

Investigação de Variantes Gênicas de Canais Iônicos em Pacientes com Síndrome do QT Longo

Investigation of Ion Channel Gene Variants in Patients with Long QT Syndrome

Ernesto Curty¹, Fernando Eugênio dos Santos Cruz², Fabiane Santos Lima¹, Jorge Luiz Albuquerque Coutinho², Rosane Silva³, Turán Peter Urményi³, 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

Resumo

Fundamento: A síndrome do QT longo (SQTL) é uma síndrome arritmica herdada com aumento do intervalo QT e risco de morte súbita. Mutações nos genes *KCNQ1*, *KCNH2* e *SCN5A* respondem por 90% dos casos com genótipo determinado, e a genotipagem é informativa para aconselhamento genético e melhor manejo da doença.

Objetivo: Investigação molecular e análise computacional de variantes gênicas de *KCNQ1*, *KCNH2* e *SCN5A* associadas à SQTL em famílias portadoras da doença.

Métodos: As regiões codificantes dos genes *KCNQ1*, *KCNH2* e *SCN5A* de pacientes com SQTL e familiares foram sequenciadas e analisadas utilizando o *software* Geneious Pro[®].

Resultados: Foram investigadas duas famílias com critérios clínicos para SQTL. A probanda da Família A apresentava $QT_c = 562$ ms, Escore de Schwartz = 5,5. A genotipagem identificou a mutação G1714A no gene *KCNH2*. Foi observado $QT_c = 521 \pm 42$ ms nos familiares portadores da mutação contra $QT_c = 391 \pm 21$ ms de não portadores. A probanda da Família B apresentava $QT_c = 551$ ms, Escore de Schwartz = 5. A genotipagem identificou a mutação G1600T, no mesmo gene. A análise dos familiares revelou $QT_c = 497 \pm 42$ ms nos portadores da mutação, contra $QT_c = 404 \pm 29$ ms nos não portadores.

Conclusão: Foram encontradas duas variantes gênicas previamente associadas à SQTL em duas famílias com diagnóstico clínico de SQTL. Em todos os familiares portadores das mutações foi observado o prolongamento do intervalo QT. Foi desenvolvida uma estratégia para identificação de variantes dos genes *KCNQ1*, *KCNH2* e *SCN5A*, possibilitando o treinamento de pessoal técnico para futura aplicação na rotina diagnóstica. (Arq Bras Cardiol 2011;96(3):172-178)

Palavras-chave: Síndrome do QT longo, canais iônicos, mutação, morte súbita cardíaca.

Abstract

Background: The long QT syndrome (LQTS) is an inherited arrhythmia syndrome with increased QT interval and risk of sudden death. Mutations in genes *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* account for 90% of cases with genotype determined, and genotyping is informative for genetic counseling and better disease management.

Objective: Molecular investigation and computational analysis of gene variants of *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* associated with LQTS, in families with the disease.

Methods: The coding regions of genes *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* in patients with LQTS and their family members were sequenced and analyzed using Geneious Pro[™] software.

Results: Two families with clinical criteria for LQTS were investigated. The proband of Family A had $QT_c = 562$ ms, Schwartz Score = 5.5. The genotyping identified the G1714A mutation in the *KCNH2* gene. $QT_c = 521 \pm 42$ ms was observed in family members carrying the mutation against $QT_c = 391 \pm 21$ ms for non-carriers. The proband of Family B had $QT_c = 551$ ms, Schwartz Score = 5.5. The genotyping identified the G1600T mutation, in the same gene. The analysis of family members revealed $QT_c = 497 \pm 42$ ms in mutation carriers, compared with $QT_c = 404 \pm 29$ ms in non-carriers.

Conclusion: Two gene variants previously associated with LQTS were found in two families clinically diagnosed with LQTS. The prolongation of the QT interval was observed in all family members carrying the mutations. A strategy was developed to identify variants of genes *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A*, making it possible to train technical staff for future application to diagnosis routine. (Arq Bras Cardiol 2011;96(3):172-178)

Keywords: Long QT syndrome; ion channels; mutation; death sudden cardiac.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: 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

Artigo recebido em 23/08/10; revisado recebido em 23/08/10; aceito em 24/09/10.

