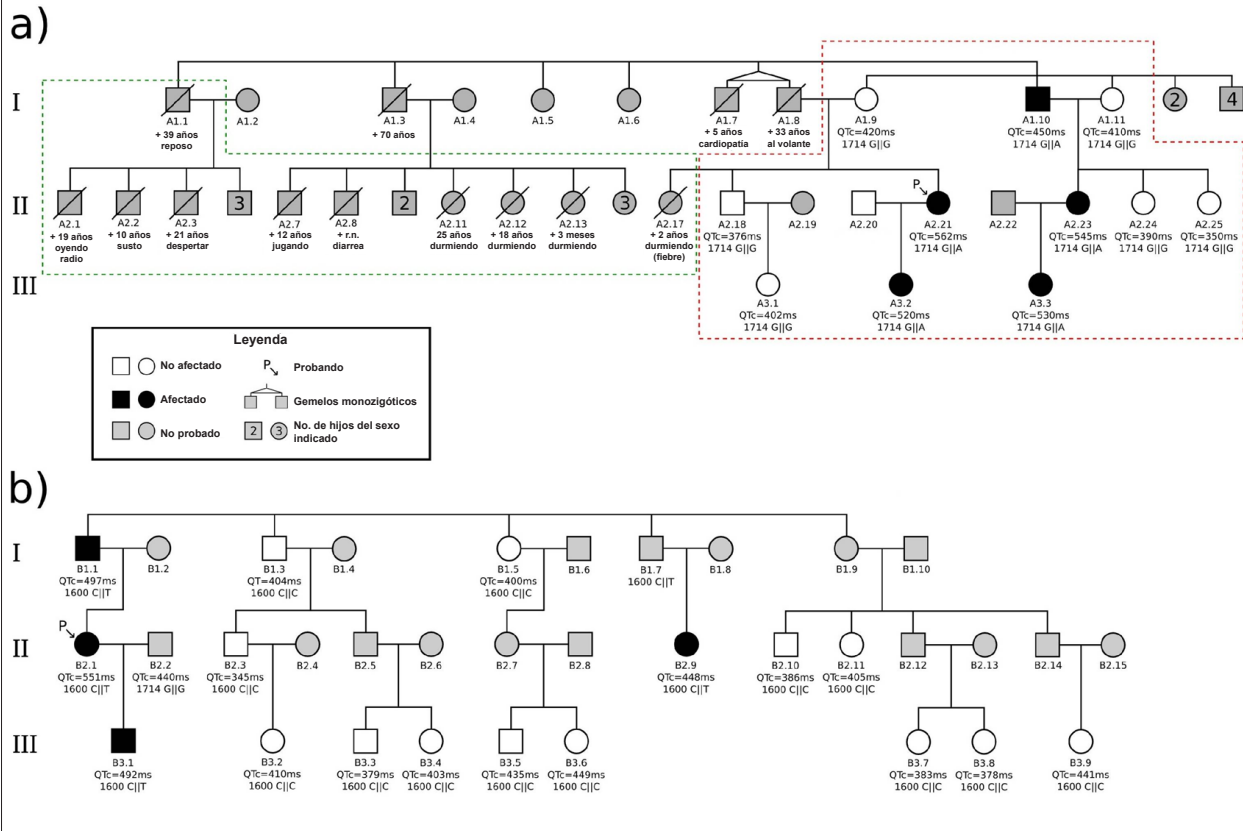


Fig. 1 - Heredogramas de las familias estudiadas. Las probandas están indicadas por flechas y por la letra P. Los algoritmos romanos a la izquierda representan las generaciones. Hermanos del mismo sexo sin clínica relevante están representados como cuadrado o círculo con número dentro. a) Familia A: casos de muerte súbita y la causa o circunstancia del óbito. Abajo de cada individuo fallecido está registrada la edad y la causa o circunstancia del óbito. Los individuos incluidos en el proyecto están destacados por la línea punteada roja. Abajo de cada individuo están representados el intervalo QT_c y el genotipo en la posición 1714. b) Familia B: el genotipo en la posición 1600 y el QT_c de los individuos investigados está presentado como encima.

