

Luciana Sacilotto Fernandes

**Estudo de análise genotípica e sua associação com características
fenotípicas em pacientes com síndrome do QT longo e Síndrome de
Brugada**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Dr. Francisco Carlos da Costa Darrieux

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Luciana Sacilotto

Estudo de análise genotípica e sua associação com características fenotípicas em pacientes com síndrome do QT longo e síndrome de Brugada / Luciana Sacilotto Fernandes. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientador: Francisco Carlos da Costa Darrieux.

Descritores: 1.Canalopatias 2.Arritmias cardíacas
3.Síndrome de brugada 4.Síndrome do QT longo 5.Morte súbita 6.Testes genéticos

USP/FM/DBD-234/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico a tese à minha família, ao InCor e aos pacientes.

Primariamente aos meus pais, João Roberto e Sonia que se dedicaram muito a nós. Ao meu marido João e aos meus filhos Luisa e Lucas.

Ao InCor, essa vibrante instituição, que reúne assistência, ensino e pesquisa.

Aos pacientes, que precisam desse carinho e nos trazem motivação para enfrentar todas as dificuldades.

Agradecimentos

Dr. Darrieux, meu orientador, inspiração de bom humor, profissionalismo, respeito e devoção ao ensino. Agradeço o carinho com que sempre me guiou e a torcida pelo meu crescimento profissional científico e assistencial. Um verdadeiro lapidador de pedras brutas.

Dr. Alexandre, Alê, meu genial co-orientador. Um presente ter conhecido e convivido com sua precisão de raciocínio. Inesquecíveis discussões sobre as variantes genéticas, que tenho certeza que ainda trarão muitos frutos.

Prof. Dr. Mauricio Scanavacca e Prof. José Eduardo Krieger, pela confiança no meu trabalho e a permissão em utilizar a estrutura do serviço.

À Prof Ludhmila Hajjar, por provocar determinação. Uma inspiração para união do ensino, pesquisa e assistência.

Aos meus professores Cidinha, Caiá, Dr Silvio (em memória), minha iniciação na medicina, na pesquisa e no ensino. Uma eterna admiração.

À minha amiga Natalia Olivetti, caprichosa, batalhadora e muito presente desde o início da tese.

A minha amiga Gabrielle Pessente, pela dedicação e respeito aos pacientes. Abraçou o projeto e a equipe, sem medir esforços e sem querer nada em troca.

Ao incansável grupo Fanny, Theo e Mariana. Tecnicamente fantásticos e com quem aprendi muito de biologia molecular, impulsionaram meu trabalho e me ajudaram até o fim.

Aos que contribuíram com dedicação para o registro dos pacientes: Zaine Calil, Carolina Lemes, Otávio Augusto Carvalho, além de arritmologistas de todo o país que sempre me incentivaram (Projeto REDE).

Aos grandes profissionais e amigos Leiliane Marcatto, Paulo Caleb, parceiros de projetos, capítulos e boas conversas.

Aos amigos do laboratório LGCM Renata Carmona, Cinthia, Emanuelle, Maúde, Marcelly, Silvana pelo carinho, competência e profissionalismo.

Aos amigos da arritmia Pedro, Martina, Carina, Tan, Sávia, Muhieddine, Cristiano e Dra. Denise. Um honra conviver com pessoas tão competentes, dedicadas e sempre prontas para ajudar.

Às secretarias Vanda, Roberta, Luciana, à enfermeira Ana Lucia, pelo respeito com nosso trabalho e com os pacientes.

Aos pacientes, protagonistas da história, que retribuem diariamente nosso esforço.

Aos funcionários do InCor, aos residentes de cardiologia e de arritmia.

À equipe de pós-graduação da Cardiologia, Juliana, Valdecira, Neusa e Julia Fukushima pela competência na consultoria.

Ao estatístico Rogério Ruscitto , pela assistência na elaboração da tese e do artigo.

À Fapesp, pelo apoio financeiro para realização dos testes genéticos no projeto REDE Nacional.

À divisão de cardiologia molecular da Fundação Salvatore Maugeri - Pavia. Dr. Andrea Mazzanti e Prof. Silvia Priori a quem agradeço por meu acolhimento. São ícones da cardiologia genética e modelo de ética em pesquisa.

Ao meu pai, que sempre se dedicou à nossa formação pessoal e profissional. Sua autenticidade, ética e franqueza trouxeram segurança e determinação.

À minha mãe, que me mostrou que a vida pessoal e a profissional não concorrem e sim se complementam. Uma inspiração de otimismo, disposição e criatividade.

Às minhas irmãs, que admirei (como caçula, até copieei) em todas as etapas da minha vida e me deram sobrinhos maravilhosos.

Minhas amigas da Med Puccamp 31, meu nivelar para cima: Aninha, Karina, Renata, Laura e Marcela. À minha amiga Elisa, com quem eu embarquei nesse desafio SP-USP.

Aos meus sogros, que me fazem muita falta diariamente pela nobreza de espírito, pelos conselhos e pela descontração!

Agradeço ao meu marido João, que me conquista todos os dias com sua inteligência e leveza. Nada disso seria possível sem apoio familiar.

Aos meus filhos Luisa e Lucas, nosso maior tesouro, que nunca pese a importância do nosso trabalho.

Epígrafe

*Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade*
Raul Seixas

Normatização Adotada

Esta pesquisa está de acordo com as seguintes normas, em vigor, no momento desta apresentação.

Referencias: adaptado de *International Committes of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ªed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2012.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

	Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
	Lista de figuras	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Canalopatias Cardíacas.....	2
1.2	Diagnóstico molecular.....	10
1.3	Importância do diagnóstico molecular.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo primário.....	15
2.2	Objetivos secundários.....	15
3	MÉTODOS.....	16
3.1	Aspectos éticos.....	17
3.2	Casuística.....	17
3.3	Sequenciamento	20
3.3.1	Seleção de probandos para o teste genético.....	20
3.3.2	Sequenciamento de nova geração.....	21
3.3.3	Sequenciamento por Sanger.....	23
3.4	Análises de variantes.....	24
3.5	Cascata de rastreamento familiar.....	25
3.6	Associações Genótipo-Fenótipo.....	27
3.7	Análise estatística.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Dados gerais do registro.....	30
4.2	Avaliação genética de probandos.....	30
4.3	Rastreamento familiar.....	34
4.4	Associação genótipo-fenótipo.....	35
4.5	Dados gerais e desempenho do sequenciamento.....	42
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÕES.....	58
7	ANEXOS.....	60
8	REFERÊNCIAS	67

Listas

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AF	Antecedente familiar
CA	Cardiopatia arritmogênica
CDI	Cardiodesfibrilador implantável
DNS	Doença do nó sinusal.
DSC	Doença do sistema de condução
DHE	Distúrbio hidroeletrolítico
EAPF	Evento arritmico potencialmente fatal
ECG	Eletrocardiograma
et al.	e outros
ex.	Exemplo
f-QRS	Fragmentação do QRS
FV	Fibrilação Ventricular
HV	His-ventrículo
InCor	Instituto do Coração, Hospital das Clínicas HCFMUSP\
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
Mb	Megabases
MCD	Miocardopatia dilatada
ms	Milissegundos
MSC	Morte súbita cardíaca
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
PCRec	Parada cardíaca recuperada
PRVe	Período refratário ventricular efetivo
Pts	Pacientes
QTc	QT corrigido
ReP	Repolarização precoce
SBr	Síndrome de Brugada
SQTL	Síndrome do QT longo
SQTC	Síndrome do QT curto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TdP	<i>Torsade de pointes</i>
TV	Taquicardia ventricular
VUS	<i>Variant of uncertain significance</i> ou variante de significado incerto

Figura 1	Representação dos 19 genes relacionados a SQTL, o canal acometido, o momento do potencial de ação prejudicado.....	4
Figura 2	ECG (com derivações precordais) na SQTL.....	4
Figura 3	Derivações V1 e V2 na SBr.....	6
Figura 4	Derivações superiores: reposicionamento das derivações precordiais na SBr.....	7
Figura 5	Fisiopatologia da SBr.	8
Figura 6	Genes relacionados com a SBr, que também já foram identificados em outras cardiopatias/canalopatias.....	9
Figura 7	Genes considerados causais na SQTL e na SBr, demonstrando os genes em comum na intersecção ⁷⁰	25
Figura 8	Cascata de rastreamento clínico e genético	26
Figura 9	CONSORT 2010 Fluxograma da população submetida à avaliação genética.....	31
Figura 10	Variantes encontradas nos pacientes com SQTL.....	32
Figura 11	Variantes encontradas em pacientes com SBr	33
Figura 12	Distribuição das variantes patogênicas e possivelmente patogênicas na SQTL em probandos e familiares.....	34
Figura 13	Fatores deflagradores de EAPF, conforme os subtipos de SQTL.....	38
Figura 14	Uso de CDI em pacientes com SQTL.....	38

Tabela 1	Escore de probabilidade diagnóstica de Schwartz ²²	61
Tabela 2	Critérios diagnósticos*. ²⁴	18
Tabela 3A	Critérios para classificação de variantes. ⁵⁰	62
Tabela 3B	Classificação das variantes ⁶⁸	63
Tabela 4	Dados dos pacientes do registro.....	30
Tabela 5	Detalhamento das variantes em portadores de SQTl.....	64
Tabela 6	Detalhamento das variantes em portadores de SBr.....	66
Tabela 7	Associação genótipo-fenótipo em pacientes com SQTl.....	36
Tabela 8	Associação genótipo-fenótipo em pacientes com SBr.....	40
Tabela 9	Dados comparativos entre os registros internacionais e o InCor...	49

Resumo

Fernandes LS. *Estudo de análise genotípica e sua associação com características fenotípicas em portadores de síndrome do QT longo e síndrome de Brugada* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introdução: Os benefícios dos testes genéticos em arritmias cardíacas evoluíram juntamente com os desafios na sua interpretação. Há pouca contribuição nacional na literatura mundial. O objetivo primário desse estudo foi descrever o perfil mutacional de pacientes com síndrome do QT longo (SQTL) e síndrome de Brugada (SBr) em uma instituição de referência em arritmias cardíacas. **Métodos:** Trata-se de um estudo longitudinal, observacional, unicêntrico, que incluiu 277 pacientes, sendo 158 com SQTL e 119 pacientes com SBr. Foram avaliadas as principais características clínicas e realizado o teste molecular em painel multigênico. A classificação das variantes nos genes causais foi baseada nos critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*. **Resultados:** A idade média dos pacientes foi de 32,5 anos, sendo 139/277 (50,2%) do sexo feminino. Foram submetidos à análise molecular 76/84 (90,5%) probandos com SQTL e 63/93 (66,7%) probandos com SBr. Nos probandos com SQTL foram encontradas variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas em 67%, enquanto que na SBr foi em 20,6% ($p < 0,001$). Na associação genótipo-fenótipo, foi observado gatilho predominante de estresse em pacientes com SQTL1 e repouso em SQTL3. O QTc não variou entre os subtipos 1 a 3 e a taxa de eventos arrítmicos foi semelhante no seguimento (19%). Nos pacientes com SBr o valor médio do intervalo His-Ventrículo (HV) foi maior nos pacientes com variantes genéticas identificadas no *SCN5A* (68 x 48ms; $p < 0,001$). **Conclusão:** Foi possível a identificação do perfil genético em 46% dos pacientes com SQTL e SBr em um serviço terciário de atendimento. Há diferenças clínicas conforme o genótipo, mas sem relevância prognóstica em nosso registro. A associação genótipo-fenótipo permanece em investigação nas arritmias hereditárias. A utilização dos critérios do *ACMG* permitiu a análise das variantes nos genes principais.

Descritores: Canalopatias, Arritmias Cardíacas, Síndrome de Brugada, Síndrome do QT Longo, Morte Súbita e Testes Genéticos.

Abstract

Fernandes LS. *A genotype-phenotype association study in a cohort of patients with Long QT and Brugada syndrome*. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: The potential benefits of genetic testing in cardiac channelopathies have developed along with the challenges in results interpretation. There is little national contribution in world literature. The primary objective of this study was to describe the mutational profile of patients with long QT syndrome (LQTS) and Brugada syndrome (BrS) at a reference Institution in cardiac arrhythmias. **Methods:** Longitudinal, observational, single-center study that included 277 patients, 158 with LQTS and 119 patients with BrS. The baseline clinical characteristics were evaluated and the genetic testing was performed in a multigenic panel. The classification of the variants in target genes was based on the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). **Results:** The mean age at diagnosis was 32.5 years, 139/277 (50.2%) were female. A total of 76/84 (90.5%) probands with SQT and 63/93 (66.7%) probands with SBr were submitted to genetic testing. In LQTS patients, pathogenic or possibly pathogenic variants were found in 67% of the probands and in 20.6% of BrS patients ($p < 0.001$). A predominant stress trigger was observed in patients with LQTS1 and events at rest in LQTS3. QTc did not vary among subtypes 1 to 3 and the rate of arrhythmic events was similar at follow-up (19%). In patients with BrS the mean value of the His-Ventricle (HV) interval was higher in SCN5A+ patients (68 x 48ms, $p < 0.001$). **Conclusion:** It was possible to identify the genetic profile in 46% of patients with LQTS and BrS in a tertiary service. There were clinical differences according to genotype, without prognostic relevance in our registry. The genotype-phenotype association remains under investigation in hereditary arrhythmias. ACMG criteria allowed variants analysis in target genes.

Keywords: Channelopathies, Cardiac Arrhythmias, Brugada Syndrome, Long QT Syndrome, Sudden Death and Genetic Testing.

1 Introdução

1.1 Canalopatias Cardíacas

As arritmias geneticamente determinadas representam um desafio diagnóstico e terapêutico na cardiologia atual e, quase sempre, estão relacionadas a defeitos nos canais iônicos (canalopatias). Um desequilíbrio nessas correntes iônicas, gerado a partir de defeitos genéticos, intervenções farmacológicas ou anormalidades cardíacas estruturais, pode resultar em vários fenótipos arritmogênicos¹. Cerca de 40% das necropsias em jovens, vítimas de morte súbita cardíaca (MSC), são inconclusivas e as canalopatias são elencadas como uma das principais suspeitas etiológicas².

A síndrome do QT longo congênito (SQTL) e a síndrome de Brugada (SBr) são as canalopatias cardíacas herdadas mais prevalentes, respectivamente 1 a cada 2.000 pessoas e de 1 a 5 a cada 10.000^{3, 4}. Assim, a estimativa seria de que 200.000 brasileiros fossem portadores dessas doenças⁵.

A forma mais comum de herança é a autossômica dominante em genes que codificam canais iônicos cardíacos ou suas subunidades acessórias. Quanto ao fenótipo clínico resultante, a penetrância é incompleta e a expressividade variável dentro de uma mesma família⁶. Os fatores determinantes para esse fenômeno são ainda especulativos⁷. Os avanços no diagnóstico molecular forneceram ferramentas importantes para elucidar o substrato genético do padrão de herança mendeliana. Os fundamentos genéticos das canalopatias hereditárias e potencialmente letais têm sido identificados e melhor compreendidos, porém a heterogeneidade clínica e molecular, característicos dessas doenças, limitam o domínio do conhecimento.

Os testes genéticos se expandiram das pesquisas clínicas para a medicina assistencial, mas com acessibilidade nem sempre disponível em larga escala. O manejo dos pacientes com doença arritmogênica primária varia entre os grandes centros de estudo no mundo. No acompanhamento clínico de indivíduos com SQTL ou SBr, o exame Holter de 24 horas foi realizado na maioria dos centros (68-86%), seguido dos testes genéticos (50-82%), especialmente na SQTL. Na triagem familiar, o principal teste foi o

eletrocardiograma (ECG) de 12 derivações (82-98%), porém com o uso relativamente frequente de testes genéticos (41-59%)⁸.

Síndrome do QT Longo Congênito

A SQTL foi primeiramente descrita por Meissner em 1856, que relatou o óbito de uma menina surda que foi repreendida na escola⁹. A descrição definitiva da SQTL ocorreu em 1957, por Anton Jervell e Fred Lange-Nielsen,¹⁰ que observaram uma família norueguesa com crianças que apresentavam síncope recorrente durante o exercício ou a emoção. Nessa família, quatro das 10 crianças eram surdas, correspondendo hoje ao que conhecemos como Síndrome de Jervell-Lange-Nielsen.

Em seguida, Romano et al demonstraram que a mesma doença poderia acontecer em crianças sem o defeito auditivo¹¹. A base genética da SQTL foi descoberta em 1991 com a descrição de um *locus* suscetível no cromossomo 11, em um gene codificador do canal de potássio, que resultou na concepção do termo canalopatias cardíacas¹².

A repolarização cardíaca depende da atividade das correntes repolarizantes I_{Ks} e I_{Kr} , além do influxo persistente de sódio que se estende ao período de platô. A perda de função dos canais I_{Ks} e I_{Kr} ou o ganho de função da I_{Na} predis põem à ocorrência de pós potenciais precoces, que podem resultar em risco de *torsades de pointes* (TdP) e à FV. Esses canais principais interagem com uma variedade de proteínas intracelulares que contribuem com o fluxo iônico, a estabilização, sinalização e, conseqüentemente, eficiência do canal (figura 1)¹³.

Até o momento foram descritos 19 subtipos de SQTL, cada qual relacionado com defeitos de diferentes canais iônicos ou proteínas auxiliares¹⁴. Cerca de aproximadamente 90% dos casos com genótipo identificado pertencem aos subtipos 1 a 3 e 5¹⁴.

O substrato molecular pode se correlacionar com o aspecto morfológico do intervalo QT (figura 2), bem como sugerir gatilhos de eventos arrítmicos, resposta ao tratamento farmacológico e, eventualmente, predição de morte súbita¹⁵.

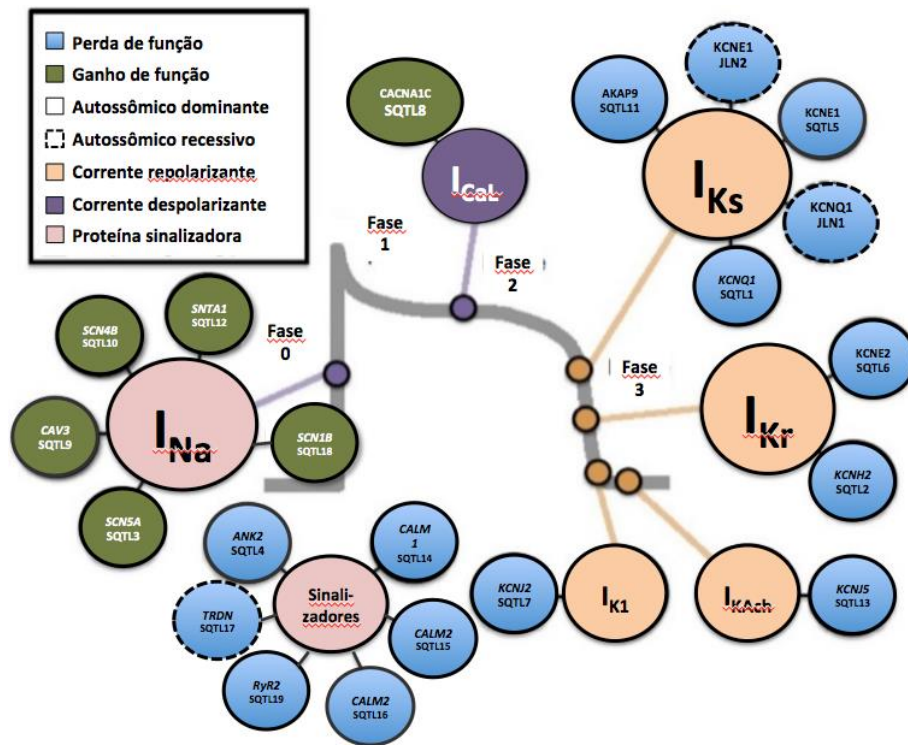


Figura 1: Representação dos 19 genes relacionados a SQT1, o canal acometido, o momento do potencial de ação prejudicado. Adaptado de Giudicessi JR¹⁶.