Introdução

A síndrome do QT longo (SQTL)^{1,2} é uma doença genética com prevalência de 1:2.000³ que cursa com risco de morte súbita por arritmias ventriculares em um coração estruturalmente normal⁴. O diagnóstico é feito através do escore de Schwartz⁵, que combina critérios eletrocardiográficos e da história clínica, classificando a probabilidade de SQTL em “baixa” (< 1) “intermediária” (2 e 3) e “alta” (≥ 4). Um escore de Schwartz ≥ 4 tem especificidade > 99% para o diagnóstico da SQTL⁶.

Diferentes tipos de SQTL são provocados por variantes em genes de canais iônicos^{7,8} e no gene da ankirina⁹. Atualmente são descritos 12 tipos¹⁰, porém os tipos 1, 2 e 3 respondem por 90% dos casos com genótipo identificado¹¹. Embora mais de 700 variantes tenham sido descritas¹², em 29% dos casos a base genética não foi identificada¹³. Os vários tipos de SQTL diferem quanto ao risco de morte súbita¹⁴, aos gatilhos para os episódios de arritmia^{15,16} e à resposta ao tratamento farmacológico^{17,18}. Além disso, a gravidade depende da região afetada do canal¹⁹, o que torna a identificação da mutação importante para o manejo da doença.

Apesar do grande número de variantes envolvidas, a pesquisa de variantes gênicas associadas à SQTL (genotipagem) está sendo cada vez mais utilizada na prática clínica. Que seja de nosso conhecimento, nenhuma unidade do Sistema Único de Saúde realiza atualmente a genotipagem da SQTL. Por esta razão, foram investigadas variantes gênicas associadas à SQTL em duas famílias com diagnóstico clínico da doença. As condições de genotipagem dos genes KCNQ1, KCNH2 e SCN5A foram estabelecidas, e foi utilizada análise computacional para a identificação facilitada de mutações já descritas e de novas variantes gênicas na população brasileira.

Métodos

Pacientes

Pacientes encaminhados ao Instituto Nacional de Cardiologia com suspeita clínica de SQTL foram submetidos a anamnese e exame físico por um cardiologista com experiência em SQTL (FESCF[®]). Os eletrocardiogramas foram analisados independentemente por dois pesquisadores (EC e FESCF[®]), e a medida do intervalo QT realizada pelo método da tangente²⁰. Nenhum dos probandos apresentava sinais eletrocardiográficos de hipertrofia cardíaca, distúrbios da condução ou isquemia miocárdica. Probandos com escore de Schwartz ≥ 4 e familiares em primeiro grau foram submetidos à análise molecular, num total de 29 indivíduos de duas famílias.

Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico era extraído de sangue periférico²¹. Os exons correspondentes às regiões codificantes dos 3 genes investigados eram amplificados por PCR utilizando os iniciadores previamente descritos^{22,23}. Os exons dos genes KCNQ1 e KCNH2 eram amplificados utilizando, respectivamente, os programas “B” e “C” previamente publicados por Syrris e cols.²⁴. Para amplificação dos exons 1A de KCNQ1 e 4 de KCNH2 era adicionado à reação o

reagente *PCRx Enhancer* (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Os exons do gene SCN5A eram amplificados utilizando condições por nós estabelecidas: 0,2 mM dXTP, 3 mM MgCl₂, 0,5 μM de iniciadores (senso+antissenso), 0,625 UI de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen), 200 ng de DNA molde, em um volume final de 50 μl. O programa consistia em 94° C/10 min; 30 ciclos de 94° C/1 min, 58° C/1 min, 72° C/2 min.; extensão final a 72° C/10 min.

Sequenciamento automático de DNA

O sequenciamento de produtos de PCR purificados em filtros *Millipore PCR Cleanup* era realizado utilizando iniciadores senso ou antissenso, em um equipamento MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) com reagentes *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (GE Healthcare Life Systems) conforme as instruções do fabricante.

Análise das sequências obtidas para identificação das mutações

Foi utilizado o *software* Geneious Pro^{®25} para análise das sequências obtidas e geração de mapas de mutações já descritas para os genes estudados. Resumidamente, as sequências das regiões codificante e genômicas dos genes KCNQ1 (nº de acesso NM_000218 e NG_008935.1), KCNH2 (nº de acesso NM_000238 e NG_008916) e SCN5A (nº de acesso NM_000335 e NG_008934.1) foram importadas do GenBank e as mutações conhecidas (*Inherited Arrhythmias Database*¹²) adicionadas a estas no *software* com as respectivas referências bibliográficas. Em seguida foram assinalados os sítios de anelamento dos iniciadores, intrônicos em sua maioria, utilizados nas reações de amplificação e as porções centrais dos introns foram removidas para facilitar a análise. A comparação direta dos mapas de mutações com as sequências obtidas de pacientes permite visualizar simultaneamente a qualidade do sequenciamento e as mutações previamente descritas.

Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia (processo nº 0187/4.01.08). Os pacientes e familiares foram informados dos objetivos e riscos do estudo e concordaram em participar do mesmo através de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Resultados

Foi realizada pesquisa de variantes gênicas de KCNQ1, KCNH2 e SCN5A em duas famílias com diagnóstico clínico de SQTL, incluindo na análise dois probandos e seus respectivos familiares, perfazendo 11 indivíduos na Família A e 17 na Família B. A análise dos variantes foi otimizada mediante criação de mapas de mutação com o *software* Geneious Pro[®] (dados não mostrados).

A probanda da Família A (Figura 1A, paciente A2.21), de 36 anos, começou a sentir palpitações aos 15 anos; aos 24 anos passou a apresentar episódios de palpitações seguidas de síncope desencadeados por estresse emocional, ruídos

Artigo Original

súbitos e no despertar, sendo feito o diagnóstico de SQTL. A probanda da Família B (Figura 1B, paciente B2.1) apresentava 42 anos e episódios de pré-síncope durante esforços físicos. A mesma buscou atendimento médico e recebeu o diagnóstico de SQTL após sua prima (#B2.9) apresentar um episódio de morte súbita abortada (MSA) em ambiente hospitalar. Os ECGs com medidas do intervalo QT das probandas estão mostrados na Figura 2. A paciente A2.21 apresentava $QT_c = 560$ ms (Figura 2A) e a paciente B2.1 $QT_c = 551$ ms (Figura 2B). Na história familiar da probanda A2.21 era possível identificar 10 casos de morte súbita em idades precoces, compatíveis com SQTL. (Figura 1A, destacado em verde). Na Família B havia somente um caso de MSA (#B2.9).

Os dados clínicos e eletrocardiográficos dos indivíduos de ambas famílias estão apresentados na Tabela 1. A Família A totalizava 9 mulheres e 2 homens, com idade entre 14 e 80 anos. A Família B continha 17 indivíduos (7 do sexo masculino), com idades entre 5 meses e 69 anos. Podem ser identificados 8 indivíduos com Escore de Schwartz ≥ 4 , quatro na Família A (A2.21, A2.23, A3.2, A3.3) e 4 na Família B (B1.1, B2.1, B2.9, B3.1). Dois desses indivíduos (A2.21 e B2.9) apresentaram episódios de morte súbita abortada (MSA) e foram tratados com CDI + betabloqueador. Os

demais (A1.10, A2.23, A3.2, A3.3, B1.1) eram assintomáticos e foram tratados com betabloqueadores isoladamente. Um dos casos de MSA (B2.9) apresentava intervalo $QT_c = 448$ ms, entretanto, este ECG foi registrado na vigência do tratamento com betabloqueador, que pode reduzir o intervalo QT. Apenas um indivíduo (A1.10) apresentava probabilidade intermediária de SQTL (Escore de Schwartz = 2,5) e QT_c limítrofe (450 ms). A análise do heredograma sugeriu que esse indivíduo deveria ser portador de mutação causadora de SQTL, o que foi confirmado pela análise molecular. Apenas um indivíduo (A2.21) apresentava registro de *Torsades de Pointes*.

A análise molecular foi capaz de detectar variações previamente descritas do gene *KCNH2* nas probandas de ambas famílias. Na probanda da Família A foram identificadas as variantes gênicas A1692G e G1714A, ambas no exon 8. Na probanda da Família B foram identificadas as variantes gênicas C1467T, C1600T, A1692G e T1956C. Todas as variantes encontradas são polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) e as pacientes são heterozigotas em todos os *loci*. Entretanto, as variantes gênicas G1714A (Família A) e C1600T (Família B), ambas no exon 8 do gene *KCNH2*, são SNPs do tipo não sinônimo (*missence*) e foram previamente descritas como associadas à SQTL. A identificação dessas variantes gênicas