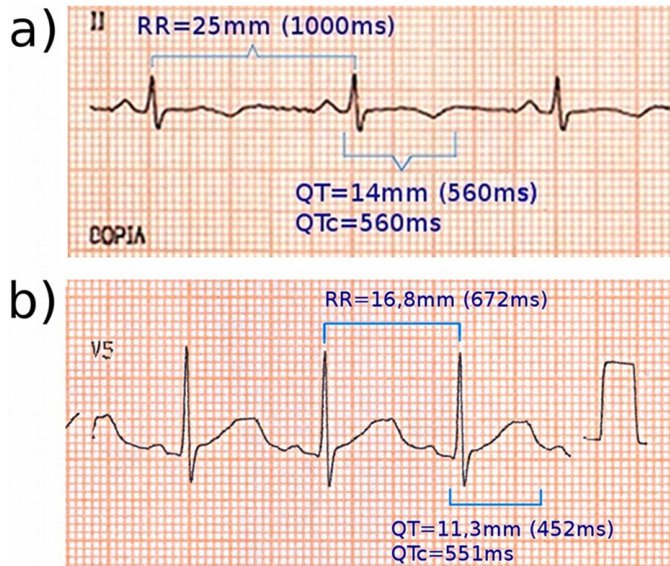


Fig. 2 - Electrocardiogramas de las probandas de las familias A (paciente A2.21) y B (paciente B2.1). El intervalo QT y el QT_c se encuentran señalados.

El análisis molecular fue capaz de detectar variaciones previamente descritas del gen KCNH2 en las probandas de ambas familias. En la probanda de la Familia A fueron identificadas las variantes génicas A1692G y G1714A, ambas en el exón 8. En la probanda de la Familia B fueron identificadas las variantes génicas C1467T, C1600T, A1692G y T1956C. Todas las variantes encontradas son polimorfismos de único nucleótido (SNPs) y las pacientes son heterocigotas en todos los *loci*. Entre tanto, las variantes génicas G1714A (Familia A) y C1600T (Familia

B), ambas en el exón 8 del gen KCNH2, son SNPs del tipo no sinónimo (*missence*) y fueron previamente descritas como asociadas a la SQTL. La identificación de esas variantes génicas es destacada en la Figura 3. Las otras variantes encontradas son polimorfismos comunes y sin relevancia clínica demostrada¹².

Las variantes *missence* G1714A y C1600T fueron investigadas en los familiares de los probandos A2.21 y B2.1, respectivamente. Los resultados de ese genotipaje están presentados en las Figuras 1A y 1B. En la Familia A el QT_c

Tabla 1 - Características clínicas y electrocardiográficas de los individuos investigados en las familias A y B

Individuo	Sexo	Edad	Presentación clínica	FC (lpm)	QT _c (ms)	Morfología del segmento ST	Arritmias documentadas	ES
A1.9	F	62	Asintomática	55	420	Normal	-	1,5
A1.10	M	80	Asintomática	65	450	Normal	-	2,5
A1.11	F	65	Asintomática	75	410	Normal	-	1
A2.18	M	39	Asintomática	56	376	Normal	-	1
A2.21	F	36	Síncope (estímulo auditorio); MSA con uso de ATB	48	562	T Bifásica en DII, aVF, aVR, V1 a V4	TdP	5,5
A2.23	F	38	Asintomática	67	545	Normal	-	4
A2.24	F	44	Asintomática	99	390	T achatada	-	1
A2.25	F	39	Asintomática	60	350	T bifásica V1 a V4	-	1
A3.1	F	10	Asintomática	84	402	Normal	-	1
A3.2	F	14	Asintomática	54	520	T bifásica V3 a V5	-	5,5
A3.3	F	15	Asintomática	68	530	Ondas U prominentes	-	4
B1.1	M	69	Asintomático	61	497	Onda T achatada	-	4
B1.3	M	67	Asintomático	66	404*	Normal	FA	1
B1.5	F	65	Asintomática	68	400	Normal	-	1
B2.1	F	42	Presíncope a los esfuerzos	89	551	Ondas T achatadas; entalles en aVF, V2, V3; ondas U prominentes.	TSVNS	5
B2.3	M	30	Asintomático	54	345	Normal	-	1
B2.9	F	37	MSA con uso de ATB	59	448†	T achatada; entalles en V2, V4, V5.	-	4
B2.10	M	33	Asintomático	61	386	Normal	-	1
B2.11	F	39	Asintomática	83	405	Normal	-	1
B3.1	M	15	Presíncope con estrés emocional	52	492	Bradicardia. T con ascensión lenta. Ondas U prominentes.	-	5
B3.2	F	1a4m	Asintomática	106	410	Normal	-	1
B3.3	M	11	Asintomático	71	379	Normal	-	1
B3.4	F	5	Asintomática	86	403	Normal	-	1
B3.5	M	11	Asintomático	75	435	Normal	-	1
B3.6	F	8	Asintomática	91	449	Normal	-	1
B3.7	F	9	Asintomática	84	383	Normal	-	1
B3.8	F	13	Asintomática	61	378	Normal	-	1
B3.9	F	5m	Asintomática	126	441	Normal	-	1