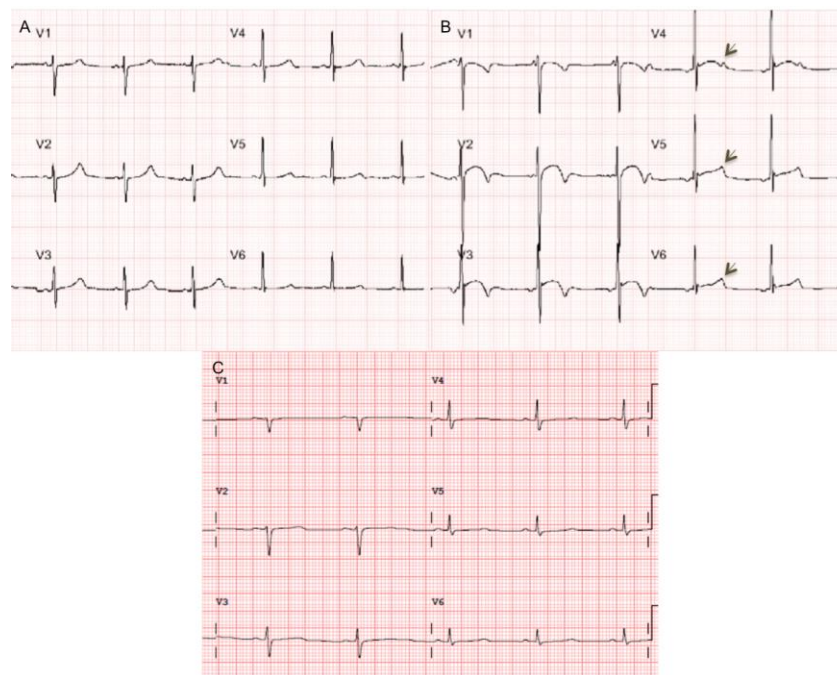


Figura 2: ECG (com derivações precordiais) na SQT1. A) SQT1: a onda T tem a base alargada e se assemelha ao ECG normal; B) SQT2: a onda T é bífida, principalmente de V1 a V3 e possui o padrão *notch* (seta); C) SQT3: o segmento ST é retificado.

A SQTl pode apresentar um padrão autossômico dominante ou recessivo, com penetrância incompleta e expressividade variável (de 25 a 100%). A rara e maligna entidade, conhecida como Síndrome de Jervell e Lange-Nielsen é o protótipo do acometimento recessivo, que é caracterizado por alto risco de morte súbita cardíaca e surdez neurosensorial¹⁰.

O padrão de herança autossômico dominante é o mais comum. A identificação molecular em pacientes com fenótipo clínico definitivo em um dos três genes de suscetibilidade para SQTl se distribuem, respectivamente, em torno de 35% para *KCNQ1*, 25% para *KCNH2* e 10% para *SCN5A*^{17, 18}. Um adicional de 5-10% dos casos de SQTl são atribuídos aos chamados “*minor genes*”, relacionados com síndromes multissistêmicas distintas, como Andersen-Tawil (SQTl7), Timothy (SQTl8), e a Síndrome *Kcnockout* (SQTl17), envolvidas com variantes respectivamente nos genes *KCNJ2*, em heterozigose, *CACNA1C* e *TRDN*, ambos em homozigose¹⁹⁻²¹. Aproximadamente 5% dos pacientes apresentam mutações compostas ou dupla mutação, que tendem a resultar em um fenótipo mais grave⁷.

Atualmente, a ferramenta diagnóstica mais utilizada é o escore de probabilidade de Schwartz, pontuação baseada em dados clínicos: eletrocardiograma, sintomas e história familiar (Anexos, tabela 1)²². Um escore de Schwartz maior ou igual a 4 pontos tem especificidade maior que 99% para o diagnóstico da SQTl e sensibilidade de apenas 19%²³. Conforme a diretriz europeia de arritmias cardíacas, o QT corrigido (QTc) maior que 480ms, em eletrocardiogramas seriados, sem causa secundária (drogas, distúrbios eletrolíticos ou cardiopatia) ou ainda a presença de mutação genética bem definida, também definem os pacientes como portadores de SQTl²⁴.

O tratamento da SQTl envolve adoção de medidas comportamentais, com a finalidade de prevenir o evento arritmico, como evitar atividades físicas extenuantes, correção de distúrbios eletrolíticos e uso de medicações que bloqueiem os canais disfuncionantes. Em geral, o bloqueio adrenérgico está indicado com fármacos específicos, como nadolol e propranolol ou ainda com a simpatectomia esquerda. Os paciente considerados de maior risco podem necessitar do implante do cardiodesfibrilador (CDI)²⁴.

Síndrome de Brugada

O supradesnivelamento do segmento ST associado à fibrilação ventricular foi primeiramente descrito por Martini.²⁵ Em 1992, Pedro e Ramon Brugada relataram uma coorte de pacientes e a nova entidade foi reconhecida como Síndrome de Brugada²⁶.

O diagnóstico da SBr é definido pela presença do padrão eletrocardiográfico tipo 1, caracterizado por elevação do segmento ST nas derivações V1-V3, seguido de onda T invertida (ST em rampa descendente)²⁴. Os padrões tipo 2 ou 3, agrupados no último consenso em tipo 2 (ou não tipo 1), apresentam morfologia em sela, com onda T positiva de 2 ou 1mm (figura 3)²⁷.

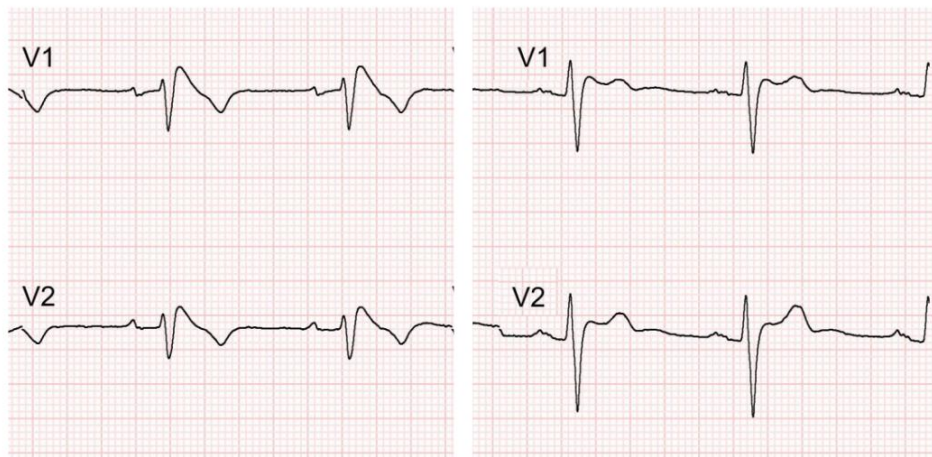


Figura 3: Derivações V1 e V2 na SBr. A) Padrão eletrocardiográfico de SBr 1; B) Padrão eletrocardiográfico de SBr 2 ou não 1.

O supradesnivelamento espontâneo geralmente é dinâmico, o que pode representar um desafio na detecção da doença. Para sensibilização do diagnóstico, as derivações precordiais podem ser estrategicamente posicionadas nas regiões paraesternais direita e esquerda, no segundo, terceiro e quarto espaço intercostal, com a finalidade de otimizar o mapeamento da via de saída do ventrículo direito e, por consequência, aumentar a probabilidade do achado eletrocardiográfico típico da SBr (figura 4)²⁸. A febre, os testes provocativos com bloqueadores dos canais de sódio (ajmalina, pilsicainida, flecainida, procainamida) e, eventualmente, o teste

ergométrico, podem exacerbar o supradesnivelamento específico do segmento ST, configurando o padrão tipo 1^{29, 30}.

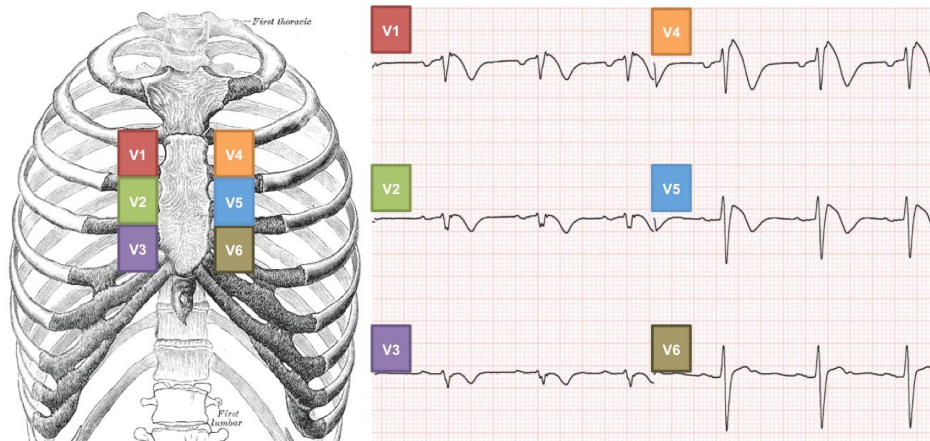


Figura 4: Derivações superiores: reposicionamento das derivações precordiais na SBr. Nas derivações superiores o ECG é característico da SBr1.

A monitorização eletrocardiográfica de 24 horas (Holter) de 12 derivações pode documentar a alteração dinâmica do segmento ST, já que o estímulo vagal (Ex.: sono, período pós prandial) também pode desmascarar o padrão eletrocardiográfico da SBr ou ainda ser um deflagrador de arritmias.³¹ Quando o padrão tipo 1 é apenas demonstrado com teste provocativo farmacológico, a SBr é considerada como sendo tipo 1 induzida²⁴.

A controvérsia na fisiopatologia da SBr permanece atual, entre a teoria da repolarização, que envolveria a natureza mais iônica e a teoria da despolarização, com perfil mais anatômico, ou ainda, a soma dos dois mecanismos (figura 5)^{32, 33}. O substrato epicárdico, descoberto em necropsia de pacientes com SBr,³⁴ vem sendo explorado pelo mapeamento eletroanatômico e, a ablação por cateter desse substrato, pode se configurar como um tratamento promissor. Há dados surpreendentes da melhora eletrocardiográfica, entretanto esses achados carecem de seguimento em longo prazo³⁵.

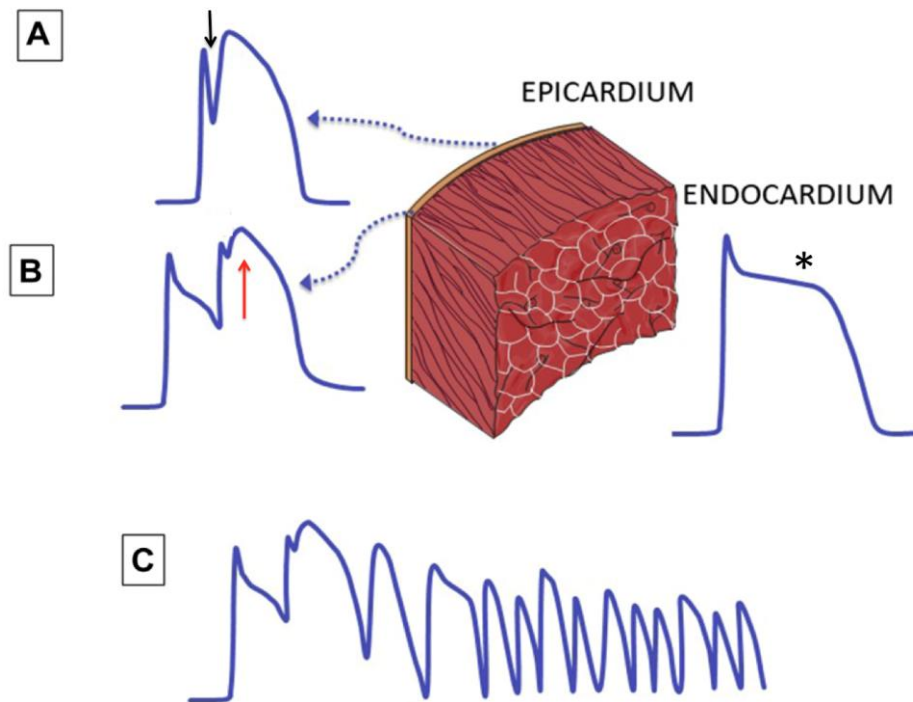


Figura 5: Fisiopatologia da SBr. A) Diferença entre o potencial de ação endocárdico (*) e o epicárdio, com perda do domos (seta preta), B) Quando o domos é patologicamente aumentado (seta vermelha), pode originar (C) arritmias sustentadas. Adaptado de Priori SG. Card Electrophysiol Clin. 2018³³.

O sequenciamento do gene *SCN5A* detectou variantes genéticas em pacientes com SBr, pela primeira vez, em 1998³⁶. Desde então, outras variantes genéticas foram paulatinamente sendo incorporadas na patogênese da doença, seja por reduzirem a função dos canais de sódio e de cálcio ou por aumentarem a função dos canais Ito³⁷.

A SBr é uma doença autossômica dominante, com penetrância incompleta e expressividade variável. As mutações no gene *SCN5A*, que codifica a subunidade alfa no canal de sódio cardíaco ($Na_v1.5$), têm sido identificadas em apenas 11 a 35% dos pacientes³⁸. Até o momento, foram identificadas mais de 300 mutações no gene *SCN5A*, que cursam com alteração da fase 0 e 1 do potencial de ação cardíaco³⁹.

Outros genes, com menor participação, têm sido envolvidos na regulação do canal de sódio despolarizante, como *SCN1B*, *SCN2B* e *SCN3B*, codificadores da subunidade beta do canal de sódio $Na_v1.5$. Os canais de sódio neuronais $Na_v1.8$, codificados pelo *SCN10A*, podem modular a expressão

genética do *SCN5a*, sendo o terceiro gene mais frequentemente pesquisado. Variantes patogênicas em *GPD1L* e *RANGRF* também podem resultar no impedimento do influxo rápido de sódio, sendo a primeira pela capacidade de reduzir a expressão da membrana celular.

Além do comprometimento dos canais de sódio na gênese da SBr, também são descritas alterações nos canais de potássio (genes *KCNE3*, *KCNJ8*, *KCND3* e *KCNE3*) e cálcio voltagem dependentes (genes *CACNA1C*, *CACNB2B* e *CACNA2D1*). O gene *CACNA1C* é o segundo mais envolvido na patogênese da doença.

Apesar do progresso no diagnóstico molecular, mais de 70% das famílias com SBr permanecem sem uma variante genética identificada. À luz do conhecimento atual, cerca de 25 genes já foram relacionados com a SBr, porém grande parte das variantes descritas tem significado incerto e estão envolvidas com outras doenças arritmogênicas (figura 6).

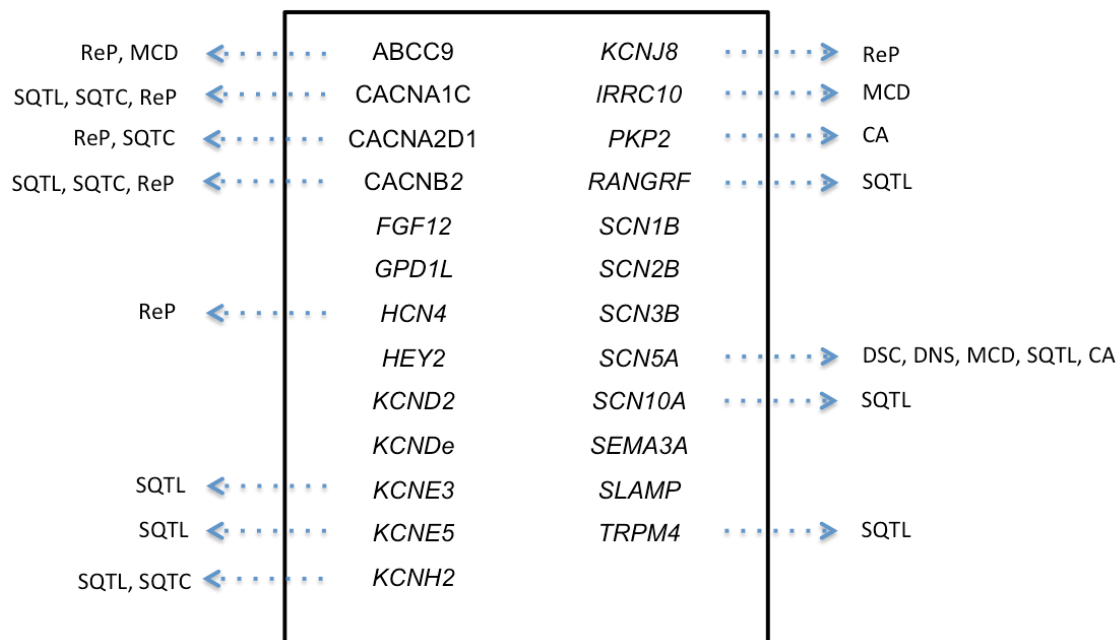


Figura 6: Genes relacionados com a SBr, que também já foram identificados em outras cardiopatias/canalopatias. ReP: repolarização precoce; MCP: miocardiopatia dilatada; SQTL e SQTC: síndromes do QT longo e curto; DSC: doença do sistema de condução; DNS: doença do nó sinusal; CA: cardiopatia arritmogênica. Adaptado de Brugada, et al. J Am Coll Cardiol 2018;72 (9)⁴⁰.

O tratamento da SBr também contempla mudanças comportamentais que, nesse caso, envolvem evitar refeições copiosas, libação alcoólica e uso de medicações que agravem o defeito iônico. Os pacientes sintomáticos são considerados de maior risco e podem necessitar do implante do CDI. Nos pacientes assintomáticos, a decisão sobre o implante de CDI é mais controversa. A definição de alto risco nesse grupo de pacientes depende da avaliação de sinais eletrocardiográficos e, principalmente, de dados obtidos pelo estudo eletrofisiológico (EEF)²⁴.

1.2 Diagnóstico molecular

O genoma humano é constituído por cerca de 3 bilhões de pares de nucleotídeos e contém cerca de 20.000 genes conhecidos. Cada gene é constituído por sequências codificadoras de proteína (*exons*), que compreendem cerca de 1% do genoma humano, e não codificadoras (regiões reguladoras, intrônicas e intergênicas). Apesar do reconhecimento crescente de que porções não codificantes do genoma têm propriedades regulatórias importantes e podem participar na patogênese da doença, os testes genéticos clínicos para canalopatias permanecem direcionados e focam as regiões codificantes das proteínas^{41, 42}.

Desde a introdução dos testes genéticos na prática clínica em doenças cardiovasculares hereditárias, o número e o tamanho dos genes investigados aumentaram progressivamente. Até há 15 anos, a detecção de mutações era realizada por técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*) seguido de cromatografia líquida desnaturante (DHPLC, do inglês: *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*)⁴³. Entretanto, sua sensibilidade para detecção de variantes era baixa e altamente dependente da otimização adequada da técnica⁴⁴.

Com o avanço da tecnologia, o sequenciamento direto do DNA tornou-se o método padrão-ouro para a detecção de variantes genéticas. Esse, por sua vez, é o processo de determinar a ordem precisa de nucleotídeos dentro

do fragmento de ácido nucléico⁴⁵. Nos últimos 30 anos, a tecnologia de sequenciamento clássico de DNA, conhecido como método de Sanger, foi a abordagem de escolha em doenças mendelianas. As sequências de DNA são de alta qualidade para trechos relativamente longos (por volta de 900 pares de bases)⁴². É especificamente usado para sequenciar partes do DNA, entretanto, é caro e ineficiente para sequenciamentos em larga escala, como o sequenciamento multigênico ou de genoma completo⁴⁶.

O sequenciamento paralelo massivo, ou sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês, *next generation sequencing*) é atualmente o método de escolha, quando se deseja a avaliação de um painel de vários genes, do exoma ou até do genoma. Nessa tecnologia, o DNA é clivado para gerar fragmentos curtos que são distribuídos em um chip composto por uma superfície de vidro, duplicado várias vezes até criar fragmentos de DNA com a mesma sequência. Esses fragmentos aparecem como pontos em uma tela de imagem. São adicionados reagentes que coram os nucleotídeos e depois são lavados, sendo cada ponto fotografado entre cada ciclo. A cor de um ponto após um ciclo corresponde a um nucleotídeo específico ligado às cadeias de DNA imobilizadas daquele local. Desta forma, a sequência de nucleotídeos é gerada para cada ponto. Cada sequenciamento incluirá milhares de pontos, cada um gerando 50 a 100 sequências-base. A tradução desse enorme conjunto de dados em sequências de nucleotídeos para regiões específicas do genoma utiliza ferramentas computacionais, permitindo a leitura maciça do genótipo humano⁴⁷.