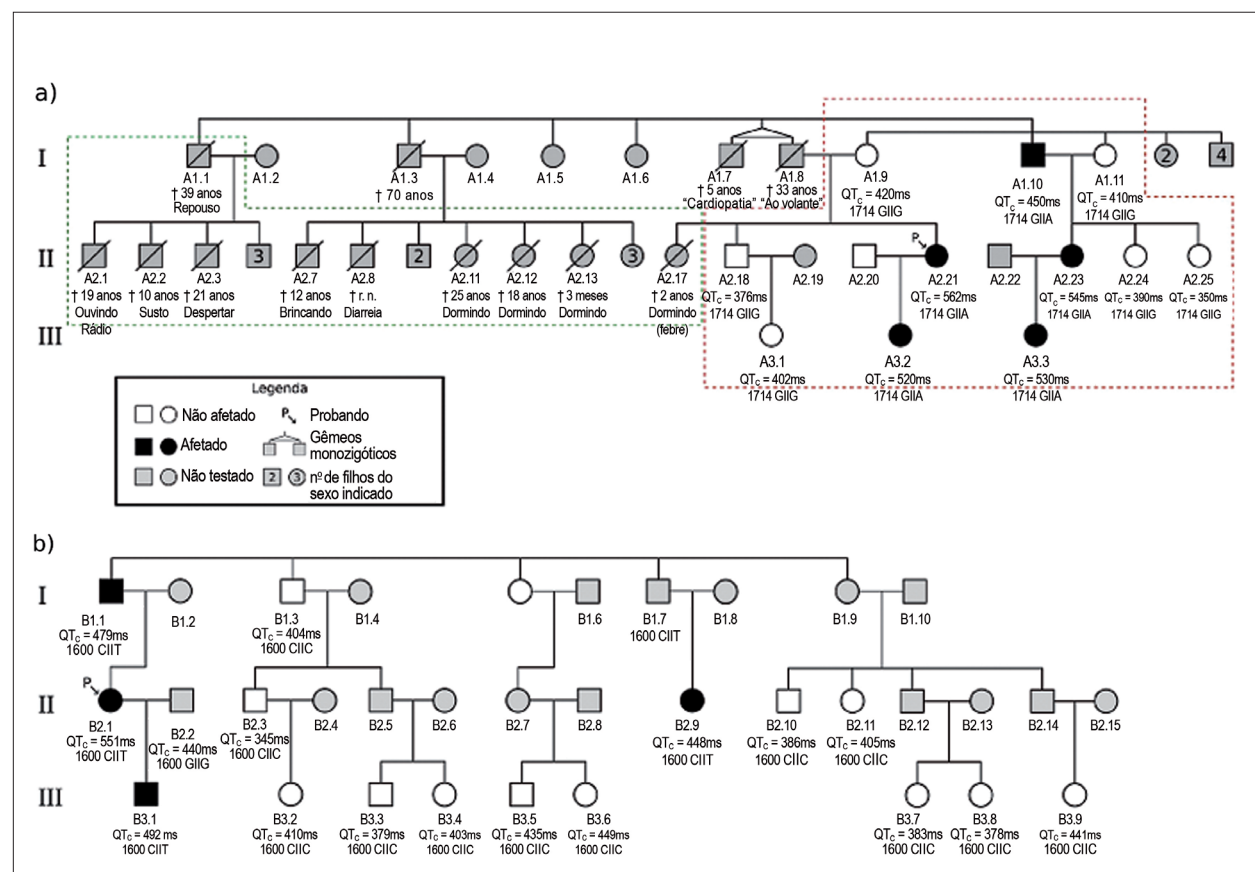


Fig. 1 - Heredogramas das famílias estudadas. As probandas estão indicadas por setas e pela letra P. Os algarismos romanos à esquerda representam as gerações. Irmãos do mesmo sexo sem clínica relevante estão representados como quadrado ou círculo com número dentro. a) Família A - casos de morte súbita estão destacados pela linha tracejada verde. Abaixo de cada indivíduo falecido está registrada a idade e a causa ou circunstância do óbito. Os indivíduos incluídos no projeto estão destacados pela linha tracejada vermelha. Abaixo de cada indivíduo estão representados o intervalo QT_c e o genótipo na posição 1714. b) Família B - o genótipo na posição 1600 e o QT_c dos indivíduos investigados está apresentado como acima.