La numeración de los individuos sigue el estándar adoptado en los heredogramas (Figura 1); las probandas se encuentran destacadas en negrito; ES - Escore de Schwartz; ATB - antibiótico; MSA - muerte súbita abortada; FA - fibrilación atrial; TSVNS - taquicardia supraventricular no sostenida; (*) utilizado el intervalo QT al revés del QT_c debido a la presencia de FA; (†) EGG registrado en la vigencia del tratamiento con betabloqueante.

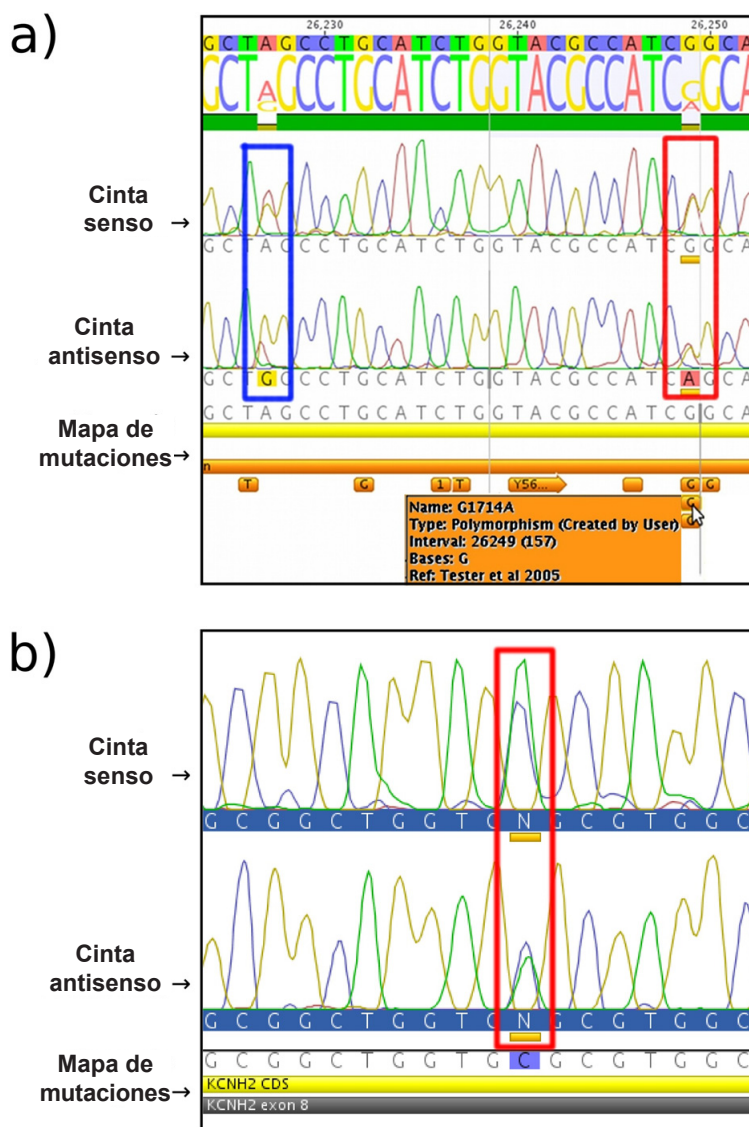


Fig. 3 - Identificación de variantes génicas por secuenciación y análisis con el software Geneious Pro™. Los electroferogramas del secuenciación del exón 8 del gen *KCNH2* (cintas senso y antisense) de las probandas fueron alineados con el mapa de mutaciones ya descritas (ver Métodos). Las cintas senso y antisense y el mapa de mutaciones están indicados. a) Familia A: la variante A1692G está destacada por un rectángulo azul y la variante G1714A por un rectángulo rojo. b) Familia B: la variante C1600T está destacada por un rectángulo rojo.

medio en los portadores de la variante génica era de 521 ± 42 ms, comparado a un QT_c medio de 391 ± 21 ms en los no portadores. En la Familia B la media del intervalo QT_c en los portadores de la variante era de 497 ± 42 ms, comparado con un QT_c medio de 404 ± 29 ms en los no portadores. Se observa, por lo tanto, que todos los portadores de los alelos G1714A y C1600T presentan prolongación del intervalo QT_c , confirmando la relevancia clínica de las variantes encontradas.

Discusión

En este trabajo realizamos el secuenciación completo de las regiones codificantes de los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y

SCN5A buscando identificar las variantes génicas asociadas a la SQT en dos familias conteniendo miembros diagnosticados con la enfermedad. A pesar de que la selección de variantes génicas en la SQT frecuentemente es hecha utilizando la técnica de SSCP (*single strand conformation polymorphism*), que requiere mayor trabajo manual y presenta sensibilidad inferior a la de secuenciación.

Las dificultades de implementación en rutina de un método diagnóstico molecular de alta complejidad como la del SQT nos llevaron a desarrollar, utilizando el software Geneious Pro®, una secuencia de pasos para identificar con precisión mutaciones nuevas y ya descritas. Los recursos de manipulación y anotación de secuencias de