O NGS permite a detecção de variantes que devem ser filtradas e selecionadas para interpretação clínica. O principal desafio é identificar quais são causais entre 4 milhões de variantes em cada genoma, incluindo mais de 12.000 variantes não sinônimas e talvez mil variantes supostamente funcionais e patogênicas⁴⁸. A grande maioria das variantes do genoma são polimorfismos, sem efeito concreto sobre um fenótipo, e são detectadas em alta frequência na população geral⁴⁹.

A classificação das variantes seguem um protocolo que inclui o uso de filtros de frequência populacional, pesquisas de banco de dados e sites de predição do efeito funcional⁴¹. Em 2015, foi publicada a recomendação do

Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (*American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG*), que guia a classificação das variantes genéticas⁵⁰. A interpretação das variantes deve ser cuidadosa, multidisciplinar e periodicamente revisada, o que representa um grande desafio para os profissionais envolvidos em laudos de testes genéticos⁵¹.

1.3 Importância do diagnóstico molecular

O papel do diagnóstico molecular das arritmias geneticamente determinadas (SQTL e SBr) tem sido destacado no consenso conjunto americano e europeu de testes genéticos desde 2011. Os benefícios potenciais nesta abordagem são: confirmação diagnóstica, terapia genótipo-guiada, identificação dos indivíduos não carreadores e dos carreadores silenciosos que, por sua vez, podem adotar medidas para prevenção de morte súbita, bem como o aconselhamento genético^{45,52}.

No que se refere em especial à SQTL, o diagnóstico molecular pode permitir o tratamento genótipo-guiado, principalmente nos subtipos 1 e 2, que são mais prevalentes e, portanto, mais estudados. Este inclui desde as recomendações comportamentais, até as decisões farmacológicas, podendo também fornecer informações prognósticas⁵³. Os indivíduos carreadores silenciosos, ou seja, com intervalo QTc normal, não estão isentos de risco de arritmias graves e compõem até 25% da população em risco⁵⁴.

O perfil mutacional é também dependente das características raciais e da interação dos genes, que podem caracterizar o fenótipo, juntamente com os fatores ambientais. A maioria das publicações com estudos genéticos em canalopatias envolveu populações caucasianas ou asiáticas. As informações disponíveis na literatura carecem de contribuição nacional, especialmente em nosso país, historicamente com alto grau de miscigenação.

Até o momento tem havido uma lenta incorporação dos testes genéticos para a prática clínica no Brasil, uma vez que há escassez de recursos para sua realização em laboratórios de pesquisa ou na rede pública.

Deste modo, a população brasileira e o seu perfil heterogêneo não têm sido contemplados nos estudos clínicos.

A formação de um centro especializado em arritmias hereditárias pode otimizar o diagnóstico clínico, a interpretação dos testes genéticos e o aconselhamento familiar⁵⁵. Este tipo de abordagem direcionada e qualificada tem se mostrado útil na redução da taxa de eventos ameaçadores da vida e, de modo interessante, na redução de indicações de CDI, o que pode melhorar a custo-efetividade do atendimento⁵⁶.

Não existem, em nosso meio, informações sobre análise genotípica e sua associação com características fenotípicas em pacientes com síndrome do QT Longo Congênito e síndrome de Brugada. Esses dados são de fundamental importância para verificar a reprodutibilidade dos estudos internacionais na população brasileira. Além disso, a contribuição com dados de correlação genótipo-fenótipo para a literatura mundial é especialmente importante no contexto de doenças raras, como as canalopatias cardíacas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Analisar o perfil mutacional dos pacientes com SQTL e SBr em uma Instituição de Referência em Arritmias Genéticas no Brasil.

2.2 Objetivos secundários

1. Avaliar aspectos da associação genótipo-fenótipo em pacientes e familiares;
2. Explorar a interpretação das variantes genéticas relacionadas à Síndrome do QT Longo e à Síndrome de Brugada.

3 Métodos

Trata se de um estudo de coorte longitudinal, observacional, unicêntrico em pacientes portadores de SQTL e SBr.

3.1 Aspectos éticos

Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do InCor/HCFMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP (SDC 4042/14/022). (Apêndice A)

O procedimento proposto foi delineado de acordo com as recomendações e as diretrizes das principais sociedades específicas da área nacional e internacional. Todos os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no qual concordaram com a realização do painel genético ou do teste genético direcionado. (Apêndice B)

3.2 Casuística

Um total de 277 pacientes, probandos e familiares, foram incluídos em um registro de Canalopatias Cardíacas, provenientes do ambulatório de Arritmias Cardíacas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (InCor-HCFMUSP). O período de inclusão foi iniciado em 1993 nos pacientes com SQTL e em 1999 nos pacientes com SBr. Foram considerados como critérios de inclusão no registro os pacientes com:

- Diagnóstico clínico de SQTL e SBr, conforme critérios da Diretriz Européia em Arritmias Ventriculares e Prevenção de Morte Súbita (tabela 2)²⁴.

- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Tabela 2: Critérios diagnósticos*²⁴

Síndrome do QT longo Congênito	Síndrome de Brugada
<ul style="list-style-type: none"> - Presença de intervalo QTc \geq 480ms em ECG seriados; - Escore de Schwartz \geq 3,5; - Portadores de variantes patogênica para SQTL, independente do intervalo QTc. 	<ul style="list-style-type: none"> - Padrão eletrocardiográfico de SBr tipo 1, em uma ou mais derivações precordiais direitas, no 2^o, 3^o ou 4^o espaços intercostais, espontâneo ou induzido por bloqueadores dos canais de sódio (ajmalina, flecainida, procainamida ou pilsicainide).

* Na ausência de causas secundárias.

Dados Gerais

As características basais foram obtidas nas visitas médicas periódicas, realizadas a cada 6 meses a 1 ano. A avaliação dos pacientes incluiu: anamnese, história familiar, exames laboratoriais, eletrocardiograma padrão de 12 derivações, Holter de 24 horas e ecocardiograma transtorácico.

As variáveis demográficas consideradas foram: idade, sexo e etnia. As variáveis clínicas de interesse foram a manifestação clínica inicial (síncope de origem arritmica, respiração agônica noturna ou PCRec) e eventos arritmicos potencialmente fatais (EAPF) no seguimento, tais como taquicardia ou fibrilação ventricular (TV/FV) sustentadas, terapias apropriadas do CDI e MSC. A síncope de origem arritmica presumida foi definida como uma perda abrupta de consciência ocorrendo sem pródromos específicos, ou uma perda de consciência durante o sono.

O heredograma dos pacientes foi obtido na primeira consulta e atualizado periodicamente, contemplando pelo menos três gerações, com o uso de ferramenta *online* (<https://app.pedigreedraw.com>). Nos familiares indagamos o histórico de síncope e a ocorrência de MSC precoce, definida como aquela que ocorresse na ausência de cardiopatia, quando antes dos 45 anos de idade.

Conforme a apresentação da doença e por decisão clínica, foram também realizados cineangiocoronagrafia ou angiotomografia de coronárias e ressonância cardíaca. O tempo de seguimento foi definido a partir do diagnóstico até a última avaliação, contato telefônico ou óbito.

A indicação de cardiodesfibrilador implantável (CDI) foi baseada em protocolos institucionais, de acordo com as diretrizes internacionais, em pacientes com síncope presumivelmente arritmica ou PCRec. Nos pacientes com SBr, houve também a indicação do CDI nos casos em que houvesse TV/FV induzidas pelo EEF²⁴.

Síndrome do QT longo Congênito

Os dados eletrocardiográficos para o registro da SQTL, obtidos no eletrocardiograma de 12 derivações foram: a frequência cardíaca (FC), o intervalo QTc basal, sem interferência de medicações ou distúrbios eletrolíticos (medido pela fórmula de Bazett, nas derivação DII ou V5) e a presença de entalhe na onda T em pelo menos 3 derivações contíguas. O escore de Schwartz foi calculado (ANEXOS, tabela 1) a partir dos dados clínicos e eletrocardiográficos obtidos na apresentação. Todas as medidas eletrocardiográficas foram feitas por pelo menos 2 observadores (LS e FD) e, eventuais divergências, eram decididas por consenso.

Síndrome de Brugada

Nos pacientes com SBr foi também realizado o eletrocardiograma com as derivações precordiais superiores. Os dados de interesse coletados no ECG foram: intervalos PR e QRS, f-QRS, padrão de repolarização precoce em derivações periféricas, sinal de aVR e onda S em D1. O intervalo PR e os complexos QRS foram medidos na derivação DII, sendo que o complexo QRS foi também medido em V2⁵⁷. A f-QRS foi definida como o achado de dois ou mais entalhes no complexo QRS, nas derivações V1 a V3⁵⁸. O sinal de aVR

positivo foi definido por uma onda R \geq 3mm ou a relação R/q \geq 0,75.⁵⁹ Uma onda S profunda em DI foi considerada se a voltagem fosse \geq 0,1mV e/ou se a duração fosse \geq 40ms⁵¹.

Conforme indicação clínica, ou seja, nos casos em que houvesse suspeita de SBr, sem ECG tipo 1, os pacientes eram submetidos ao teste de ajmalina. O protocolo de infusão foi de 10mg de ajmalina endovenosa a cada dois minutos até 1mg/kg. O teste foi considerado positivo se o padrão de Brugada tipo 1 fosse demonstrado nas derivações precordiais direitas em posição padrão ou derivações superiores⁶⁰.

O estudo eletrofisiológico (EEF) foi realizado em 75 dos 119 pacientes (63%). As medidas basais dos intervalos de condução e estimulação ventricular programada foram registradas. A estimulação ventricular programada (EVP) foi realizada em dois locais (ápice do ventrículo direito e via de saída do ventrículo direito, a menos que o paciente tivesse taquicardia ventricular induzida no primeiro local), com energia do dobro do limiar diastólico, utilizando dois ciclos de acionamento (S1: 600 e 430 ms) até 3 estímulos extras (S2 a S4), adotando 200ms como o menor intervalo de acoplamento. O EEF era considerado positivo quando fosse induzida TV/FV sustentada⁶¹. O período refratário ventricular efetivo (PRVe) foi definido como o intervalo S1-S2 mais longo que falhasse na obtenção da captação ventricular. Se houvesse condução abaixo de 200ms, o PRVe era definido como “menor que 200ms”⁶².

3.3 Sequenciamento

3.3.1 Seleção de probandos para o teste genético

Entre outubro de 2015 a março de 2019 foram genotipados probandos com SQTL e com SBr, tanto os já diagnosticados nesse período, como os já pertencentes ao registro InCor. Os probandos foram avaliados pelo sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS).

3.3.2 Sequenciamento de nova geração

Foram coletados 8mL de sangue periférico em tubo de EDTA, de cada indivíduo. A extração de DNA foi realizada utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), segundo o protocolo do fabricante. Para o sequenciamento de nova geração foram utilizadas duas técnicas distintas de preparação de biblioteca e de sequenciamento. Independente da técnica utilizada, foram criados painéis de genes customizados contendo genes relacionados com arritmias hereditárias.

Para o sequenciamento utilizando a plataforma Ion Torrent PGM™, desenvolvida pela Life Technologies, foi utilizado o kit de preparo de biblioteca Haloplex Target Enrichment System (Agilent Technologies), sendo parte das corridas realizadas com o kit de sequenciamento Ion PGM 200 Sequencing Kit v2 e, devido à otimização dos kits pelo fabricante, parte das corridas foram realizadas com o kit PGM Hi-Q Sequencing Kit. Cada corrida consistia no sequenciamento de três amostras de DNA com a utilização do chip Ion 318, com um desempenho esperado de 1 Gigabase (Gb) de resultado.

Para o sequenciamento na plataforma Miseq (Illumina), as bibliotecas foram construídas utilizando o kit Nextera® Rapid Capture Custom Enrichment Kit (Illumina) e o sequenciamento realizado com MiSeq Reagent Kit v2 (300 ciclos). Em cada corrida foram sequenciadas de vinte amostras de DNA, esperando-se um output máximo de até 4.5-5.1 Gb. A cobertura esperada para os fragmentos capturados foi de 200x.

Desenho do Painel Genético

Os painéis de genes utilizados no sequenciamento de nova geração foram customizados pelo nosso grupo, sendo os genes escolhidos aqueles

com maior probabilidade de estarem relacionados com arritmias hereditárias. (Apêndice C).

Os desenhos das sondas foram feitos a partir das ferramentas *online* disponibilizadas pelos fabricantes dos kits de preparo de biblioteca. Para o preparo do kit Haloplex foi utilizada a ferramenta SureDesign (Agilent Technologies, <https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>) e para o Nexera a ferramenta Design Studio (Illumina, <https://designstudio.illumina.com/>), na qual foram indicados os genes de interesse, pelas siglas do banco RefSeq⁶³ e a versão do genoma humano referência (hg19). Apenas as regiões codificantes foram indicadas como alvo, mantendo 10pb de regiões intrônicas nas extremidades 3' e 5' de cada exon.

O desenho final consistiu de 3.342 regiões alvo para o painel Haloplex e 3.384 regiões alvo para o painel Nexera, abrangendo 677.444pb e 960.659pb, respectivamente. Para o painel Haloplex, a cobertura total predita das regiões alvo foi de 99,57%. Já para o painel Nexera, a cobertura total das regiões alvo foi de 99%.

Análise de dados de NGS

Os dados brutos gerados pelo equipamento de NGS (arquivos FASTQ) foram importados no software CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN), e processados dentro de um *pipeline* de análises padronizado pelo nosso laboratório.

Os arquivos FASTQ foram submetidos a um processo de controle de qualidade (*trimming*), com remoção das sequências de baixa qualidade. As sequências de boa qualidade foram alinhadas com o genoma humano (hg19/GRCh37). Um arquivo de alinhamento (BAM) e um relatório de cobertura das regiões-alvo foram gerados após essa etapa.

Após o alinhamento, foi realizada a chamada de variantes, a qual consistia na detecção de alterações em heterozigose e homozigose presentes nas amostras sequenciadas. Os critérios mínimos para a chamada de variantes foram: cobertura da região-alvo de pelo menos 10x; qualidade

mínima da região-alvo \geq Q30; presença bidirecional da variante, com concordância de pelo menos 5% entre sequências *forward* e *reverse*.

Todas as variantes detectadas nesse processo foram anotadas de acordo com a sua localização no gene (se estavam localizadas no exon ou intron) e impacto funcional (se apresentavam potencial alteração na proteína). As variantes também foram anotadas de acordo com o banco de dados dbSNP138, para verificação inicial de alterações já descritas⁴⁹.

Todas as informações geradas nesse processo foram então exportadas do software em uma planilha XLS, para que pudessem ser feitas as análises manuais de cada uma das variantes encontradas.

3.3.3 Sequenciamento por Sanger

Foi realizado sequenciamento automático de DNA por terminação de cadeia, seguido de eletroforese capilar (sequenciamento por Sanger) quando se julgou necessário comprovar as variantes encontradas, por meio do método NGS (inserções e deleções ou regiões de genes causais com baixa cobertura) e no rastreamento familiar direcionado, descrito nessa seção.

Após a extração do DNA, a reação de PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos customizados desenhados utilizando a ferramenta *online* Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)⁶⁴, específicos para a região de amplificação desejada. Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 2% para a presença de produtos do tamanho esperado e ausência de contaminação. Em seguida, foi realizada purificação enzimática com *illustra™ ExoProStar™* (GE), segundo instruções do fabricante, para remoção de excesso de oligonucleotídeos e nucleotídeos livres. A reação de sequenciamento se deu utilizando o BigDye® Terminator v3.1 sequencing standard kit (Thermo Fisher), utilizando os mesmos oligonucleotídeos da reação de PCR, seguido de precipitação dos produtos utilizando etanol/EDTA. Após purificação, as amostras foram novamente suspensas em Hi-Di™

Formamide (Thermo Fisher) e submetidas à eletroforese capilar no equipamento 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher).

Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando o software Geneious (<https://www.geneious.com/>)⁶⁵. Os segmentos contínuos de DNA (*contigs*) formados pelo sequenciamento bidirecional foram alinhados conforme a sequência referência baixada do banco de dados NCBI para cada gene⁶⁶.

3.4 Análises de variantes

Foram selecionadas as alterações preditas como causadoras de modificação na sequência das proteínas. Dentre essas, poderiam ser encontradas alterações causadoras de troca de aminoácido (*missense*), geradoras de códon de parada (*nonsense*), causadoras de mudança no quadro de leitura do gene (*frameshift*), e as possivelmente modificadoras de sítio de *splicing*. Foram consideradas para a análise as variantes pontuais (envolvendo apenas um nucleotídeo), as inserções e as deleções envolvendo um ou mais nucleotídeos.

Foi utilizado filtro para variantes com baixa frequência populacional (*minor allele frequency*, MAF <0,1%), conforme a consulta de bancos de dados do projeto de sequenciamento genômico (*Genome Aggregation Database - gnomAD*) e do banco de dados nacional em exoma (Arquivos Brasileiros Online de Mutações - ABraOM).

As ferramentas de pesquisa *Pubmed* e *ClinVar* foram utilizadas para buscar descrições prévias na literatura, estudos funcionais e para verificar a classificação das variantes atribuídas pelos outros laboratórios, juntamente com a evidência fornecida para a mesma.

As variantes tipo *missense* foram submetidas à análise *in silico*, por quatro algoritmos de predição de impacto funcional: *Mutation Taster*, *Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN)*, *Sort Intolerant from Tolerant (SIFT)* e *Polymorphism Phenotyping 2 (PolyPhen-2)*, que avaliam o grau de impacto da substituição do aminoácido original pela variante, por meio da análise da

conservação evolutiva da região proteica alterada (entre espécies distintas) e das características bioquímicas dessa região ou domínio.

A classificação das variantes nos genes causais foi baseada nos critérios ACMG (ANEXOS, tabela 2A e 2B)⁵⁰, sendo utilizada uma ferramenta *online* para a pontuação e classificação (www.medschool.umaryland.edu/Gene_Variant_Interpretation_Tool1.html)⁶⁷. As variantes classificadas como classe 3 (*VUS, variant of uncertain significance*), classe 4 (possivelmente patogênicas) ou classe 5 (patogênicas)⁶⁸ foram descritas em detalhes, conforme sua frequência populacional e avaliação *in silico*.

Em um painel de 100 genes, à luz do conhecimento vigente, foram considerados 18 genes causais para SQTl e 20 genes causais para SBr (figura 7)^{14,69}.

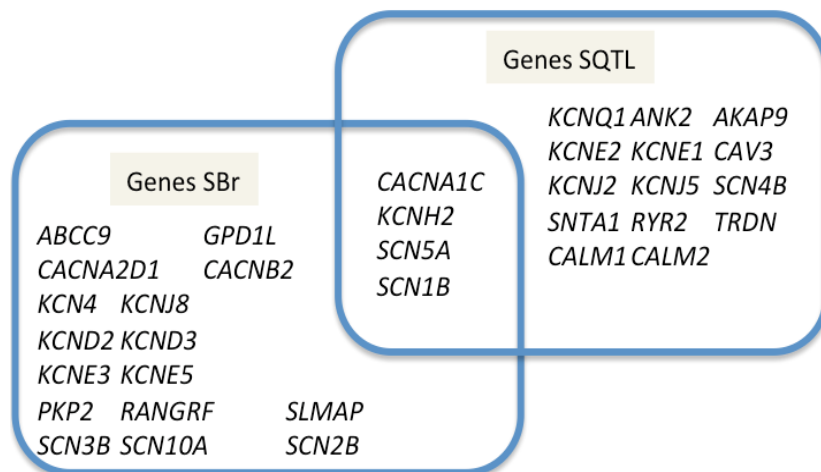


Figura 7: Genes considerados causais na SQTl e na SBr, demonstrando os genes em comum na intersecção⁷⁰.