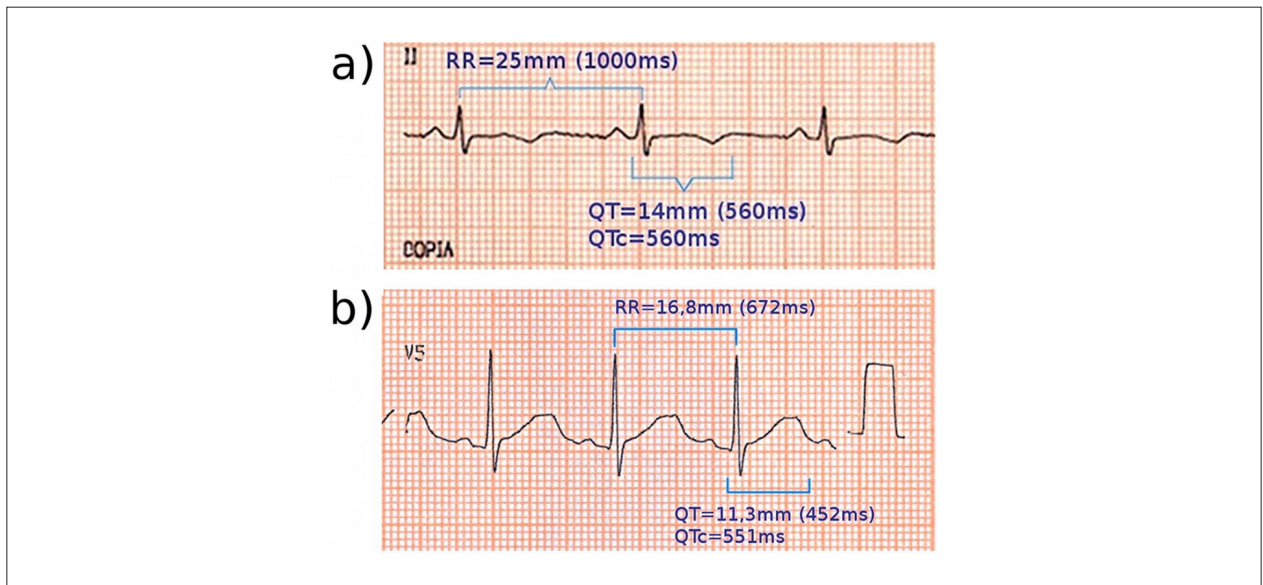


Fig. 2 - Eletrocardiogramas das probandas das famílias A (paciente A2.21) e B (paciente B2.1). O intervalo QT e o QTc encontram-se assinalados.

é destacada na Figura 3. As outras variantes encontradas são polimorfismos comuns e sem relevância clínica demonstrada¹².

As variantes *missense* G1714A e C1600T foram pesquisadas nos familiares dos probandos A2.21 e B2.1, respectivamente. Os resultados dessa genotipagem estão apresentados nas Figuras 1A e 1B. Na Família A o QT_C médio nos portadores da variante gênica era de 521 ± 42 ms, comparado a um QT_C médio de 391 ± 21 ms nos não portadores. Na Família B a média do intervalo QT_C nos portadores da variante era de 497 ± 42 ms, comparado com um QT_C médio de 404 ± 29 ms nos não portadores. Observa-se, portanto, que todos os portadores dos alelos G1714A e C1600T apresentam prolongamento do intervalo QT_C, confirmando a relevância clínica das variantes encontradas.

Discussão

Neste trabalho realizamos o sequenciamento completo das regiões codificantes dos genes KCNQ1, KCNH2 e SCN5A visando identificar as variantes gênicas associadas à SQTL em duas famílias contendo membros diagnosticados com a doença. A triagem de variantes gênicas na SQTL frequentemente é feita utilizando a técnica de SSCP (*single strand conformation polymorphism*), que requer maior trabalho manual e apresenta sensibilidade inferior à de sequenciamento.