ese *software* fueron explorados para la construcción de mapas de mutación indicando los lugares con mutaciones descritas, permitiendo el alineamiento de las secuencias de los diferentes genes obtenidas de los pacientes con los mapas de los genes KCNQ1, KCNH2 y SCN5A construidos, facilitando la identificación de diferencias entre ambas secuencias. El alineamiento realizado en ese programa permite, aun, eliminar artefactos de secuenciación. En el caso de que una variante génica encontrada haya sido previamente descrita como asociada a la SQT, la referencia bibliográfica de la misma estará prontamente disponible en las marcaciones del mapa. Además de eso, el programa organiza los archivos internamente en un sistema de carpetas, de modo que los diversos archivos de secuencia originales quedan centralizados e indexados, lo que es crucial cuando se toma en cuenta el enorme volumen de información generada para cada paciente. De esa forma, la metodología desarrollada permite el análisis de las secuencias de manera eficiente y de fácil manejo, reduciendo la posibilidad de errores de interpretación y posibilitando el entrenamiento técnico de personal para la futura implementación de rutina de esa metodología para la red SUS.

La metodología de análisis molecular por nosotros establecida fue capaz de identificar variantes génicas previamente asociadas a la enfermedad en dos familias seleccionadas por los criterios clínicos ya definidos. Ambas familias investigadas presentaron variantes asociadas a la SQT en el gen KCNH2, lo que permitió clasificar ambas pacientes como portadoras de SQT tipo 2. Ese gen codifica la subunidad alfa del canal de potasio $K_v11.1$, responsable por la corriente I_{kr} en el potencial de acción cardíaco²⁶. La variante G1714A encontrada en la Familia A ya fue previamente descrita²⁷ como asociada a la SQT, y provoca la substitución del aminoácido glicina por serina en la posición 572 de la proteína, correspondiente al poro. Entre tanto, las consecuencias electrofisiológicas de la mutación en la actividad del canal iónico aun no fueron investigadas. La presencia de la variante génica G1714A en la familia aquí descrita refuerza la evidencia en favor de la patogenicidad de esa alteración. La variante génica C1600T, encontrada en la Familia B, provoca el intercambio del aminoácido arginina por cisteína en la posición 534 del polipéptido, correspondiente al sensor de voltaje del mismo canal iónico²⁸. Además de eso, en contraste a la variante anterior, los efectos de esa alteración fueron investigados electrofisiológicamente por Nakajima et al²⁹, que demostraron reducción del umbral de activación del canal, aceleración de la activación e inactivación, y reducción de la inactivación del canal en reposo.