3.5 Cascata de rastreamento familiar

Após a identificação genética do probando, os familiares de primeiro grau foram convocados para o rastreamento clínico e/ou genotipagem. Conforme a cascata de rastreamento familiar (figura 8), o teste genético, por meio do sequenciamento clássico (Sanger), foi o método de triagem nas famílias de probandos com variantes patogênicas. A partir do resultado do probando, em familiares já diagnosticados na triagem clínica, a presença da

mutação foi considerado um teste confirmatório. Para os pacientes assintomáticos e sem fenótipo, o teste genético foi realizado para detectar os portadores silenciosos⁵¹. Os familiares de pacientes sem identificação molecular ou portadores de *VUS* foram convocados para a triagem clínica ambulatorial. O rastreamento genético, não recomendado rotineiramente em casos de *VUS*, foi feito para fins de análise de segregação e classificação de variantes. Quando os probandos eram portadores de variantes possivelmente patogênicas, a avaliação clínica foi complementar e os dados de co-segregação foram também utilizados na classificação das variantes.

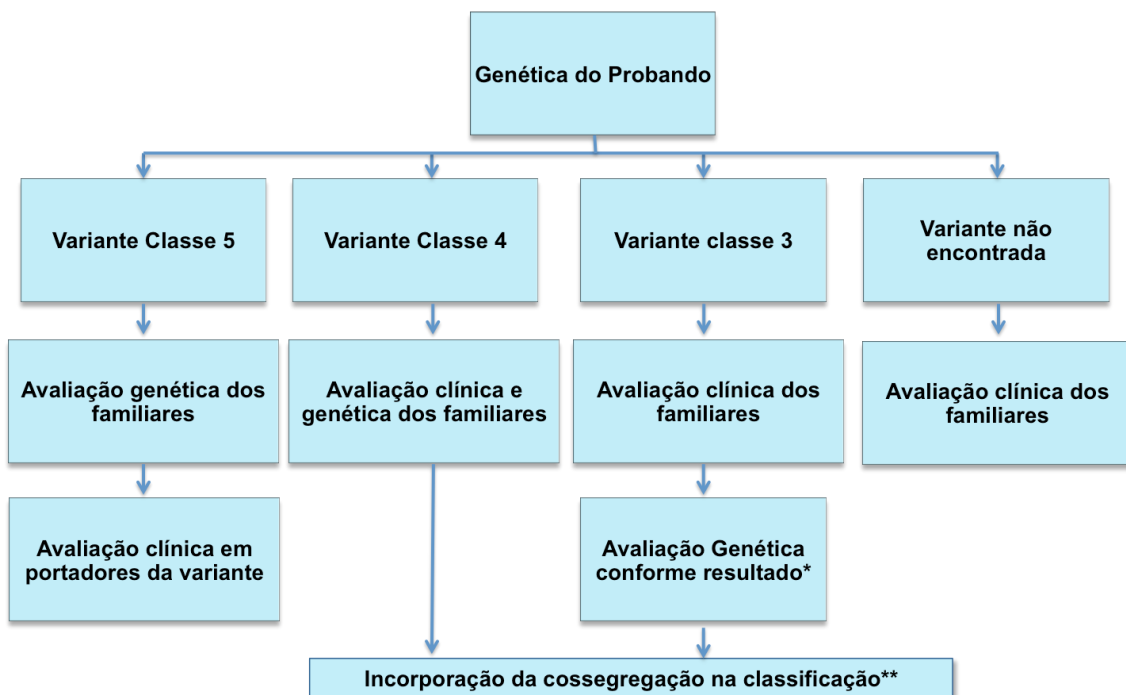


Figura 8: Cascata de rastreamento clínico e genético. * avaliação genética conforme resultado clínico; havendo familiares afetados, foi realizado estudo de co-segregação. ** A co-segregação foi classificada como forte, moderada ou fraca⁷¹, com incorporação dos dados pelos critérios do ACMG⁵⁰.

Os resultados obtidos nos estudos de co-segregação foram utilizados no escore do ACMG para refinar a interpretação das variantes. Foi utilizado o modelo proposto por Jarvik et. al, categorizando a evidência da co-segregação em nível complementar (*supporting*), moderado (*moderate*) ou forte (*strong*)⁷¹.

Conforme o critério diagnóstico das diretrizes internacionais,²⁴ os familiares do grupo SQTL com variante patogênica identificada foram todos

incluídos no registro, independente do fenótipo; já os pacientes com SBr foram incluídos apenas se exibissem o padrão de Brugada tipo 1.

3.6 Associações Genótipo-Fenótipo

Nos pacientes com SQTl e SBr foram verificados os critérios clínicos que poderiam se relacionar com a presença de variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas. Pacientes portadores de VUS foram considerados como genótipo indefinido pelos critérios vigentes na ocasião do método.

Na Síndrome do QT longo congênito

Os pacientes foram divididos em 4 grupos, conforme o tipo de SQTl: portadores de variantes em *KCNQ1* (SQTl1), portadores de variantes em *KCNH2* (SQTl2), portadores de variantes em *SCN5A* (SQTl3) e portadores de variantes em *KCNJ2* (SQTl7), que já compunham os maiores grupo no registro do InCor.

As variáveis comparadas entre os grupos foram: sexo feminino, a presença de síncope ou PCRec, ritmo flagrado com os sintomas, fatores desencadeantes da arritmia (esforço, estresse emocional, puerpério, gestação, repouso/sono ou desconhecido), além do intervalo QTc, a presença de *notch* ao ECG e o escore de Schwartz. A penetrância da doença foi calculada nos 4 grupos, considerando a relação entre afetados (fenótipo positivo) pelo número total de carreadores (genótipo positivo)⁷².

Na Síndrome de Brugada

Os pacientes foram classificados em dois grupos: SCN5A presente ou ausente, considerando apenas as variantes patogênicas e possivelmente patogênicas. As variáveis comparadas entre os grupos foram: idade, sexo masculino, presença do padrão tipo 1 espontâneo, história familiar de MSC e os dados obtidos no eletrocardiograma e no estudo eletrofisiológico.

3.7 Análise estatística

Foram descritas as características dos pacientes segundo cada variável de interesse, com uso de frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas, sendo verificada a associação com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos de Fisher e foram utilizadas medidas resumo (média e desvio padrão) para as variáveis quantitativas e comparados os valores segundo as variáveis de interesse com uso de testes t-Student (Kirkwood e Sterne, 2006).

Na SQTL, foram descritas as características qualitativas dos pacientes segundo genótipo com uso de frequências absolutas e relativas e verificada a associação dessas características com o genótipo com uso de testes da razão de verossimilhanças (Kirkwood e Sterne, 2006). As características quantitativas foram descritas segundo genótipo com uso de medidas resumo (média \pm desvio padrão ou mediana (mínimo e máximo) e comparadas com uso de análise de variâncias (ANOVA) e testes Kruskal-Wallis respectivamente (Kirkwood e Sterne, 2006) seguidos de comparações múltiplas de Bonferroni e comparações múltiplas de Dunn respectivamente (Neter, et. al., 1996) para verificar entre genótipos ocorreram as diferenças.

Para realização das análises foi utilizado o *software* IBM-SPSS for Windows versão 20.0 e para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2003. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4 Resultados

4.1 Dados gerais do registro

Foram incluídos no registro 277 pacientes, sendo 158 com diagnóstico de SCTL (158/277; 57%) e 119 com diagnóstico de SBr (119/277; 43%). A porcentagem de probandos entre os portadores de SCTL foi de 53,2% (84/158) e entre os pacientes com SBr foi de 78,2% (93/119). A idade média dos pacientes com SCTL foi de $26 \pm 19,7$ anos e a dos pacientes com SBr foi de $41,1 \pm 13,9$ anos. O sexo feminino foi mais frequente na casuística de SCTL (104/158; 65,8%), enquanto que nos casos de SBr houve maior frequência para o sexo masculino (84/119; 70,6%). Os pacientes eram predominantemente da raça branca em pacientes com SCTL (124/146; 84,9%) e em pacientes com SBr (77/119; 64,7%). Os dados gerais estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4: Dados dos pacientes do registro

	SCTL	SBr	p-Valor
	N=158	N= 119	
Idade (anos), média \pm DP	26 \pm 19,7	41,1 \pm 13,9	<0,001
Sexo feminino, n %	104 (65,8)	35 (29,4)	<0,001
Raça			0,008
Branca, n/N %	124/146 (84,9)	77/119 (64,7)	
Negra, n/N,%	1/146 (0,7)	1/119 (0,8)	
Amarela, n/N,%	4/146 (2,7)	8/119 (6,7)	
Parda, n/N,%	19/146 (13)	33/199 (27,7)	
Probando n, %	84 (53,2)	93 (78,2)	<0,001
Sequenciados, n/N,%	76/84 (90,5)	63/93 (67,7)	<0,001
Genótipo identificado* n/N,%	51/76 (67,1)	13/63 (20,6)	<0,001

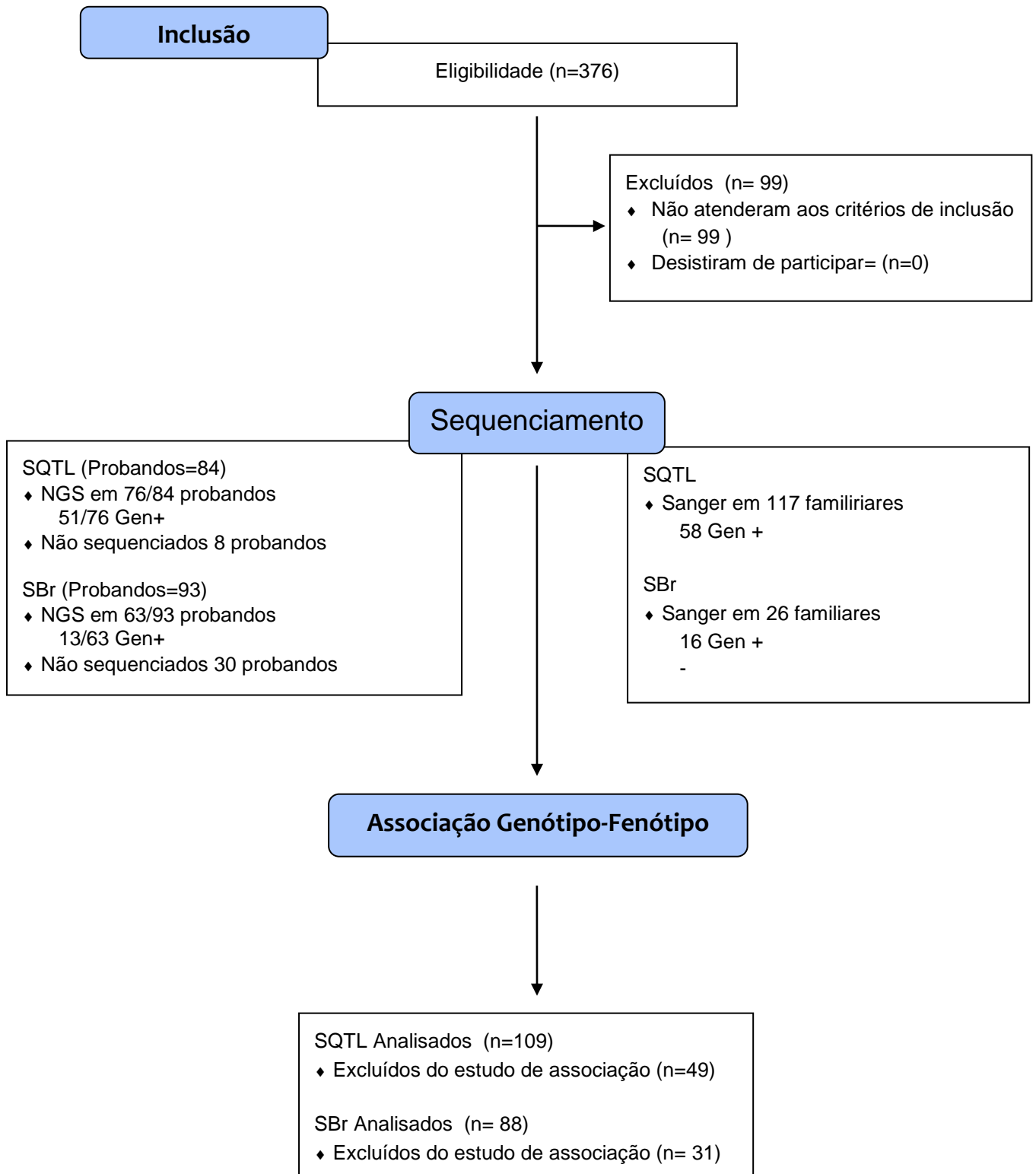
* portadores de variantes classe 4 ou 5

4.2 Avaliação genética de probandos

Entre outubro de 2015 a março de 2019 foram sequenciados pela tecnologia NGS 67,7% dos probandos com SBr (63/93) e 90,5% dos probandos

SQTL (76/84). Para rastreamento familiar, pelo método de Sanger, foram examinados 117 familiares de pacientes com SQTL e em 26 com SBr (figura 9).

Figura 9: CONSORT 2010 Fluxograma da população submetida à avaliação genética.



Foram encontradas variantes patogênicas (classe 5) e possivelmente patogênicas (classe 4) em 51/76 (67,1%) probandos com SQT. Em 10/76 (13,2%) probandos com SQT foi encontrada uma variante classe 3. Nos pacientes com SBr, em 13/63 (20,6%) foram identificadas variantes classes 4 e 5 e em 8/63 (12,7%), variantes classe 3.

Síndrome do QT longo

Nos probandos com SQT, foram encontradas variantes classes 4 ou 5 nos genes *KCNQ1* (9/51; 17,6%), *KCNH2* (30/51; 60,8%), *SCN5A* (6/51; 11,8%) e *KCNJ2* (6/51; 11,8%). A presença de variantes compostas classes 4 ou 5 foi observada em 2 pacientes, ambos do gene *KCNH2*.

Em dois pacientes encontramos duas variantes classe 3 em diferentes genes (*KCNQ1* com *KCNH2*; *KCNE1* com *KCNE2*); em outros 3 pacientes com variantes classe 3, já havia uma variante classe 5 associada. O detalhamento dos critérios sobre frequência populacional, predição *in silico*, classificação no *Clinvar* e ACMG estão demonstrados em ANEXOS, tabela 4.

A maioria das variantes patogênicas nos pacientes com SQT1 (5/8; 62,5%) e SQT3 (4/5; 80%) foram do tipo *missense*; já nos pacientes com SQT2 10/18 (55,6%) das variantes foram tipo *nonsense* (por exemplo, deleção e frameshift).

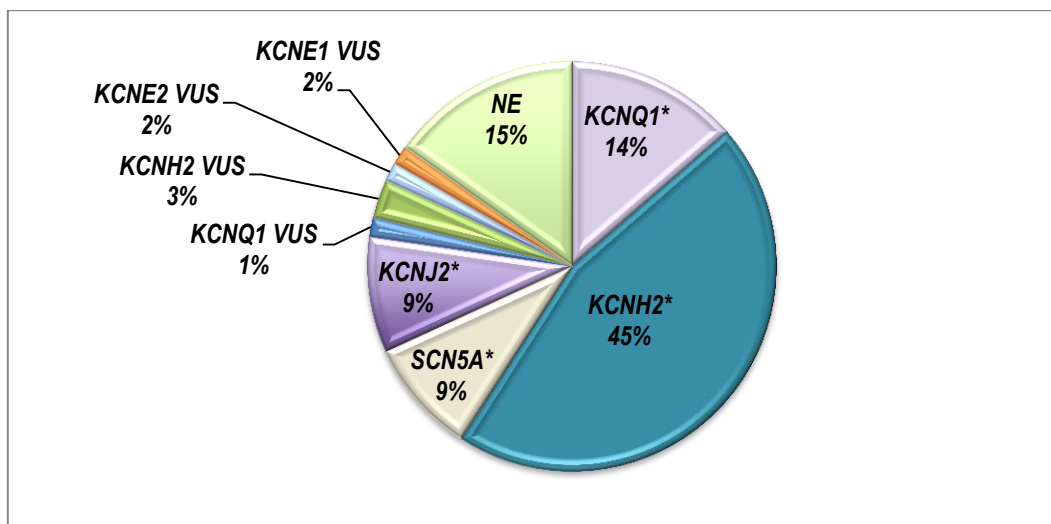


Figura 10: Variantes encontradas nos pacientes com SQT.* variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas; VUS: *variants of uncertain significance*; NE: não encontrado pelo NGS.

Síndrome de Brugada

Nos pacientes com SBr, os 13 probandos identificados eram portadores de variantes no gene *SCN5A*, sendo um portador de mutação composta. Não foram encontradas variantes classes 4 ou 5 nos demais genes reportados como relacionados com a SBr. As variantes classificadas como *VUS* foram detectadas em 7 pacientes no gene *SCN5A* e em 1 paciente no gene *SCN1B*. (Figura 11)

O detalhamento dos critérios sobre frequência populacional e a classificação das variantes na SBr estão demonstrados em ANEXOS, tabela 5.

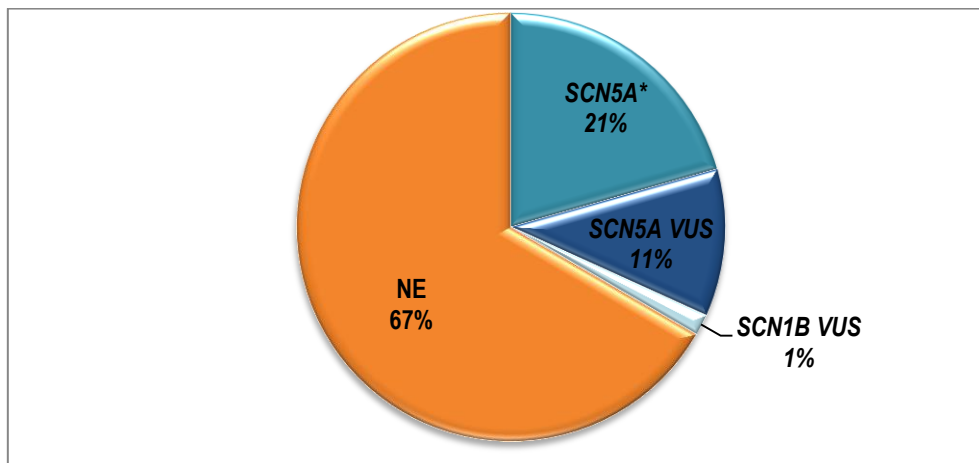


Figura 11: Variantes encontradas em pacientes com SBr. * variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas. VUS: *variants of uncertain significance*; NE: não encontrado pelo NGS.

4.3 Rastreamento familiar

Na cascata de rastreamento familiar, a partir de 84 probandos com SQTL, 74 familiares preencheram critérios de inclusão para diagnóstico de SQTL. As principais características de elegibilidade para o diagnóstico de

familiares foram: intervalo QTc acima de 480ms (50/74; 66,7%) ou presença de uma variante patogênica nos genes suscetíveis à SQTl (24/74; 32,4%). (Figura 12).

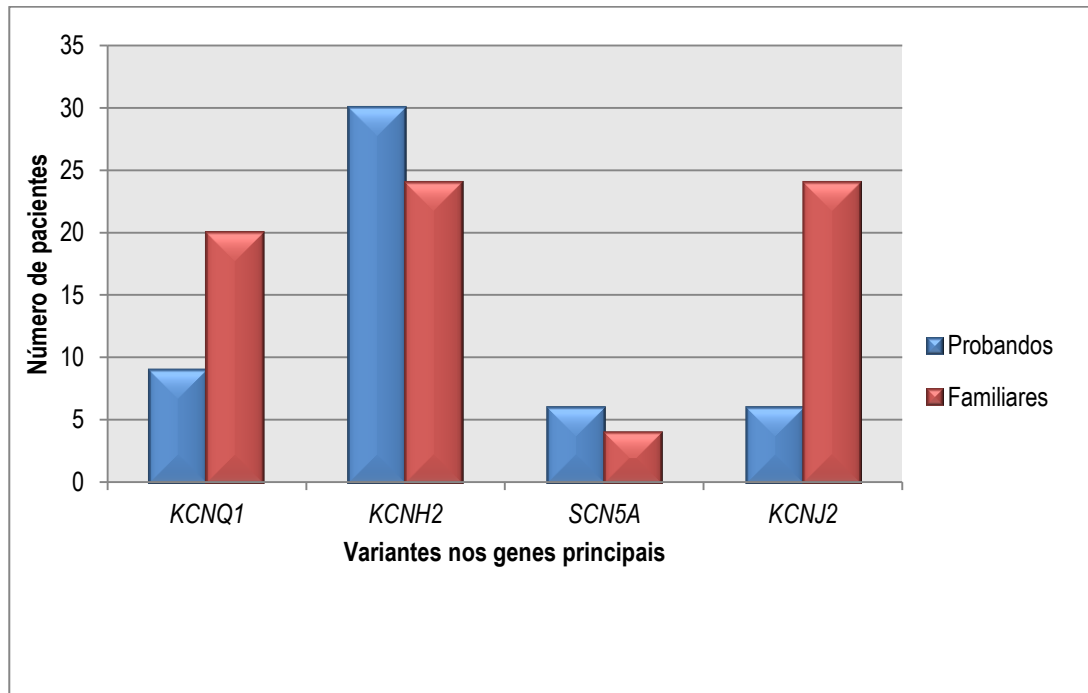


Figura 12: Distribuição das variantes patogênicas e possivelmente patogênicas na SQTl em probandos e familiares.