As dificuldades de implementação em rotina de um método diagnóstico molecular de alta complexidade como a do SQTL nos levaram a desenvolver, utilizando o *software* Geneious Pro®, uma sequência de passos para identificar com precisão mutações novas e já descritas. Os recursos de manipulação e anotação de sequências desse *software* foram explorados para a construção de mapas de mutação indicando os locais com mutações descritas, permitindo o alinhamento das sequências dos diferentes genes obtidas dos pacientes com os mapas dos genes KCNQ1, KCNH2 e SCN5A construídos, facilitando a identificação de diferenças entre ambas sequências. O

alinhamento realizado nesse programa permite, ainda, eliminar artefatos de sequenciamento. Caso uma variante gênica encontrada tenha sido previamente descrita como associada à SQTL, a referência bibliográfica da mesma estará prontamente disponível nas marcações do mapa. Além disso, o programa organiza os arquivos internamente em um sistema de pastas, de modo que os diversos arquivos de sequência originais ficam centralizados e indexados, o que é crucial quando se leva em conta o enorme volume de informação gerada para cada paciente. Dessa forma, a metodologia desenvolvida permite a análise das sequências de maneira eficiente e de fácil manuseio, reduzindo a chance de erros de interpretação e possibilitando o treinamento técnico de pessoal para a futura implementação de rotina dessa metodologia para a rede SUS.

A metodologia de análise molecular por nós estabelecida foi capaz de identificar variantes gênicas previamente associadas à doença em duas famílias selecionadas pelos critérios clínicos já definidos. Ambas as famílias investigadas apresentaram variantes associadas à SQTL no gene KCNH2, o que permitiu classificar ambas as pacientes como portadoras de SQTL tipo 2. Esse gene codifica a sub-unidade alfa do canal de potássio K_v11.1, responsável pela corrente I_{Kr} no potencial de ação cardíaco²⁶. A variante G1714A encontrada na Família A já foi previamente descrita²⁷ como associada à SQTL, e provoca a substituição do aminoácido glicina por serina na posição 572 da proteína, correspondente ao poro. Entretanto, as consequências eletrofisiológicas da mutação na atividade do canal iônico ainda não foram investigadas. A presença da variante gênica G1714A na família aqui descrita reforça a evidência em favor da patogenicidade dessa alteração. A variante gênica C1600T, encontrada na Família B, provoca a troca do aminoácido arginina por cisteína na posição 534 do polipeptídeo, correspondente ao sensor de voltagem do mesmo canal iônico²⁸. Além disso, em contraste à variante anterior, os efeitos dessa alteração foram investigados eletrofisiologicamente por Nakajima e cols.²⁹,

Artigo Original

Tabela 1 - Características clínicas e eletrocardiográficas dos indivíduos investigados nas famílias A e B

Indivíduo	Sexo	Idade	Apresentação clínica	FC (bpm)	QT _c (ms)	Morfologia do segmento ST	Arritmias documentadas	ES
A1.9	F	62	Assintomática	55	420	Normal	-	1,5
A1.10	M	80	Assintomática	65	450	Normal	-	2,5
A1.11	F	65	Assintomática	75	410	Normal	-	1
A2.18	M	39	Assintomática	56	376	Normal	-	1
A2.21	F	36	Síncope (estímulo auditório); MSA com uso de ATB	48	562	T Bifásica em DII, aVF, aVR, V1 a V4	TdP	5,5
A2.23	F	38	Assintomática	67	545	Normal	-	4
A2.24	F	44	Assintomática	99	390	T achatada	-	1
A2.25	F	39	Assintomática	60	350	T bifásica V1 a V4	-	1
A3.1	F	10	Assintomática	84	402	Normal	-	1
A3.2	F	14	Assintomática	54	520	T bifásica V3 a V5	-	5,5
A3.3	F	15	Assintomática	68	530	Ondas U proeminentes	-	4
B1.1	M	69	Assintomático	61	497	Onda T achatada	-	4
B1.3	M	67	Assintomático	66	404*	Normal	FA	1
B1.5	F	65	Assintomática	68	400	Normal	-	1
B2.1	F	42	Pré-síncope aos esforços	89	551	Ondas T achatadas; entalhes em aVF, V2, V3; ondas U proeminentes.	TSVNS	5
B2.3	M	30	Assintomático	54	345	Normal	-	1
B2.9	F	37	MSA com uso de ATB	59	448†	T achatada; entalhes em V2, V4, V5.	-	4
B2.10	M	33	Assintomático	61	386	Normal	-	1
B2.11	F	39	Assintomática	83	405	Normal	-	1
B3.1	M	15	Pré-síncope com estresse emocional	52	492	Bradycardia. T com ascensão lenta. Ondas U proeminentes.	-	5
B3.2	F	1a4m	Assintomática	106	410	Normal	-	1
B3.3	M	11	Assintomático	71	379	Normal	-	1
B3.4	F	5	Assintomática	86	403	Normal	-	1
B3.5	M	11	Assintomático	75	435	Normal	-	1
B3.6	F	8	Assintomática	91	449	Normal	-	1
B3.7	F	9	Assintomática	84	383	Normal	-	1
B3.8	F	13	Assintomática	61	378	Normal	-	1
B3.9	F	5m	Assintomática	126	441	Normal	-	1