Curiosamente, el genotipo identificado fue el del subtipo 2 - el segundo más frecuente, respondiendo por cerca de 30% de los casos. Por otro lado, aunque esas familias fuesen portadoras del mismo subtipo, y de que las variantes génicas están bastante próximas (en el mismo exón, inclusive), la presentación clínica de la enfermedad difería entre las mismas, tal vez debido a alteraciones en diferentes regiones del canal iónico. La asociación entre la región alterada en la estructura de la proteína, y la gravedad de la enfermedad fue investigada por Moss et al¹⁹. Los autores demostraron que las mutaciones en la región del poro del canal codificado por el gen KCNH2 están asociadas a un riesgo muy aumentado - cerca de 3

veces mayor - de eventos arritmogénicos. Un estudio de Shimizu et al³⁰ obtuvo resultados similares. En conformidad con esos trabajos, observamos una gravedad mucho mayor de la enfermedad en la Familia A (mutación en la región S5-Poro) que en la Familia B (mutación en el segmento transmembrana S4 - sensor de voltaje). Entre tanto, otro factor descrito que resulta en mayor gravedad en la presentación clínica es la presencia de más de una mutación causante de SQT (*compound mutations*), que ocurre en cerca de 2% de los casos³¹. Como no fueron investigadas las variantes génicas en los genes menos frecuentemente asociados a la SQT (SQT tipos 4-12), no podemos excluir la posibilidad de que la Familia A sea un caso de ese tipo.

Fueron encontrados portadores asintomáticos, pero no portadores silenciosos con ECG normal. Portadores silenciosos son descritos en la SQT^{4,5,32}, siendo más comunes en la SQT1¹⁴. El individuo A1.10 es ilustrativo de la complejidad de la enfermedad: aunque sea portador de la variante asociada a la enfermedad, su electrocardiograma muestra una prolongación apenas limítrofe del intervalo QT_c (450 ms) y su Escore de Schwartz es igual a 2,5. Diversos factores pueden influenciar el intervalo QT - algunas enfermedades, las concentraciones séricas de iones calcio y potasio y diversos medicamentos - y de esa forma pueden influenciar en la presentación de la SQT. Además de eso, algunos trabajos recientes demostraron que polimorfismos comunes en genes de receptores adrenérgicos cardíacos son capaces de modular la duración del intervalo QT y la gravedad de la presentación clínica entre portadores de la misma mutación en el gen KCNQ1³³. Por lo tanto, la investigación de variantes génicas en la SQT puede auxiliar en la identificación de portadores asintomáticos con el intervalo QT limítrofe, y puede ser útil al asesoramiento genético.

Conclusión

Fue realizada la investigación molecular de dos familias con diagnóstico clínico de SQT, han sido encontradas dos variantes génicas distintas previamente asociadas a la enfermedad. Fue implementada metodología de amplificación y secuenciación de la región codificante completa de los genes KCNQ1, KCNH2 y SCN5A, y desarrollado método computacional simplificado de análisis de las secuencias para la investigación de las variantes génicas utilizando recursos del *software* Geneious Pro®, que facilita el entrenamiento de personal técnico para la futura aplicación de esa metodología en la rutina diagnóstica.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

CNPq financió el presente estudio y FAPERJ financió parcialmente.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de Disertación de Maestría de Ernesto Curty, por la *Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro*.