Nos pacientes com SBr, a partir de 93 probandos, foram identificados 26 familiares portadores de SBr. O diagnóstico dos familiares foi confirmado pelo eletrocardiograma basal (16/26; 61,5%), pelo eletrocardiograma orientado a ser realizado em vigência de febre (1/26; 3,8%) ou pelo teste de ajmalina (9/26; 34,6%). Em 11/26 (42,3%) pacientes, o teste genético complementou o diagnóstico clínico.

4. 4 Associação genótipo-fenótipo

Síndrome do QT longo

Os pacientes portadores de SQTl apresentavam idade média de 26 +/- 19,7 anos, sendo 104 (65,8%) do sexo feminino. As principais características clínicas e evolutivas entre os subtipos de SQTl estão representadas na tabela 6. O intervalo QTc médio encontrado nos probandos foi de 519,5 ± 48ms e em familiares de 487,6 ± 42ms (p<0,005). O intervalo QTc médio foi mais prolongado em probandos de SQTl 1 a 3 (respectivamente, QTc=530ms; QTc=536ms e QTc=519ms), do que em probandos com SQTl7 (QTc=457ms). A média do escore de Schwartz em probandos foi de 4,6 ± 1,3. O antecedente familiar de morte súbita precoce foi relatado em 42,5% dos probandos (31/73).

Tabela 7: Associação genótipo-fenótipo em pacientes com SQTL

Variável	Genótipo				p
	SQTL1 (N = 29)	SQTL2 (N = 53)	SQTL3 (N =11)	SQTL7 (N = 16)	
Idade (anos), média ± DP	23,6 ± 19,1	23,9 ± 17,5	31,1 ± 21,5	34,64 ± 17,3	0,680*
Gênero feminino	19/29 (65,5)	31/53 (58,5)	5/11 (45,5)	12/16 (75)	0,419
Status Probando	9/29 (31,0)	30/53 (56,6)	6/11 (54,5)	6/16 (37,5)	0,124
Escore de Schwartz, média ± DP	4,8 ± 1,1	4,8 ± 1,2	4,2 ± 1,1	2 ± 1,4a	<0,001*
AF de MSC em probandos	4/9 (44,4)	11/28 (39,3)	2/6 (33,3)	5/6 (81,3)	0,322
Sintomas	13/29 (44,8)	27/51 (52,9)	5/11 (45,5)	8/16 (50)	0,904
Síncope	12/29 (41,4)	22/51 (43,1)	4/11 (36,4)	7/16 (43,8)	0,978
PCRec	1/29 (3,4)	8/51 (15,7)	1/11 (9,1)	4/16 (25)	0,150
Gatilhos dos sintomas					0,022
Estresse físico	5/13 (38,5)	2/27 (7,4)	1/5 (20)	2/8 (25)	
Emoção/Susto/puerperio	6/13 (42,2)	9/27 (33,3)	0/5 (0)	3/8 (37,5)	
Repouso/sono	0/13 (0)	9/27 (33,3)	4/5 (80)	0/8 (0)	
Medicações/DHE	2/13 (15,4)	5/27 (18,5)	0/5 (0)	3/8 (37,5)	
ECG					
FC basal (bpm)	72,9 ± 28,5	67,8 ± 23,6	62 ± 36,1	77 ± 23,2	0,166
Qtc, média ± DP (Todos)	504,6 ± 42,4	510,1 ± 42,2	459 ± 165,7	435,6 ± 41,5a	<0,001*
Qtc, média ± DP (Probandos)	530,3 ± 41,6	535,9 ± 44,4	519 ± 30,9	456,5 ± 46,3a	0,002*
Presença de <i>Notch</i>	1/22 (4,5)	31/46 (67,4)	2/9 (25)	0/16 (0)	<0,001
CDI	5/29 (16,7)	18/50 (35,3)	4/11 (40)	3/16 (20)	0,218
EAPF	4/29(13,8)	10/50(20)	3/11(27,3)	4/16 (25)	0,721
Tempo de seguimento (anos), mediana (mín; máx.)	8,2 (1; 22)	9,7 (0; 43)	6,7 (1; 13)	7,5 (1; 26)	0,828**

AF de MSC: antecedente familiar de morte súbita cardíaca precoce, PCRec: parada cardíaca recuperada, DHE: distúrbios hidroeletrólitos, CDI: cardiodesfibrilador implantável, EAPF: evento arritmico potencialmente fatal.

Teste da razão de verossimilhanças; * ANOVA; ** Teste Kruskal-Wallis; a SQTL7 < todos os demais genótipos (p < 0,05)

Entre os subtipos de SQTL não houve diferença entre as características idade, gênero feminino e *status* probando. Nos 158 pacientes com SQTL, em 29/158 (18,4%) dos casos havia história progressiva de PCRec e, em 60/158 (38%) dos pacientes, a manifestação clínica era síncope presumivelmente de causa arritmica. Os demais pacientes eram assintomáticos (69/158; 43,7%). Dos 29 pacientes portadores de variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas em *KCNQ1*, 4/29 (13,8%) eram carreadores silenciosos; em *KCNH2* observamos essa ocorrência em 8/53 (15,1%). A penetrância observada nesses pacientes com SQTL1 e 2 foi em torno de 85%. Todos os pacientes com SQTL3 eram sintomáticos ou apresentavam intervalo QTc acima de 480ms (penetrância de 100%). O clássico fenótipo clínico na SQTL7 foi observado em todos os pacientes, considerando a tríade dismorfismo facial, arritmias ventriculares e alterações neurológicas, a despeito de um intervalo QTc normal (penetrância de 100%).

A presença do padrão *notch* em três derivações eletrocardiográficas foi mais observada em pacientes com SQTL2 (31/46; 67,4%), em relação aos demais subtipos de SQTL ($p < 0,001$).

Os fatores relatados pelos pacientes como deflagradores do evento arritmico, conforme o subtipo de SQTL, estão resumidos e plotados no gráfico 3. O gatilho esforço físico foi observado nos 4 subtipos, sendo mais frequente no SQTL1; as situações agrupadas em estresse emocional e puerpério foram mais frequentes no SQTL2 e os eventos que ocorreram no sono foram mais prevalentes nos SQTL2 e SQTL3. Nos pacientes com SQTL7, o principal deflagrador foi o uso de medicações com potencial de aumentar o intervalo QTc ou a presença de distúrbios eletrolíticos. (Figura 13)

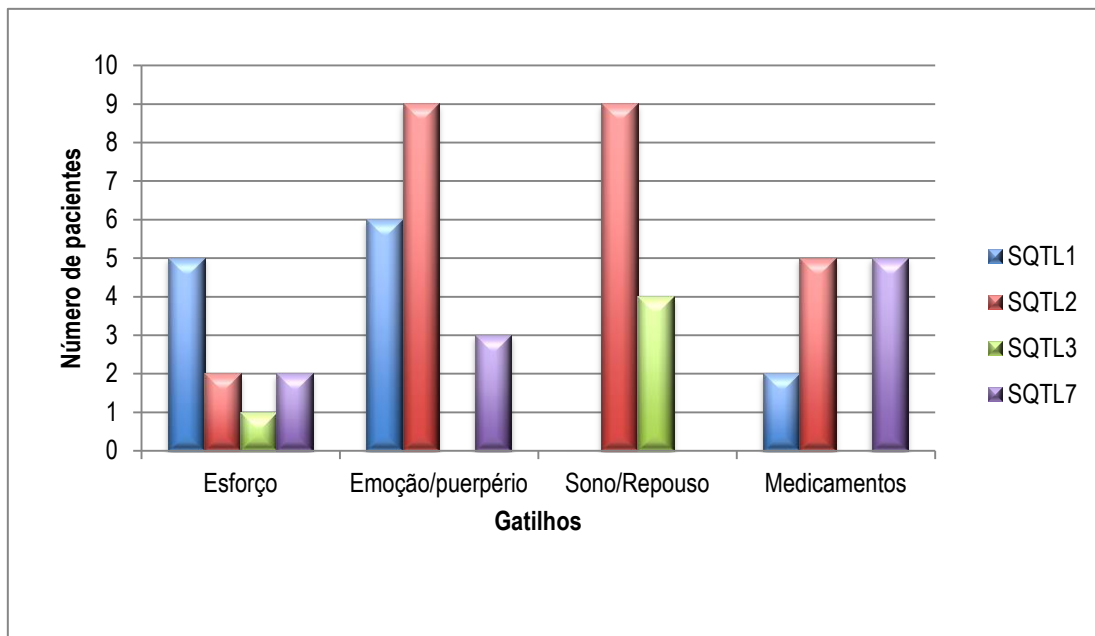


Figura 13: Fatores deflagradores de EAPF, conforme os subtipos de SQT.

Os pacientes com SQT que foram submetidos ao implante de CDI (47/158, 29,7%) tinham histórico de PCRec (22/47; 46,8%) ou de síncope presumivelmente arrítmica (25/47; 53,2%). No período de seguimento médio de $8,6 \pm 7,9$ anos, 40,4% (19/47) dos pacientes com SQT receberam terapia apropriada pelo CDI (figura 14). O percentual de EAPF foi menor em termos absolutos nos pacientes com SQT1, porém sem atingir diferença estatística entre os demais grupos. A taxa anual de EAPF na população geral com SQT foi de 2,2%, sendo que nos pacientes assintomáticos foi de 0,46%.

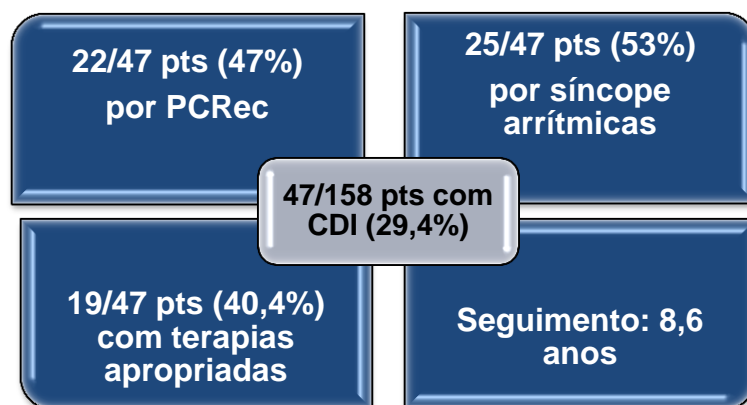


Figura 14: Uso de CDI em pacientes com SQT. Pts: pacientes

Síndrome de Brugada

O padrão tipo 1 espontâneo foi observado em 89/119 (74,8%) dos pacientes com SBr. A idade média do diagnóstico foi de 41,1 anos (4 a 72 anos), 84/119 (70,6%) dos pacientes eram do sexo masculino e 93/119 eram probandos. Na história clínica, 28/119 pacientes foram diagnosticados após sintomas, como PCRec (9/119; 7,6%) ou síncope com características arritmogênicas (21/119, 17,7%). Dois pacientes estavam em investigação de síncope e foram diagnosticados após PCRec. Havia antecedente familiar de morte súbita precoce em 38/93 probandos (40,1%).

As características clínicas, eletrocardiográficas e eletrofisiológicas dos pacientes, conforme resultado do teste genético estão demonstradas na tabela 8. Os pacientes carreadores de classes 4 ou 5 no gene *SCN5A* tiveram uma apresentação clínica mais precoce, em torno de 34 anos ($p=0,037$). No ECG desses pacientes foi observado com maior frequência o sinal de AVR ($p<0,001$), a presença da onda S profunda e/ou empastada na derivação DI ($p=0,019$) e a f-QRS (0,007). O intervalo PR foi numericamente maior em portadores de mutação em *SCN5A* ($p=0,065$) e a duração do QRS em D2 e V2 foi semelhante entre os grupos.

Quanto aos aspectos relacionados ao EEF, foi obtida uma mediana mais longa do intervalo HV em pacientes carreadores dessas variantes em *SCN5A* (48ms *versus* 68ms, $p<0,001$) quando comparados com os pacientes sem genótipo identificado. Outros dados, como a indução de TV/FV e $PRVe<200ms$ foram semelhantes entre os grupos. A taxa anual de eventos foi baixa (1,7% ao ano na população geral e 0,7% nos assintomáticos), independente da presença de mutações no *SCN5A*.

Tabela 8: Associação genótipo-fenótipo em pacientes com SBr

Variáveis	SCN5A +	SCN5A -	Total	p-Valor
	(N = 65)	(N = 23)	(N = 88)	
Idade (anos), média ± DP	41,2 ± 14	33,9 ± 14	41,1 ± 13,9	0,037**
Sexo masculino, n (%)	48 (73,8)	15 (65,2)	63 (71,6)	0,430
Tipo 1 espontâneo, n (%)	48 (73,8)	15 (65,2)	63 (71,6)	0,247
Síncope, n (%)	9 (13,8)	6/23 (26,1)	15 (17)	0,180
PCRec, n (%)	7 (10,8)	0	7 (8)	0,101
AF de MSC, n (%)	34 (52,3)	17 (73,9)	51 (58)	0,071
PR (ms), média ± DP	166,3 ± 25,6	184,04 ± 41,9	170.6 ± 30,2	0,065**
QRS em DII (ms), média ± DP	105,6 ± 20	111,3 ± 20,9	105,3 ± 21	0,254 **
QRS em V2 (ms), média ± DP	105,2 ± 18,6	108,2 ± 21,8	103,7±19	0.581**
Sinal de aVR, n/N (%)	9/62 (14,5)	13/22 (59,1)	22/84 (26.2)	<0,001
S em DI, n/N (%)	30/62 (48,4)	17/22 (77,3)	47/84 (56)	0,019
ReP em periféricas, n/N (%)	6/62 (9,7)	1/22 (4,5)	7/84 (8,3)	0,454*
f-QRS, n/N (%)	5/64 (7,8)	7/23 (30,4)	12/87 (13.8)	0,007*
TV/FV induzida, n/N (%)	17/44 (38,6)	6/15 (40)	23/59 (39)	0,925
Intervalo HV(ms), mediana (min;max)	68 (50;110)	48 (35;65)	50 (35;110)	<0,001**
PRVe<200ms, n/N (%)	5/34 (14,7)	2/15 (13,3)	7/49 (14,3)	0,899*
EAPF no seguimento, n (%)	3 (4,6%)	3 (13)	6 (6,8)	0,168

SCN5A +: portadores de variantes classe 4 ou 5 no gene SCN5A, SCN5A -: não portadores.

PCRec: parada cardíaca recuperada; AF de MSC: antecedente familiar de morte súbita precoce; ReP: repolarização precoce; f-QRS: fragmentação de QRS; TV/FV: taquicardia/fibrilação ventricular; HV: His-ventrículo; PRVe: período refratário ventricular efetivo; EAPF: evento arritmico potencialmente fatal.

Chi-square test, * Teste exato de Fisher, ** Teste T de Student, DP: desvio padrão

4.5 Dados gerais e desempenho do sequenciamento

O sequenciamento apresentou um *output* médio de $189,8 \pm 9,3$ Mb. As estatísticas de alinhamento mostraram uma média de $3,7 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ dos *reads* gerados, que foram mapeadas nas regiões-alvo contra a referência, cuja especificidade média do alinhamento foi de $72,7 \pm 15\%$.

As variantes encontradas nos genes principais para SQTL apresentaram cobertura média de 136 vezes e qualidade média de 35 (Q35, probabilidade de erro menor que 0,1%). Nos pacientes com SBr, as variantes encontradas tiveram cobertura média de 61,3 vezes e qualidade média de 37 (Q37, probabilidade de erro menor que 0,1%). A porcentagem média de cobertura acima de 10 vezes nos genes alvos estudados foi de 93%.

O estudo das variantes nos 100 genes do painel, conforme seleção de baixa frequência populacional, gerou a análise de 862 variantes, com média de 6,2 por paciente.

5 Discussão

As canalopatias cardíacas são consideradas doenças com perfil de herança genética mendeliana ainda a serem exploradas, uma vez que a evolução dos novos conhecimentos fisiopatológicos tem crescido com a descoberta de novas variantes genéticas e novos perfis fenotípicos. Apesar de uma considerável evolução do conhecimento destas patologias nos últimos 30 anos, muitas lacunas ainda permanecem, desde a precisão dos critérios clínicos e genéticos até a melhor intervenção para a prevenção da complicação clínica mais temível, a morte súbita. Acrescentam-se a estas questões o fato de existirem populações menos representadas em estudos, como a população brasileira.

Nosso estudo representa até o momento o maior e mais abrangente registro em pacientes com canalopatias cardíacas na população brasileira. Foi necessária a exploração de dados a partir de uma coorte histórica em hospital de referência em ensino, assistência e pesquisa para que um número considerável de probandos e familiares fosse atingido, em especial os portadores de síndrome do QT longo e síndrome de Brugada. Nossos dados gerais apontam para um perfil de reprodutibilidade adequado em relação aos obtidos nas demais casuísticas mundiais, que serão discutidos por tópicos das canalopatias analisadas.

Síndrome do QT longo

O presente estudo é uma coorte longitudinal, com inclusão de pacientes desde a década de 90. Em nosso registro, a prevalência da SQTl foi maior que de SBr, fato este esperado e justificado, uma vez que o diagnóstico e a prevalência mundial da SQTl são historicamente mais antigos.

A SQTl foi bastante estudada nos últimos anos em populações caucasianas, japonesas e chinesas. Um estudo realizado em afro-americanos, mostrou que sua representatividade no registro norte-americano é de apenas 1,2% .⁷³ Além disso, esses registros possuem pouca diversidade étnica quando comparada ao perfil tipicamente miscigenado da população brasileira. Apesar

da população estudada ser predominante branca, sabemos que no Brasil a raça autodeclarada possui falhas, conforme observado por Cardena et al, que descreveram que quase 40% dos indivíduos autodeclarados como brancos tinham DNA mitocondrial africano e as raças, de forma geral, apresentavam algum nível de ancestralidade ameríndia⁷⁴. Em nosso estudo, buscamos associar o perfil clínico e mutacional da população, para assim procurar semelhanças ou divergências que possam ser úteis na nossa prática clínica.

A idade comum no diagnóstico de SQTl oscila entre 20 e 30 anos, como demonstramos em nossos pacientes, independente do subtipo de SQTl, que está de acordo com alguns registros^{75, 76}. Outros, no entanto, descrevem uma faixa etária mais jovem, entre 10 e 20 anos, o que poderia guardar relação com prognóstico^{77, 78}. Além disso, o predomínio de atendimento da população adulta ou pediátrica de uma determinada instituição também poderia levar a um viés de seleção.

Em nossa casuística, observamos algumas características que podem ser peculiares ao perfil de gravidade dos pacientes, próprias de um hospital de atendimento referenciado. A medida do intervalo QT, que é um forte preditor consensual de eventos arrítmicos potencialmente fatais, foi maior em nosso registro do que a média obtida por outros autores (530 *versus* 490 a 500ms)^{53, 79,80,81}.