A numeração dos indivíduos segue o padrão adotado nos heredogramas (Figura 1); as probandas encontram-se destacadas em **negrito**; ES - escore de Schwartz; ATB - antibiótico; MSA - morte súbita abortada; FA - fibrilação atrial; TSVNS - taquicardia supraventricular não sustentada; (*) utilizado o intervalo QT ao invés do QT_c devido à presença de FA; (†) EGG registrado na vigência do tratamento com betabloqueador.

que demonstraram redução do limiar de ativação do canal, aceleração da ativação e inativação, e redução da inativação do canal em repouso.

Curiosamente, o genótipo identificado foi o do subtipo 2 - o segundo mais frequente, respondendo por cerca de 30% dos casos. Por outro lado, embora essas famílias fossem portadoras do mesmo subtipo, e das variantes gênicas estarem bastante próximas (no mesmo exon, inclusive), a apresentação clínica da doença diferia entre as mesmas, talvez devido a alterações em

diferentes regiões do canal iônico. A associação entre a região alterada na estrutura da proteína, e a gravidade da doença foi investigada por Moss e cols.¹⁹. Os autores demonstraram que as mutações na região do poro do canal codificado pelo gene KCNH2 estão associadas a um risco muito aumentado - cerca de 3 vezes maior - de eventos arritmogênicos. Um estudo de Shimizu e cols.³⁰ obteve resultados similares. Em conformidade com esses trabalhos, observamos uma gravidade muito maior da doença na Família A (mutação na região S5-Poro) que na