Referencias

1. Ward OC. A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc.* 1964;54:103-6.
2. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J.* 1957;54(1):59-68.
3. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G, et al. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 2009;120(18):1761-7.
4. Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Locati E, Carleen E. The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation.* 1985;71(1):17-21.
5. Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome: an update. *Circulation.* 1993;88(2):782-4.
6. Hofman N, Wilde AAM, Kääh S, van Langen IM, Tanck MWT, Mannens MAM, et al. Diagnostic criteria for congenital long QT syndrome in the era of molecular genetics: do we need a scoring system? *Eur Heart J.* 2007;28(5):575-80.
7. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell.* 1995;80(5):805-11.
8. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell.* 1995;80(5):795-803.
9. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 2003;421(6923):634-9.
10. Kaufman ES. Mechanisms and clinical management of inherited channelopathies: long QT syndrome, Brugada syndrome, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and short QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2009;6(8 Suppl):S51-5.
11. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 2000;102(10):1178-85.
12. Priori SG, Napolitano C, Wilson J, deGiuli L, Rosetti S. Inherited Arrhythmias Database [documento na Internet]. IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri; 2000. Atualizado em 2 de março de 2010. [Citado em 2010 maio05]. Disponível em <http://www.fsm.it/cardmoc/>.
13. Ackerman MJ. Cardiac causes of sudden unexpected death in children and their relationship to seizures and syncope: genetic testing for cardiac electropathies. *Semin Pediatr Neurol.* 2005;12(1):52-8.
14. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, et al. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348(19):1866-74.
15. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001;103(1):89-95.
16. Khositseth A, Tester DJ, Will ML, Bell CM, Ackerman MJ. Identification of a common genetic substrate underlying postpartum cardiac events in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2004;1(1):60-4.
17. Shimizu W, Antzelevitch C. Differential effects of beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):778-86.
18. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Grillo M, Bloise R, Ronchetti E, et al. Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *JAMA.* 2004;292(11):1341-4.
19. Moss AJ, Zareba W, Kaufman ES, Gattman E, Peterson DR, Benhorin J, et al. Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Circulation.* 2002;105(7):794-9.
20. Postema PG, Jong JSSGD, der Bilt IACV, Wilde AAM. Accurate electrocardiographic assessment of the QT interval: teach the tangent. *Heart Rhythm.* 2008;5(7):1015-8.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
22. Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics.* 1996;34(1):9-16.
23. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics.* 1998;51(1):86-97.
24. Syrris P, Murray A, Carter ND, McKenna WM, Jeffery S. Mutation detection in long QT syndrome: a comprehensive set of primers and PCR conditions. *J Med Genet.* 2001;38(10):705-10.
25. Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, et al. Geneious, v. 4.8; 2009. [Acesso em 2010 mar 23] Disponível em <http://www.geneious.com/>.
26. January CT, Gong Q, Zhou Z. Long QT syndrome: cellular basis and arrhythmia mechanism in LQT2. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2000;11(12):1413-8.
27. Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2005;2(5):507-17.
28. Itoh T, Tanaka T, Nagai R, Kamiya T, Sawayama T, Nakayama T, et al. Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Hum Genet.* 1998;102(4):435-9.
29. Nakajima T, Furukawa T, Hirano Y, Tanaka T, Sakurada H, Takahashi T, et al. Voltage-shift of the current activation in HERG S4 mutation (R534C) in LQT2. *Cardiovasc Res.* 1999;44(2):283-93.
30. Shimizu W, Horie M, Ohno S, Takenaka K, Yamaguchi M, Shimizu M, et al. Mutation site-specific differences in arrhythmic risk and sensitivity to sympathetic stimulation in the LQT1 form of congenital long QT syndrome: multicenter study in Japan. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(1):117-25.
31. Westenskow P, Splawski I, Timothy KW, Keating MT, Sanguinetti MC. Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. *Circulation.* 2004;109(15):1834-41.
32. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation.* 1999;99(4):529-33.
33. Brink PA, Schwartz PJ. Of founder populations, long QT syndrome, and destiny. *Heart Rhythm.* 2009;6(11 Suppl):S25-S33.