Em relação à apresentação clínica inicial, mais da metade da população estudada (56%) referia síncope ou parada cardíaca recuperada. Em comparação aos grandes registros recentes na literatura, Shimizu et al⁷⁷ descreveram que esta sintomatologia ocorreu em torno de 53% dos pacientes, porém outros reportaram percentagem maior de pacientes assintomáticos (até 80 a 85% dos casos)⁵³.

A tecnologia NGS possibilitou o diagnóstico molecular de 67% dos probandos com apenas um paciente homocigoto, portador da síndrome de Jervell-Lange-Nielsen. Apesar dos recentes trabalhos alcançarem até 80% de rendimento no resultado,⁸² existem casuísticas, com diferentes critérios de inclusão, que reportaram em torno de 30 a 64% de testes positivos^{83, 84}. A distribuição dos subtipos foi diferente da observada em grandes registros, com predomínio de variantes classe 4 ou 5 em *KCNH2* (46%), seguida da

participação do gene *KCNQ1* (14%). A principal diferença foi a baixa prevalência de portadores de SQT1 e uma casuística considerável (9% dos casos) da rara Síndrome de Andersen-Tawil (SQT7)^{14,84}. É importante ressaltar que há uma proporção incomum de pacientes com SQT7 em nosso estudo, o que pode ser atribuído ao viés de seleção de um serviço terciário ou à complexidade do tratamento desses pacientes⁸⁵.

A maioria dos estudos apresenta uma proporção semelhante de pacientes com SQT1 e SQT2⁸⁶. Quanto à natureza das variantes, encontramos um leve predomínio das mutações tipo *nonsense* sobre as tipo *missense* na SQT2, também observada em outras populações. Na SQT1 e na SQT3 são esperados os achados de maior frequência de mutações tipo *missense*, como também ocorreu em nosso registro. Não foi possível relacionar esse dado à gravidade, pois nosso registro é menor que os grandes registros multicêntricos que exploraram este dado¹⁶.

Com relação ao alto grau de penetrância (85%) encontrada em nossa população com genótipo identificado (SQT 1 a 3), chama atenção o fato de esse dado ser maior que o encontrado por outros autores, em torno de 25%⁸⁷. É possível que essa diferença se deva à recente introdução dos testes genéticos em nosso serviço, pois os pacientes foram historicamente triados por sintomas ou eletrocardiograma alterado e, apenas após a implementação dos testes genéticos, foram também avaliados os portadores assintomáticos.

Já na casuística de SQT 3 era esperada uma alta penetrância e nossos dados foram concordantes com a literatura pesquisada.⁸⁸ Nas famílias com SQT7 (síndrome de Andersen-Tawil), constatamos um valor médio normal do intervalo QT e uma expressão clínica variável da tríade clínica, conforme esperado^{89,90}. Há uma frente de especialistas que interroga se essa síndrome deve pertencer aos subtipos de SQT, justamente pelo intervalo QU prolongado e não o QT, associada às suas particularidades multisistêmicas¹⁴.

Ainda em relação à associação genótipo-fenótipo, observamos a presença do padrão *notch* com maior frequência nos eletrocardiogramas dos portadores de SQT2, característica já descrita por Porta-Sánchez *et al*⁹¹.

Em nossa casuística, à semelhança dos resultados publicados originalmente por Schwartz et al, não houve gatilho exclusivo para um subtipo de SQT1¹⁵. O que encontramos, foi um leve predomínio do gatilho esforço na SQT1 e uma preponderância de eventos no sono em SQT3, indo de encontro ao clássico perfil já descrito.

Em nosso registro de pacientes com SQT1 houve um predomínio de pacientes do sexo feminino (66%), que é uma prevalência esperada na literatura, não apenas pela expressão fenotípica, como também a relação com arritmias potencialmente fatais genótipo-dependente⁵³. Pelo tamanho amostral de pacientes, não subdividimos os tipos de SQT1 conforme topografia da mutação. Migdalovich et al, em um ensaio com 1166 pacientes com SQT2, demonstraram que após o início da adolescência, as mulheres apresentaram propensão para eventos cardíacos potencialmente fatais, independente da localização da mutação (*pore-loop* ou não *pore-loop*); os homens, por sua vez, apresentaram um risco maior quando a mutação em *KCNH2* era tipo "*pore-loop*"⁵³. Já na SQT1, Costa et al, entre 1051 portadores de SQT1, observaram risco igualmente elevado entre homens e mulheres com acometimento na região "*C-Loop*" do IKs, enquanto que em outras topografias, o risco é maior para homens. Nesse racional, a avaliação combinada de dados clínicos e genéticos poderia ser usada para melhorar a estratificação de risco nos pacientes com SQT1^{92, 93}.

Por outro lado, Mazzanti et al questionaram a validade de estratificar os pacientes conforme a natureza e topografia do defeito canalicular, pois a penetrância da doença variou de 10 a 100% entre os 1.710 pacientes avaliados em seu registro (subtipos 1 a 3). A conclusão dos autores foi de que a expectativa de elaborar estratégias de manejo para determinados tipos de mutações ("*C-loop*" ou "*pore-loop*") permanece ainda fora de alcance⁵³. Por outro lado, a definição em subtipos de SQT1 é uma informação crucial e, apesar de alguns dados clínicos (Ex. gatilhos da arritmia e formato de onda T) indicarem o tipo de canal afetado, nenhuma informação é patognomônica para uma classificação segura do subtipo de QT, com exceção do teste genético. Assim, o modelo mais consensual de estratificação de risco leva em

consideração a associação do intervalo QTc e o subtipo de SQTl (genótipo)^{24, 53}.

Em relação ao seguimento clínico, quase 30% dos pacientes foram submetidos ao implante de CDI por sintomas, sendo que 40% receberam terapia apropriada no seguimento, semelhante aos grandes centros de excelência em atendimento das canalopatias cardíacas^{94,95}. Por fim, a taxa anual de eventos no grupo geral (2,2%) e nos assintomáticos (0,2%) também é semelhante aos grandes registros⁵³.

Síndrome de Brugada

A SBr permanece um dos grandes desafios no diagnóstico e nas decisões terapêuticas em pacientes com arritmias hereditárias. Trata-se de uma doença com espectro clínico abrangente, compreendendo indivíduos de baixo a alto risco. A gravidade clínica está associada aos sintomas, que são infrequentes, e à presença do padrão tipo 1 espontâneo, que pode ser intermitente, dificultando a categorização de pacientes em escala de risco.

A própria história natural dos pacientes com SBr mudou ao longo do tempo⁴⁰. O rastreamento familiar ativo e a melhoria no reconhecimento eletrocardiográfico podem ter contribuído para o crescente número de pacientes de baixo risco nos registros mundiais. Curcio et al²⁸ demonstraram uma diminuição do risco de eventos arrítmicos quando o padrão de Brugada tipo 1 foi identificado apenas nas derivações superiores, técnica amplamente usada desde 2005 e introduzida nas diretrizes internacionais recentes^{28, 61}. Em nosso estudo, houve uma alta frequência do padrão espontâneo de Brugada tipo 1, porém em cerca de 73% pacientes (87/119) o diagnóstico foi obtido no ECG com derivações superiores. Esses achados poderiam contribuir para uma menor taxa de eventos anuais observada ao longo dos anos nos registros internacionais e em nossos pacientes (1,13% ao ano), em comparação com outros registros mais antigos (tabela 9).

O aumento do diagnóstico e a melhora progressiva da sobrevida podem também ser consequência de intervenções de mudança de estilo de

vida, recentemente introduzidos e regularmente padronizados em nossa instituição (Ex.: conscientização sobre drogas a serem evitadas, precauções sobre cuidados com alimentações copiosas, orientações gerais sobre perfil de exercícios, tratamento imediato da febre e visitas regulares para reforçar as precauções).

Tabela 9: Dados comparativos entre os registros internacionais e o InCor

	Brugada ⁹⁶	FINGER ⁹⁷	PRELUD E ⁵⁸	Sieira ⁹⁸	InCor
Tipo de estudo	UC	MC	MC	UC	UC
Ano da publicação	2003	2010	2012	2015	-
Número de pacientes	547	1029	308	404	119
Média de seguimento (meses)	24	31.9	36	74	71
Sexo masculino, n (%)	408 (74.6)	745 (72)	247 (80)	235 (58.2)	84 (70.6)
Idade média (anos)	41	45	47	43.2	41
Status Probando, n (%)	NA	808 (78)	NA	129 (31.9)	93 (78.2)
Tipo 1 espontâneo, n (%)	391 (71.5)	468 (45)	171 (56)	75 (18.6)	89 (74.8)
Sintomas, n (%)					
Síncope	124 (22.7)	313 (30)	65 (21)	114 (28.6)	21 (17.6)
PCRec	0	62 (6)	0	17 (4.2)	9 (7.6)
TV/FV induzida, n/N (%)	163/245 (66.5)	262/638 (41.1)	126/308 (41)	73/404 (18.1)	26/75 (34.7)
CDI, n (%)	177 (32.4)	551 (53.5)	137 (44)	168 (41.6)	25 (21)
Taxa anual de eventos, %	4.1	1.6	1.5	0.9	1.7

UC: unicêntrico, MC: multicêntrico. PCRec: parada cardíaca recuperada; TV/FV: taquicardia/fibrilação ventricular; CDI: cardiodesfibrilador implantável.

Em relação ao perfil demográfico, apesar da raça branca ter predominado em nosso registro, os pardos representaram quase 30% da população com SBr e apenas um paciente era de raça negra. Uma recente revisão sistemática da literatura mostrou que as publicações em SBr contemplam predominantemente as populações hispânicas, asiáticas e caucasianas⁴. Raramente se observa esta doença em negros africanos puros⁷² e, em pardos, esta análise não foi descrita⁹⁹.

As demais características, como sexo e idade, foram semelhantes ao perfil descrito em outros estudos, acometendo mais homens que mulheres, em nossa casuística, em uma relação de 2,4:1 e com manifestação predominante na quinta década de vida (tabela 9)¹⁰⁰. As hipóteses estudadas para esse padrão de expressão clínica foram a existência de diferenças nas correntes iônicas entre os sexos, e o papel dos hormônios sexuais, crescente após a puberdade e decrescente em idosos^{101, 102}. Em um modelo canino, a amplitude da fase 1 do potencial de ação do epicárdio do ventrículo direito foi menor no sexo masculino e a densidade da corrente Ito foi maior, determinando uma deflexão proeminente na fase 1 do potencial de ação, o que poderia conferir maior risco de arritmias fatais. Da mesma forma, a presença das alterações do ECG nas derivações precordiais direitas, mas não à esquerda, pode ser explicada pela maior expressão de Ito no epicárdio do ventrículo direito que no ventrículo esquerdo¹⁰³.

Quanto ao papel da influência hormonal, alguns dados experimentais apontam que os hormônios poderiam modificar a membrana dos canais iônicos e que os níveis de testosterona são maiores em pacientes com SBr¹⁰⁴. O estrogênio poderia inibir a expressão e o fluxo da corrente Ito¹⁰⁵ ao passo que a testosterona aumentaria a corrente lenta de potássio (IKs)¹⁰⁶. Ainda sob esta ótica de raciocínio, foi demonstrado que homens castrados normalizam o ECG e que o fenótipo possui pouca expressividade na população infantil.¹⁰⁷ Na população pediátrica não há diferença na apresentação clínica entre meninos e meninas¹⁰⁸. Em nosso registro, apenas um paciente foi diagnosticado antes da puberdade, sendo o mesmo portador de uma mutação composta, o que poderia explicar um fenótipo mais complexo¹⁰⁹.

Do ponto de vista genético, menos de 30% dos pacientes com diagnóstico clínico de SBr apresentam mutações identificadas, sendo a maioria das localizada no *SCN5A*¹¹⁰. Se por um lado vivenciamos a descoberta de novos genes, por outro, algumas variantes patogênicas reportadas no início do século, à luz do conhecimento atual, foram reclassificadas como de significado incerto ou até benigno⁴⁰. Ainda assim, utilizando os critérios mais rigorosos do ACMG, foi possível identificar, em nossa casuística, variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas em 20,6% dos probandos, todas no gene *SCN5A*.

Apesar das recentes descobertas, o *SCN5A* ainda é o principal gene associado à SBr e, em nosso estudo, não encontramos variantes causais nos “*minor genes*”¹¹¹. Um paciente com SBr apresentou uma variante classe 3 em *SCN1B*, entretanto o valor das mutações nesse gene é ainda controversa na literatura¹¹².

Dessa maneira, diferente da SQT, na SBr a expectativa atual de identificação do genótipo ainda é baixa. Há especulações de que os avanços na patogênese da SBr possam ser alcançados a partir da investigação de vias poligênicas, ou ainda na integração com as outras ômicas¹¹³.

Em nosso estudo demonstramos que os pacientes com variantes no gene *SCN5A* tiveram um intervalo HV prolongado; o intervalo PR e a duração do QRS também tenderam a ser maiores, mas não foram estatisticamente significativos.⁶⁹ De modo diverso da SQT, a SBr não apresenta uma relação genótipo-fenótipo bem estabelecida. Na maioria dos estudos, a presença de uma variante em *SCN5A* não sugere um fenótipo específico e não aumenta o risco de arritmias potencialmente fatais^{97,114}. Quanto aos critérios eletrocardiográficos, Yamagata et al¹¹⁵, relataram maior duração da onda P, do QRS e do intervalo QT em portadores de mutação no *SCN5A*, ao passo que Smits et al¹¹⁶, acrescentaram a informação de que esses portadores também poderiam apresentar maior intervalo HV¹¹⁶.

Outros aspectos importantes, a serem descritos, foram a maior ocorrência do sinal aVR, da onda S em D1 e a presença de f-QRS nos portadores de variantes classe 4 ou 5 no gene *SCN5A*. Esses dados eletrocardiográficos podem ser resultado do atraso na condução do estímulo elétrico na parede anterior do ventrículo direito¹¹⁶. Já foi demonstrado, em modelos computacionais que simularam a diminuição da corrente de sódio, que a perda de função desses canais aparenta resultar em uma condução lentificada, podendo explicar a maior prevalência desses achados eletrocardiográficos de lentificação do estímulo em portadores de mutações no gene *SCN5A*¹¹⁷. Em um outro estudo, utilizando parâmetros ecocardiográficos, foi observado um atraso eletromecânico mais pronunciado na via de saída de ventrículo direito de pacientes com SBr, portadores de variantes no gene *SCN5A*¹¹⁸.

Na literatura, apesar de bem estudada a associação de doença do sistema de condução e variantes em *SCN5A*, não identificamos estudos de associação dos sinais eletrocardiográficos nas derivações aVR e D1 e a presença de f-QRS com essas variantes, com exceção do estudo de Matsumura et al. Esses autores associaram a presença do sinal aVR à maior prevalência do polimorfismo H558R no *SCN5A*¹¹⁹. No entanto, confrontando diferentes estudos, o sinal de aVR esteve associado com pacientes de mais alto risco, sendo que o polimorfismo H558R foi relacionado a um melhor prognóstico^{59, 120}.

Por fim, outros parâmetros obtidos no EEF, como o PRVe e a indutibilidade de TV/FV não se mostraram diferentes entre carreadores de variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas no gene *SCN5A*, à semelhança do que foi observado por outros autores. No próprio estudo de Yamagata et al, houve ainda uma tendência para uma menor taxa de indutibilidade no grupo *SCN5A* (+) (45% versus 58%, P = 0,081).¹¹⁵

Nossas observações com perfil amostral de pacientes brasileiros com SBr são importantes para melhor entender e comparar as similitudes e diferenças entre os principais registros mundiais, bem como procuram ampliar novas perspectivas nesta fascinante área do conhecimento da interação genótipo-fenótipo das canalopatias cardíacas.

Classificação de Variantes

A tecnologia NGS foi realizada em 139 probandos, com prevalência esperada de variantes em genes clássicos nas doenças estudadas (67,5% em SQTL, 20,6% em SBr)^{38,121}. Atualmente, o NGS com painéis amplos, assim como o utilizado em nosso estudo, contendo 100 genes relacionados às arritmias cardíacas, poderia ser importante na descobertas de novos genes causais no estudo das canalopatias^{47,122}.

Além de detectar variantes nos genes clássicos de suscetibilidade para a SQTL, como *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A* e *KCNJ2*, e para SBr no *SCN5A*, nosso estudo, utilizando o filtro de MAF menor que 0,1%, apresentou poucas

variantes em “*minor genes*”. Em pacientes com SQTLE encontramos variantes nos genes *KCNE1*, *KCNE2* em um mesmo indivíduo e *AKAP9* em um outro paciente portador de uma variante patogênica em *KCNH2*. Apenas um paciente com SBr apresentou variante genética não-*SCN5A* e isso ocorreu no gene *SCN1B*. Em recente publicação, Gray et al encontraram uma falta de concordância genótipo-fenótipo entre as famílias com *SCN1B*, além de alta frequência dessas variantes no gnomAD, sugerindo que o *SCN1B* possa não ser um gene causal na SBr na forma de herança monogênica¹¹².

A literatura reporta um achado de até 5% de “*minor genes*” na SQTLE e na SBr, entretanto não há detalhes sobre a comprovação de patogenicidade dessas variantes^{14, 41}. Em geral são variantes consideradas como VUS, devido à falta de estudos funcionais, às dificuldades enfrentadas para uma robusta análise genótipo-fenótipo nos pacientes e seus familiares⁷, bem como à comunicação subaproveitada entre os laboratórios de análise genética mundiais¹²³. Os autores, que descreveram há dez anos esses genes como relacionados às doenças arrítmicas, são os mesmos que questionam se de fato haveria correlação genótipo-fenótipo nos “*minor genes*”, utilizando os critérios atuais de classificação de variantes, que são considerados menos sujeitos às falhas de interpretação¹⁵. Os “*minor genes*” em nosso estudo foram também classificados como VUS, justamente pela falta de suporte na literatura para sua compreensão adequada, pelo alto custo de explorar essas variantes em estudos funcionais e, por fim, por essas alterações terem sido encontradas em famílias com poucos pacientes acometidos, para uma análise adequada de co-segregação.

A evolução do conhecimento atual questiona também a patogenicidade de variantes em sítios canônicos, antigamente assumidas como deletérias e que podem ser tolerantes à variação genética não-sinônima^{124 125, 126}. Por esse motivo, pelos critérios do ACMG, a presença de um critério muito forte de patogenicidade, como variantes em sítios canônicos, não é suficiente para classificar a variante como patogênica ou possivelmente patogênica⁵⁰. Em nossa casuística, encontramos esse tipo de variante sempre como patogênica pela coexistência de outros fatores que corroboraram para a classificação.

De modo peculiar e desafiador, esta quantidade de variantes genéticas raras não-sinônimas encontradas dificulta a interpretação das variantes de uma forma geral. Uma das principais conclusões de estudos com NGS, como o *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*, catálogo de variantes genéticas em regiões codificadoras de proteínas do genoma humano, refere-se ao fato de que muitas mutações genéticas foram erroneamente classificadas como prejudiciais no passado. A análise de indivíduos de diferentes etnias com inúmeras variantes trouxe à luz de que um, em cada oito pares de bases codificadoras de proteínas, hospeda uma variante genética¹²⁶.

As informações adicionais adquiridas pelo uso do NGS têm potencial de gerar hipóteses, se exploradas em estudos funcionais ou ainda, de menor custo e complexidade, se associadas às informações de bancos públicos (ex. Clinvar), elaborados por outros laboratórios com *expertise* em cardiologia molecular. A publicação desses dados pode ser de grande valia por se tratar de uma tecnologia de início recente e em franco crescimento¹²³.

Há apenas 4 anos foi publicado o consenso do ACMG para padronizar a interpretação dos testes genéticos e, desde então, adotamos a classificação em nossa prática clínica. As diretrizes forneceram uma estrutura rigorosa para a interpretação dos critérios, tentando reduzir as diferenças na interpretação de variantes entre os laboratórios, já que conseguir isso seria mais difícil se cada laboratório tivesse de um método independente para avaliação de variantes.