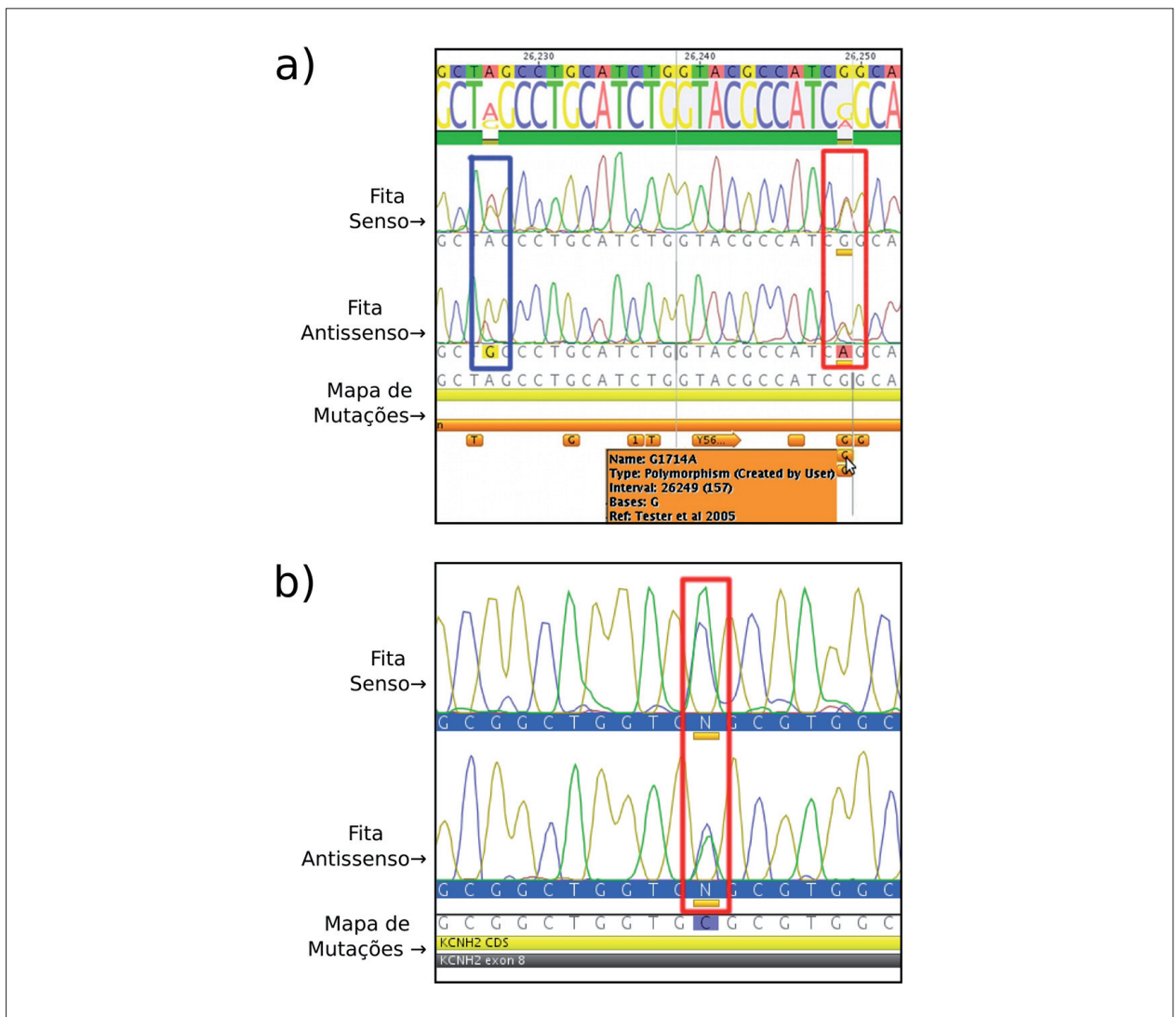


Fig. 3 - Identificação de variantes gênicas por sequenciamento e análise com o software Geneious Pro™. Os eletroferogramas do sequenciamento do exon 8 do gene *KCNH2* (fitas senso e antissenso) das probandas foram alinhados com o mapa de mutações já descritas (ver Métodos). As fitas senso e antissenso e o mapa de mutações estão indicados. a) Família A - a variante A1692G está destacada por um retângulo azul e a variante G1714A por um retângulo vermelho. b) Família B - a variante C1600T está destacada por um retângulo vermelho.

Família B (mutação no segmento transmembrana S4 - sensor de voltagem). Entretanto, outro fator descrito que resulta em maior gravidade na apresentação clínica é a presença de mais de uma mutação causadora de SQT_L (*compound mutations*), que ocorre em cerca de 2% dos casos³¹. Como não foram pesquisadas as variantes gênicas nos genes menos frequentemente associados à SQT_L (SQT_L tipos 4-12), não podemos excluir a possibilidade da Família A ser um caso desse tipo.

Foram encontrados portadores assintomáticos, mas não portadores silenciosos com ECG normal. Portadores silenciosos são descritos na SQT_L^{4,5,32}, sendo mais comuns na SQT_{L1}¹⁴. O indivíduo A1.10 é ilustrativo da complexidade da doença: embora seja portador da variante associada à doença, seu eletrocardiograma mostra um prolongamento apenas limítrofe do intervalo QT_c (450 ms) e seu Escore de Schwartz é igual a 2,5. Diversos fatores podem influenciar o intervalo QT - algumas doenças, as concentrações séricas de íons cálcio e potássio e

diversos medicamentos - e dessa forma podem influenciar na apresentação da SQT_L. Além disso, alguns trabalhos recentes demonstraram que polimorfismos comuns em genes de receptores adrenérgicos cardíacos são capazes de modular a duração do intervalo QT e a gravidade da apresentação clínica entre portadores da mesma mutação no gene *KCNQ1*³³. Portanto, a pesquisa de variantes gênicas na SQT_L pode auxiliar na identificação de portadores assintomáticos com o intervalo QT limítrofe, e pode ser útil ao aconselhamento genético.

Conclusão

Foi realizada a investigação molecular de duas famílias com diagnóstico clínico de SQT_L, tendo sido encontradas duas variantes gênicas distintas previamente associadas à doença. Foi implementada metodologia de amplificação e sequenciamento da região codificante completa dos

Artigo Original

genes *KCNQ1*, *KCNH2* e *SCN5A*, e desenvolvido método computacional simplificado de análise das sequências para a pesquisa das variantes gênicas utilizando recursos do *software* Geneious Pro®, que facilita o treinamento de pessoal técnico para a futura aplicação dessa metodologia na rotina diagnóstica.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses.

Referências

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, Käb 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, deGüli 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.