Entretanto, Amendola et al, mostraram que um ano após a publicação das diretrizes, havia importantes diferenças nas análises intra e inter-laboratoriais. O uso do consenso levou a uma diminuição na discordância na classificação das variantes de 66% para 29%, das 99 variantes analisadas. Os autores observaram uso impreciso de alguns critérios e reconheceram que há áreas onde o julgamento de especialistas e uma orientação de diretriz específica para a doença analisada seriam necessários. Por ter sido a primeira vez que a diretriz estava sendo utilizada e, ao mesmo tempo avaliada, a curva de aprendizado pode ter influenciado nas discrepâncias observadas¹²⁷. A rotina da interpretação das variantes em nosso trabalho nos mostrou que há ainda subjetividade em sua avaliação, e este fato nos levou a um programa de

envolvimento de participação de uma equipe multidisciplinar em todos os casos, para incrementar o rigor crítico na escolha dos critérios.

Para filtrar as variantes, a escolha da MAF menor que 0,1 % foi baseada na prevalência das doenças SQTL e SBr, em torno de 0,005%. Nos casos em que o MAF era maior que a prevalência da doença, o critério seria mais forte para benignidade, o que pode tornar a variante potencialmente não causal.

A escolha do gnomAD foi baseada no tamanho da amostra populacional e do ABraOM, por ser o único banco brasileiro e com indivíduos sexagenários. Quando se avalia uma população mais idosa, um maior espectro de doenças de penetrância idade-dependente pode ser atingido.

É importante considerar que o ACMG é utilizado para avaliação de variantes em todas as áreas que contemplam o diagnóstico molecular, entretanto as canalopatias possuem peculiaridades que podem interferir na sua interpretação, como a baixa penetrância e a expressividade variável. Isso confere dificuldade na escolha do MAF, já que os indivíduos teoricamente saudáveis desses bancos populacionais, podem ser carreadores silenciosos. Além disso, a expressão clínica variável, pode ser desafiadora nos estudos de associação genótipo-fenótipo⁷.

Os sites de predição *in silico* foram utilizados apenas como evidência complementar, conforme sugerido pelo ACMG, pois são sites algumas vezes discordantes e que isoladamente podem produzir conclusões errôneas em relação à patogenicidade^{84,128}. Nos nossos resultados, observamos que a maioria das variantes foram classificadas como deletérias pelos sites de predição, entretanto nem sempre foram classificadas pelo ACMG como patogênicas ou potencialmente patogênicas¹²⁹.

Os estudos funcionais publicados foram meticulosamente avaliados e discutidos em reunião multidisciplinar, por se tratar de forte evidência de patogenicidade. A ferramenta *online* do site da Universidade de Maryland facilitou o complexo manejo da junção dos critérios para a classificação final das variantes.

Existem critérios do ACMG de difícil utilização em cardiologia, como *odds ratio*, quando não há população controle disponível (evidência ps4), podendo levar a uma classificação subestimada das variantes.

Os estudos de co-segregação familiar auxiliaram a classificação das variantes em 10% dos casos, aumentando o grau de patogenicidade das mesmas. Riuró et al relataram que a co-segregação familiar foi determinante em aproximadamente 12% das variantes do grupo⁸⁴. Embora não haja consenso no melhor método para interpretar uma co-segregação, utilizamos o descrito por Jarvik et al, baseada na contagem alélica e na variância bayesiana, evitando a interpretação subjetiva⁷¹.

Devido à raridade da maioria das variantes causadoras da doença monogênica, o compartilhamento de dados de associação genótipo-fenótipo entre laboratórios clínicos e pesquisadores é essencial para o avanço da medicina genômica, sendo amplamente encorajado. A prática tem sido endossada por sociedades profissionais e agências de financiamento (*American Medical Association 2013; National Institutes of Health – NIH 2014; National Society of Genetic Counselors 2015; ACMG Board of Directors 2017*)¹²³.

Um dos objetivos do *Clinical Genome Resource* (ClinGen), financiado pelo NIH, foi criar uma base pública de genes e variantes clinicamente relevantes e depositá-los no ClinVar, banco utilizado em nossa pesquisa para verificar se as variantes encontradas em nossos pacientes já haviam sido reportadas e como outros laboratórios classificaram-nas¹³⁰. Contudo, a inconsistência nos critérios de diferentes laboratórios utilizados para avaliar a patogenicidade é ainda identificada como obstáculo à medicina genômica⁸⁴.

Dessa maneira, nossos dados em canalopatias, todos revistos a luz do ACMG vigente, devem ser compartilhados pela potencial utilidade em pesquisas internacionais e para melhorar a compreensão de como os painéis multigênicos e na contribuição para o entendimento fisiopatológico das canalopatias cardíacas.

Limitações do estudo

Nossos resultados refletem uma coorte de um registro unicêntrico terciário e especializado, com grupos étnicos heterogêneos, de uma população brasileira de raça mista. O pequeno tamanho da amostra e uma baixa taxa de EAPF são limitações importantes para que sejam obtidas conclusões robustas de associação genótipo-fenótipo na síndrome do QT longo e na síndrome de Brugada.

Parte da coorte tem perfil retrospectivo e parte prospectivo, pois alguns pacientes já vinham sendo acompanhados e não podemos excluir doentes em doenças raras.

6 Conclusões

- Foi possível a identificação do perfil mutacional em 46% dos pacientes com SQTl e SBr em nossa casuística, sendo mais frequente a identificação em pacientes com SQTl (67%) do que em pacientes com SBr (20%). Apesar de um painel contemplando os *minor genes*, identificamos apenas variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas em genes clássicos.
- Entre os pacientes com SQTl e genótipo identificado, observamos que os pacientes com SQTl7 apresentaram menor QTc e, conseqüentemente, menor escore de Schwartz. O padrão de *notch* foi mais prevalente em pacientes com SQTl2. Não foram observadas características exclusivas a um genótipo.
- Entre os pacientes com SBr, a presença dos sinais de AVR e de D1, bem como o intervalo His-ventrículo aumentado, estiveram associados aos pacientes com variante *SCN5A* presente.
- A utilização dos critérios do ACMG permitiu uma análise sistemática das variantes nos genes principais. O compartilhamento desses dados pode contribuir para os reservatórios mundiais de variantes pela potencial utilidade em pesquisas internacionais.

Tabela 1: Escore de probabilidade diagnóstica de Schwartz²².

Eletrcardiograma	Pontuação
QTc \geq 480ms	3
QTc 460-479ms	2
QTc 450-459ms	1
QTc 4 ^o minuto da recuperação \geq 480ms*	1
Torsade de pointes	2
Alternância onda T	1
Entalhe de onda T**	1
FC baixa para idade***	0,5
História Clínica	
Síncope com estresse	2
Síncope sem estresse	1
Surdez congênita	0,5
Antecedentes familiares	
Diagnóstico confirmado de SQTL	1
Morte súbita inexplicada em < 30 anos	0,5

Intervalo QTc calculado pela fórmula de Bazett, * No teste ergométrico. ** Em pelo menos 3 derivações. *** Considerada quando a FC for abaixo do 2^o percentil para idade. Adaptado de Schwartz P.J²².

Tabela 3A: Critérios para classificação de variantes.⁵⁰

Patogenicidade	Categoria	Descrição
Muito elevada PVS1 (<i>very strong</i>)	PVS1	Variante nula (nonsense, frameshift, canonical \pm 1 ou 2 sítios de <i>splice</i> , início de códon, deleção uni ou multiexon quando o mecanismo é a perda de função dos canais.
Elevada PS (<i>strong</i>)	PS1	Troca proteica já descrita como patogênica, porém com diferentes trocas de nucleotídeo.
	PS2	Mutação De novo com paternidade e maternidade confirmadas, na ausência de antecedentes familiares com suspeita da doença.
	PS3	Comprovação de patogenicidade por estudos funcionais.
	PS4	A prevalência da variante em indivíduos com a doença é significativamente maior que a prevalência em controles.
Moderada PM (<i>moderate</i>)	PM1	Topografia <i>hot spot</i> ou em domínio funcional bem estabelecido, sem variantes benignas.
	PM2	Ausência em controles (ou muito rara para doenças recessivas).
	PM3	Variantes patogênicas detectadas em <i>trans</i> .
	PM4	Mudança no tamanho da proteína por deleções ou inserções <i>in frame</i> em região não repetitiva ou variante <i>stop-loss</i> .
	PM5	Nova troca proteica, onde uma troca por outra base já foi descrita como patogênica.
	PM6	Mutação De novo sem paternidade e maternidade confirmadas, na ausência de antecedentes familiares com suspeita da doença.
Complementar PP (<i>supporting</i>)	PP1	Cosegregação genótipo-fenótipo positiva.*
	PP2	Variante <i>missense</i> em um gene com baixa taxa de variantes missenses benignas, quando essas são mecanismo conhecido da doença.
	PP3	Evidências computacionais de diferentes bases suportam o efeito deletério da troca proteica.
	PP4	O fenótipo e a história familiar são típicos de doenças monogênicas.
	PP5	Variantes relatadas na literatura como patogênicas.

A co-segregação (*) pode ter evidência de complementar a elevada, a depender da correlação genótipo-fenótipo alcançada nos familiares⁷¹.

Tabela 3B: Classificação das variantes⁶⁸

Patogênicas	1 PVS + 1 PS
(Classe 5)	1 PVS + 2 PM
	1 PVS + 1 PM + 1 PP
	1 PVS + 2 PP
	2 PS
	1 PS + 3 PM
	1 PS + 2 PM + 2 PP
	1 PS + 1 PM + 4 PP
Possivelmente Patogênicas	1 PVS + 1 PM
(Classe 4)	1 PS + 1 PM
	1 PS + 2 PP
	3 PM
	2 PM + 2 PP
	1 PM + 4 PP
Variantes de Significado Incerto (<i>Variante of uncertain significance - VUS</i>)	Quando não completa critérios para classe 4 ou 5.
(Classe 3)	

P: patogenicidade; VS: *very strong* (muito forte); S: *strong* (forte), M: *moderate* (moderada); P: *supporting* (complementar). Os números indicam quantos de cada critério é necessário completar.

Tabela 5: Detalhamento das variantes em portadores de SQT

Gene	Nº carreadores	Variantes Compostas	NM/ Códon	AA	Domínio	dbSNP	Gnomad Nº alelos	Abraom Nº alelos	Clinvar	In Silico	ACMG classe
KCNQ1	1		NM_000218.2:c.477+2T>C	NA	Donor site	ND	0	0	ND	NA	5
KCNQ1	1		NM_000218:c.569G>A	p.Arg190Gln	C-loop	rs120074178	1	0	5	D	5
KCNQ1	1		NM_000218:c.613G>A	p.Val205Met	Hélice S3	rs151344631	3	0	5	D	5
KCNQ1	1	(5)	NM_000218:c.650C>G	p.Ser217Cys	C-loop	ND	0	0	ND	D	3
KCNQ1	2		NM_000218:c.772C>A	p.His258Asn	C-loop	rs199472717	1	0	?	D	4
KCNQ1	1	(1)	NM_000218:c.898G>A	p.Ala300Thr	Hélice poro	rs120074187	12	0	?	D	3
KCNQ1	12		NM_000218:c.922-1G>C	NA	Donor site	rs397508130	0	0	5	NA	5
KCNQ1	1		NM_000218:c.1022C>T	p.Ala341Val	TM S6	rs12720459	0	0	5	D	5
KCNQ1	2		c.1032G>A	p.Ala344Ala	Donor site	rs1800171	1	0	5	NA	5
KCNQ1	8		NM_000218:c.1115C>A	p.Ala372Asp	Ter-C	rs199473472	0	0	?	D	5
KCNQ1	1 hm		NM_000218:c.1192A>T	p.Lys398*	Ter-C	ND	0	0	ND	NA	5
KCNH2	4		NM_000238:c.155G>A	p.Cys52Tyr	Ter-N	ND	0	0	ND	D	4
KCNH2	1	(2)	NM_000238:c.269A>G	p.Glu90Gly	Ter-N	ND	0	0	ND	D	3
KCNH2	3 &		NM_000238:c.400G>T	p.Glu134*	Ter-N	ND	0	0	ND	NA	5
KCNH2	2		NM_000238:c.453_454insC	p.Thr152fs	Ter-N	rs761863251	0	0	ND	NA	5
KCNH2	2	(1)	NM_000238:c.453delC	p.Thr152fs	Ter-N	rs761863251	0	0	ND	NA	5
KCNH2	1		NM_000238:c.709 C>T	p.Arg273*	Ter-N	ND	0	0	ND	NA	5
KCNH2	2		NM_000238:c.961delG	p.Asp321fs	Ter-N	ND	0	0	ND	NA	5
KCNH2	2 &		NM_000238:c.1681G>A	p.Ala561Thr	S5 poro	rs199472921	0	0	5	D	5
KCNH2	2 &	(3)	NM_000238:c.1682C>T	p.Ala561Val	S5 poro	rs199472921	0	0	4/5	D	5
KCNH2	2		NM_000238:c.1685A>G	p.His562Arg	S5 poro	rs199472922	0	0	3	D	4
KCNH2	1	(3)	NM_000238:c.1741T>A	p.Ser581Thr	S5 poro	ND	0	0	ND	D	4
KCNH2	1		NM_000238:c.1750G>A	p.Gly584Ser	S5 poro	rs199473428	2	0	4/5	D	4
KCNH2	7 &		NM_000238:c.1801G>T	p.Gly601Cys	S5 poro	rs199472936	0	0	?	D	5
KCNH2	1		NM_000238:c.1810G>A	p.Gly604Ser	S5 poro	rs199473522	0	0	5	D	5
KCNH2	4&	(4)	NM_000238:c.1838C>T	p.Thr613Met	poro	rs199473524	0	0	5	D	5
KCNH2	5&		NM_000238:c.1841C>T	p.Ala614Val	poro	rs199472944	0	0	5	D	5
KCNH2	1		NM_000238:c.1847A>G	p.Tyr616Cys	poro	rs199472946	0	0	4/5	D	4
KCNH2	2		NM_000238:c.1886A>G	p.Asn629Ser	poro	rs199472957	0	0	5	D	5

<i>KCNH2</i>	3		NM_000238.3; c.2230 C>T	p. Arg744*	Ter-C	rs189014161	0	0	5	D	5
<i>KCNH2</i>	3	(2)	NM_000238:c.2254C>T	p.Arg752Trp	Ter-C	rs199472990	2	0	4/5	D	5
<i>KCNH2</i>	2&	(5)	NM_000238:c.2371C>T	p.Arg791Trp	Ter-C	rs138498207	25	1	?	D	3
<i>KCNH2</i>	3		NM_000238:c.2587C>T	p.Arg863*	Ter-C	ND	2	0	5	NA	5
<i>KCNH2</i>	3		NM_000238:c.2588G>A	p.Arg863Gln	Ter-C	ND	0	0	ND	D	3
<i>KCNH2</i>	1		NM_000238:c.2775delC	p.Gly925fs	Ter-N	ND	0	0	ND	NA	5
<i>KCNH2</i>	1		NM_000238.8:c.2931_2947dup	p.Ser981fs	Ter-C	ND	0	0	ND	NA	5
<i>SCN5A</i>	1	(4)	NM_198056:c.4786T>A	p.Phe1596Ile	Dom IV	rs199473278	30	0	?	D	3
<i>SCN5A</i>	2		NM_198056:c.4851_4852delCT	p.Ser1618fs	Dom IV	rs749697698	5	0	4/5	NA	5
<i>SCN5A</i>	1		NM_001099404:c.5287G>A	p.Val1763Met	Dom IV	rs199473631	0	0	4-5	D	5
<i>SCN5A</i>	5 &		NM_001099404:c.5350G>A	p.Glu1784Lys	Ter-C	rs137854601	1	0	4/5	D	5
<i>SCN5A</i>	1		NM_001099404:c.5689C>T	p.Arg1897Trp	Ter-C	rs45465995	23	1	?	D	4
<i>KCNJ2</i>	1		NM_000891:c.C13T	p.Arg5*	Ter-N	rs1042485	1	0	ND	D	5
<i>KCNJ2</i>	2		NM_000891:c.434A>G	p.Tyr145Cys	Poro	ND	0	0	ND	D	5
<i>KCNJ2</i>	3		NM_000891:c T>TCATTGG	p.Ile176_Gly177insGlyLe	Poro	ND	0	0	ND	D	4
<i>KCNJ2</i>	6		NM_000891:c.650T>C	p.Leu217Pro	Ter-C	rs199473656	0	0	?	D	5
<i>KCNJ2</i>	2		NM_000891:c.652C>T	p.Arg218Trp	Ter-C	rs104894578	0	0	5	D	5
<i>KCNJ2</i>	2		NM_000891:c.935G>A	p.Arg312His	Ter-C	rs786205820	0	0	?	D	4
<i>KCNE1</i>	1	(6)	NM_000219:c.208A>G	p.Lys70Glu		ND	0	0	ND	D	3
<i>KCNE2</i>	1	(6)	NM_172201:c.46C>T	p.Arg16*		ND	6	0	ND	NA	3
<i>AKAP9</i>	1		NM_005751:c.3394C>T	p.Arg1132Cys		ND	0	0	ND	D	3

3: variante classe 3 ou *VUS*; 4: variante classe 4 ou possivelmente patogênica; 5: variante classe 5 ou patogênica. ? dados conflitantes ou sem classificação, pelo clinvar; ND: não disponível; NA: não se aplica; Ter - N ou C: terminais N ou C; Dom : Domínio. Hm: Homozigoto.

Carreadores: pacientes com genótipo positivo.

& pacientes em pelo menos 2 famílias, sem relação consanguínea.

D: predição in silico deletéria (pelo menos em dois de três algoritmos distintos).

(1) probando #367, variante *KCNH2* p.Thr613Met, em conjunto com *KCNQ1* p.Ala300Thr

(2) probando #327, variante *KCNH2* p.Arg752Trp, em conjunto com *KCNH2* p.Glu90Gly

(3) probando #260, variante *KCNH2* p.Ser581Thr, em conjunto com *KCNH2* p.Ser581Thr

(4) probando #75, variante *KCNH2* p.Thr613Met, em conjunto com *SCN5A* p.Phe1596Ile

(5) probando #46, variante *KCNQ1* p.Ser217Cys, em conjunto com *KCNH2* p.Arg791Trp

(6) probando #5367, variante *KCNE1*, p.Lys70Glu, em conjunto com *KCNE2* p.Arg16*

Tabela 6: Detalhamento das variantes em portadores de SBr

Gene	Nº acometidos	NM/ Códon	AA	Local	dbSNP	Gnomad	Abraom	Nº - Classe	In Silico	ACMG
						Nº alelos	Nº alelos	Clinvar		
SCN5A	1	NM_001099404.1: c.1140+2T>C	NA	Dom I S5/6	ND	0	0	ND	NA	5
SCN5A	8 & (1)	NM_001099404: c.1198G>A	p.Gly400Arg	Dom I S5/6	na	0	0	ND	D	5
SCN5A	1	NM_001099404:c.2254G>A	p.Gly752Arg	Dom II S1-s4/5	rs199473153	1	0	4/5	D	5
SCN5A	1	NM_001099404:c.2701G>A	p.Glu901Lys	Dom II-S5/S6	rs199473174	0	0	?	D	4
SCN5A	1	NM_001099404:c.3027 C>A	p.Tyr1009*	IDL II-III	ND	0	0	ND	NA	5
SCN5A	2 &	NM_001099404:c.3383G>A	p.Cys1128Tyr	IDL II-III	ND	0	0	ND	N	3
SCN5A	4 &	NM_198056:c.3673G>A	p.Glu1225Lys	DIII S1-S4/5	rs199473204	1	0	?	D	4
SCN5A	1	NM_198056:c.5445_5446insT	p.Leu1277Pro	DIII S1-S4/5	ND	0	0	ND	D	4
SCN5A	1	NM_001099404.1:c.3922C>T	Leu1308Phe	DIII S1-s4/5	rs41313031	131	1	?	D	3
SCN5A	1	NM_198056:c.4132G>A	p.Val1378Met	DIII S5/6	rs748312802	1	0	4	D	3
SCN5A	2 (1)	NM_001099404: c.4382 C>G	p.Tyr1461Ser	DIII S5/6	ND	0	0	ND	D	4
SCN5A	1	NM_001099404: c.4534 C>T	p.Arg1512Trp	IDL III-IV	rs137854602	14	0	?	D	3
SCN5A	1	NM_001099404:c.4885C>T	p.Arg1629*	DIV S1-s4/5	rs199473284	2	0	5	NA	5
SCN5A	1	NM_198056:c.5007C>A	p.Phe1669Leu	DIV S5/6	rs866160560	0	0	ND	D	4
SCN5A	1	NM_198056:c.5102T>G	p.Met1701Arg	DIV S5/S6	rs769843988	2	0	?	D	3
SCN5A	1	NM_001099404:c.5350G>A	p.Glu1784Lys	Ter-C	rs137854601	1	0	4/5	D	5
SCN5A	1	NM_198056:c.5445_5446insT	p.Asp1816fs	Ter-C	ND	0	0	ND	D	5
SCN5A	1	NM_198056:c.5477G>A	p.Arg1826His	Ter-C	rs137854610	13	0	?	D	3
SCN1B	1	NM_001321605:c.524A>T	p.Lys175Ile		rs780958012	6	0	?	D	3

3: variante classe 3 ou VUS; 4: variante classe 4 ou possivelmente patogênica; 5: variante classe 5 ou patogênica. ND: não disponível. NA: não se aplica, Ter-C: terminal C, Dom : Domínio, IDL: inter-domain linker.

Acometidos: número de pacientes com fenótipo e genótipo positivos.

& pacientes em pelo menos 2 famílias, sem relação consanguínea.

D: predição *in silico* deletéria (pelo menos em dois de três algoritmos distintos), N: predição neutra.

(1) o paciente (#5115) tem variante composta no SCN5A (p.Gly400Arg/ p.T1461S)¹⁰⁹.

8 Referências

1. Bagnall RD, Weintraub RG, Ingles J, Duflou J, Yeates L, Lam L, Davis AM, Thompson T, Connell V, Wallace J, Naylor C, Crawford J, Love DR, Hallam L, White J, Lawrence C, Lynch M, Morgan N, James P, du Sart D, Puranik R, Langlois N, Vohra J, Winship I, Atherton J, McGaughran J, Skinner JR and Semsarian C. A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults. *N Engl J Med*. 2016;374:2441-52.
2. Skinner JR, Winbo A, Abrams D, Vohra J and Wilde AA. Channelopathies That Lead to Sudden Cardiac Death: Clinical and Genetic Aspects. *Heart Lung Circ*. 2019;28:22-30.
3. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G, Gabbarini F, Goulene K, Insolia R, Mannarino S, Mosca F, Nespoli L, Rimini A, Rosati E, Salice P and Spazzolini C. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2009;120:1761-7.
4. Vutthikraivit W, Rattanawong P, Putthapiban P, Sukhumthamarat W, Vathesatogkit P, Ngarmukos T and Thakkinstian A. Worldwide Prevalence of Brugada Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acta Cardiol Sin*. 2018;34:267-277.
5. IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 02/06/2019. 2019.
6. Etheridge SP, Asaki SY and Niu MC. A personalized approach to long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2019;34:46-56.
7. Coll M, Pérez-Serra A, Mates J, Del Olmo B, Puigmulé M, Fernandez-Falgueras A, Iglesias A, Picó F, Lopez L, Brugada R and Campuzano O. Incomplete Penetrance and Variable Expressivity: Hallmarks in Channelopathies Associated with Sudden Cardiac Death. *Biology (Basel)*. 2017;7.
8. Svendsen JH, Geelen P and Committee ESI. Screening for, and management of, possible arrhythmogenic syndromes (channelopathies/ion channel diseases). *Europace*. 2010;12:741-2.
9. Wikipedia Wc. Friedrich Ludwig Meissner. <https://en.wikipedia.org/wiki/>. 2017.
10. JERVELL A and LANGE-NIELSEN F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J*. 1957;54:59-68.
11. ROMANO C, GEMME G and PONGIGLIONE R. [RARE CARDIAC ARRYTHMIAS OF THE PEDIATRIC AGE. II. SYNCOPAL ATTACKS DUE TO PAROXYSMAL VENTRICULAR FIBRILLATION. (PRESENTATION OF 1ST CASE IN ITALIAN PEDIATRIC LITERATURE)]. *Clin Pediatr (Bologna)*. 1963;45:656-83.
12. Keating M, Atkinson D, Dunn C, Timothy K, Vincent GM and Leppert M. Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science*. 1991;252:704-6.
13. Bohnen MS, Peng G, Robey SH, Terrenoire C, Iyer V, Sampson KJ and Kass RS. Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiol Rev*. 2017;97:89-134.
14. Giudicessi JR, Wilde AAM and Ackerman MJ. The genetic architecture of long QT syndrome: A critical reappraisal. *Trends Cardiovasc Med*. 2018;28:453-464.
15. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P and Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;103:89-95.
16. Giudicessi JR and Ackerman MJ. Genotype- and phenotype-guided management of congenital long QT syndrome. *Curr Probl Cardiol*. 2013;38:417-55.

17. Tester DJ, Will ML, Haglund CM and Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005;2:507-17.
18. Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, Bottelli G, Cerrone M and Leonardi S. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA*. 2005;294:2975-80.
19. Altmann HM, Tester DJ, Will ML, Middha S, Evans JM, Eckloff BW and Ackerman MJ. Homozygous/Compound Heterozygous Triadin Mutations Associated With Autosomal-Recessive Long-QT Syndrome and Pediatric Sudden Cardiac Arrest: Elucidation of the Triadin Knockout Syndrome. *Circulation*. 2015;131:2051-60.
20. Nguyen HL, Pieper GH and Wilders R. Andersen-Tawil syndrome: clinical and molecular aspects. *Int J Cardiol*. 2013;170:1-16.
21. Walsh MA, Turner C, Timothy KW, Seller N, Hares DL, James AF, Hancox JC, Uzun O, Boyce D, Stuart AG, Brennan P, Sarton C, McGuire K, Newbury-Ecob RA and McLeod K. A multicentre study of patients with Timothy syndrome. *Europace*. 2018;20:377-385.
22. Schwartz PJ, Crotti L and Insolia R. Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:868-77.
23. Hofman N, Wilde AA, Kääb S, van Langen IM, Tanck MW, Mannens MM, Hinterseer M, Beckmann BM and Tan HL. Diagnostic criteria for congenital long QT syndrome in the era of molecular genetics: do we need a scoring system? *Eur Heart J*. 2007;28:575-80.
24. Priori SG and Blomström-Lundqvist C. 2015 European Society of Cardiology Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death summarized by co-chairs. *Eur Heart J*. 2015;36:2757-9.
25. Martini B, Nava A, Thiene G, Buja GF, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L and Dalla Volta S. Ventricular fibrillation without apparent heart disease: description of six cases. *Am Heart J*. 1989;118:1203-9.
26. Brugada P and 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;20:1391-6.
27. Bayés de Luna A, Brugada J, Baranchuk A, Borggrefe M, Breithardt G, Goldwasser D, Lambiase P, Riera AP, Garcia-Niebla J, Pastore C, Oreto G, McKenna W, Zareba W, Brugada R and Brugada P. Current electrocardiographic criteria for diagnosis of Brugada pattern: a consensus report. *J Electrocardiol*. 2012;45:433-42.
28. Curcio A, Mazzanti A, Bloise R, Monteforte N, Indolfi C, Priori SG and Napolitano C. Clinical Presentation and Outcome of Brugada Syndrome Diagnosed With the New 2013 Criteria. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2016;27:937-43.
29. Obeyesekere MN, Klein GJ, Modi S, Leong-Sit P, Gula LJ, Yee R, Skanes AC and Krahn AD. How to perform and interpret provocative testing for the diagnosis of Brugada syndrome, long-QT syndrome, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:958-64.
30. Pospiech T, Jaussaud J, Sacher F, Hooks DA, Haïssaguerre M and Douard H. Characterization of repolarization in Brugada syndrome patients during exercise testing: Dynamic angle evaluation. *J Electrocardiol*. 2015;48:879-86.
31. Gray B, Kirby A, Kabunga P, Freedman SB, Yeates L, Kanthan A, Medi C, Keech A, Semsarian C and Sy RW. Twelve-lead ambulatory electrocardiographic monitoring in Brugada syndrome: Potential diagnostic and prognostic implications. *Heart Rhythm*. 2017;14:866-874.
32. Nademanee K and Wilde AAM. Repolarization Versus Depolarization Defects in Brugada Syndrome: A Tale of 2 Different Electrophysiologic Settings? *JACC Clin Electrophysiol*. 2017;3:364-366.

33. Priori SG and Napolitano C. J-Wave Syndromes: Electrocardiographic and Clinical Aspects. *Card Electrophysiol Clin*. 2018;10:355-369.
34. Nademanee K, Raju H, de Noronha SV, Papadakis M, Robinson L, Rothery S, Makita N, Kowase S, Boonmee N, Vitayakritsirikul V, Ratanarapee S, Sharma S, van der Wal AC, Christiansen M, Tan HL, Wilde AA, Nogami A, Sheppard MN, Veerakul G and Behr ER. Fibrosis, Connexin-43, and Conduction Abnormalities in the Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:1976-1986.
35. Brugada J, Pappone C, Berruezo A, Vicedomini G, Manguso F, Ciconte G, Giannelli L and Santinelli V. Brugada Syndrome Phenotype Elimination by Epicardial Substrate Ablation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:1373-81.
36. 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 and Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 1998;392:293-6.
37. Lieve KV and Wilde AA. Inherited ion channel diseases: a brief review. *Europace*. 2015;17 Suppl 2:ii1-6.
38. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, Brugada P, Fressart V, Guerchicoff A, Harris-Kerr C, Kamakura S, Kyndt F, Koopmann TT, Miyamoto Y, Pfeiffer R, Pollevick GD, Probst V, Zumhagen S, Vatta M, Towbin JA, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Antzelevitch C, Salisbury BA, Guicheney P, Wilde AA, Brugada R, Schott JJ and Ackerman MJ. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2010;7:33-46.
39. Sieira J, Dendramis G and Brugada P. Pathogenesis and management of Brugada syndrome. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:744-756.
40. Brugada J, Campuzano O, Arbelo E, Sarquella-Brugada G and Brugada R. Present Status of Brugada Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72:1046-1059.
41. Lubitz SA and Ellinor PT. Next-generation sequencing for the diagnosis of cardiac arrhythmia syndromes. *Heart Rhythm*. 2015;12:1062-70.
42. Girolami F, Frisso G, Benelli M, Crotti L, Iascone M, Mango R, Mazzaccara C, Pilichou K, Arbustini E, Tomberli B, Limongelli G, Basso C and Olivetto I. Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2018;19:1-11.
43. Tester DJ, Will ML and Ackerman MJ. Mutation detection in congenital long QT syndrome: cardiac channel gene screen using PCR, dHPLC, and direct DNA sequencing. *Methods Mol Med*. 2006;128:181-207.
44. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat*. 2009;30:857-9.
45. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Semsarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C, Zipes DP, (HRS) HRS and (EHRA) EHRA. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace*. 2011;13:1077-109.
46. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5463-7.
47. Kalayinia S, Goodarzynejad H, Maleki M and Mahdih N. Next generation sequencing applications for cardiovascular disease. *Ann Med*. 2018;50:91-109.
48. Marian AJ. The Bottleneck in Genetic Testing. *Circ Res*. 2015;117:586-8.
49. Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M and Sherry ST. dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:352-5.

50. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL and Committee ALQA. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405-24.
51. McVeigh TP, Kelly LJ, Whitmore E, Clark T, Mullaney B, Barton DE, Ward A and Lynch SA. Managing uncertainty in inherited cardiac pathologies-an international multidisciplinary survey. *Eur J Hum Genet*. 2019.
52. Hofman N, Tan HL, Alders M, van Langen IM and Wilde AA. Active cascade screening in primary inherited arrhythmia syndromes: does it lead to prophylactic treatment? *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2570-6.
53. Mazzanti A, Maragna R, Vacanti G, Monteforte N, Bloise R, Marino M, Braghieri L, Gambelli P, Memmi M, Pagan E, Morini M, Malovini A, Ortiz M, Sacilotto L, Bellazzi R, Monserrat L, Napolitano C, Bagnardi V and Priori SG. Interplay Between Genetic Substrate, QTc Duration, and Arrhythmia Risk in Patients With Long QT Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;71:1663-1671.
54. Goldenberg I, Horr S, Moss AJ, Lopes CM, Barsheshet A, McNitt S, Zareba W, Andrews ML, Robinson JL, Locati EH, Ackerman MJ, Benhorin J, Kaufman ES, Napolitano C, Platonov PG, Priori SG, Qi M, Schwartz PJ, Shimizu W, Towbin JA, Vincent GM, Wilde AA and Zhang L. Risk for life-threatening cardiac events in patients with genotype-confirmed long-QT syndrome and normal-range corrected QT intervals. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:51-9.
55. Adler A, Sadek MM, Chan AY, Dell E, Rutberg J, Davis D, Green MS, Spears DA and Gollob MH. Patient Outcomes From a Specialized Inherited Arrhythmia Clinic. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9:e003440.
56. Schwartz PJ, Dagradi F and Castelletti S. Evolution in Managing Long QT Syndrome: From Registries to Centers of Excellence. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:463-465.
57. Ohkubo K, Watanabe I, Okumura Y, Ashino S, Kofune M, Nagashima K, Kofune T, Nakai T, Kunimoto S, Kasamaki Y and Hirayama A. Prolonged QRS duration in lead V2 and risk of life-threatening ventricular Arrhythmia in patients with Brugada syndrome. *Int Heart J*. 2011;52:98-102.
58. Priori SG, Gasparini M, Napolitano C, Della Bella P, Ottonelli AG, Sassone B, Giordano U, Pappone C, Mascioli G, Rossetti G, De Nardis R and Colombo M. Risk stratification in Brugada syndrome: results of the PRELUDE (PRogrammed ELectrical stimUlation preDICTive valuE) registry. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:37-45.
59. Babai Bigi MA, Aslani A and Shahrzad S. aVR sign as a risk factor for life-threatening arrhythmic events in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2007;4:1009-12.
60. Rolf S, Bruns HJ, Wichter T, Kirchhof P, Ribbing M, Wasmer K, Paul M, Breithardt G, Haverkamp W and Eckardt L. The ajmaline challenge in Brugada syndrome: diagnostic impact, safety, and recommended protocol. *Eur Heart J*. 2003;24:1104-12.
61. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H and Wilde A. Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart Rhythm*. 2005;2:429-40.
62. Guss SB, Kastor JA, Josephson ME and Schare DL. Human ventricular refractoriness. Effects of cycle length, pacing site and atropine. *Circulation*. 1976;53:450-5.
63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database - NIH.
64. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.
65. <https://www.geneious.com/>.

66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
67. *ariant Interpretation_ wmuGV and Tool1.html/*.
68. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, Hogervorst FB, Hoogerbrugge N, Spurdle AB, Tavtigian SV and Group IUGVW. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*. 2008;29:1282-91.
69. Sarquella-Brugada G, Campuzano O, Arbelo E, Brugada J and Brugada R. Brugada syndrome: clinical and genetic findings. *Genet Med*. 2016;18:3-12.
70. Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R and Campuzano O. Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology (Basel)*. 2017;6.
71. Jarvik GP and Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;98:1077-1081.
72. Tester DJ and Ackerman MJ. Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation*. 2011;123:1021-37.
73. Fugate T, Moss AJ, Jons C, McNitt S, Mullally J, Ouellet G, Goldenberg I, Zareba W, Robinson JL and Investigators USpolLQSR. Long QT syndrome in African-Americans. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2010;15:73-6.
74. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC and Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One*. 2013;8:e62005.
75. Kutyifa V, Daimee UA, McNitt S, Polonsky B, Lowenstein C, Cutter K, Lopes C, Zareba W and Moss AJ. Clinical aspects of the three major genetic forms of long QT syndrome (LQT1, LQT2, LQT3). *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2018;23:e12537.
76. Earle N, Crawford J, Smith W, Hayes I, Shelling A, Hood M, Stiles M, Maxwell F, Heaven D, Love DR and Skinner JR. Community detection of long QT syndrome with a clinical registry: an alternative to ECG screening programs? *Heart Rhythm*. 2013;10:233-8.
77. Shimizu W, Makimoto H, Yamagata K, Kamakura T, Wada M, Miyamoto K, Inoue-Yamada Y, Okamura H, Ishibashi K, Noda T, Nagase S, Miyazaki A, Sakaguchi H, Shiraishi I, Makiyama T, Ohno S, Itoh H, Watanabe H, Hayashi K, Yamagishi M, Morita H, Yoshinaga M, Aizawa Y, Kusano K, Miyamoto Y, Kamakura S, Yasuda S, Ogawa H, Tanaka T, Sumitomo N, Hagiwara N, Fukuda K, Ogawa S, Makita N, Ohe T, Horie M and Aiba T. Association of Genetic and Clinical Aspects of Congenital Long QT Syndrome With Life-Threatening Arrhythmias in Japanese Patients. *JAMA Cardiol*. 2019.
78. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R and Cappelletti D. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348:1866-74.
79. Postema PG and Wilde AA. The measurement of the QT interval. *Curr Cardiol Rev*. 2014;10:287-94.
80. Kaufman ES, McNitt S, Moss AJ, Zareba W, Robinson JL, Hall WJ, Ackerman MJ, Benhorin J, Locati ET, Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM and Zhang L. Risk of death in the long QT syndrome when a sibling has died. *Heart Rhythm*. 2008;5:831-6.
81. Abu-Zeitone A, Peterson DR, Polonsky B, McNitt S and Moss AJ. Efficacy of different beta-blockers in the treatment of long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:1352-8.
82. Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Mademont-Soler I, Allegue C, Cesar S, Ferrer-Costa C, Coll M, Mates J, Iglesias A, Brugada J and Brugada R. Identification of

Genetic Alterations, as Causative Genetic Defects in Long QT Syndrome, Using Next Generation Sequencing Technology. *PLoS One*. 2014;9:e114894.

83. Chae H, Kim J, Lee GD, Jang W, Park J, Jekarl DW, Oh YS, Kim M and Kim Y. Considerations when using next-generation sequencing for genetic diagnosis of long-QT syndrome in the clinical testing laboratory. *Clin Chim Acta*. 2017;464:128-135.

84. Riuró H, Campuzano O, Berne P, Arbelo E, Iglesias A, Pérez-Serra A, Coll-Vidal M, Partemi S, Mademont-Soler I, Picó F, Allegue C, Oliva A, Gerstenfeld E, Sarquella-Brugada G, Castro-Urda V, Fernández-Lozano I, Mont L, Brugada J, Scornik FS and Brugada R. Genetic analysis, in silico prediction, and family segregation in long QT syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2015;23:79-85.

85. Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ and Tawil R. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest*. 2002;110:381-8.

86. Mizusawa Y, Horie M and Wilde AA. Genetic and clinical advances in congenital long QT syndrome. *Circ J*. 2014;78:2827-33.

87. Priori SG, Napolitano C and Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation*. 1999;99:529-33.

88. Pérez-Riera AR, Barbosa-Barros R, Daminello Raimundo R, da Costa de Rezende Barbosa MP, Esposito Sorpreso IC and de Abreu LC. The congenital long QT syndrome Type 3: An update. *Indian Pacing Electrophysiol J*. 2018;18:25-35.

89. Deeb R, Veerapandiyan A, Tawil R and Treidler S. Variable penetrance of Andersen-Tawil syndrome in a family with a rare missense. *Neurol Genet*. 2018;4:e284.

90. Ruwald MH, Xu Parks X, Moss AJ, Zareba W, Baman J, McNitt S, Kanters JK, Shimizu W, Wilde AA, Jons C and Lopes CM. Stop-codon and C-terminal nonsense mutations are associated with a lower risk of cardiac events in patients with long QT syndrome type 1. *Heart Rhythm*. 2016;13:122-31.

91. Porta-Sánchez A, Spillane DR, Harris L, Xue J, Dorsey P, Care M, Chauhan V, Gollob MH and Spears DA. T-Wave Morphology Analysis in Congenital Long QT Syndrome Discriminates Patients From Healthy Individuals. *JACC Clin Electrophysiol*. 2017;3:374-381.

92. Migdalovich D, Moss AJ, Lopes CM, Costa J, Ouellet G, Barsheshet A, McNitt S, Polonsky S, Robinson JL, Zareba W, Ackerman MJ, Benhorin J, Kaufman ES, Platonov PG, Shimizu W, Towbin JA, Vincent GM, Wilde AA and Goldenberg I. Mutation and gender-specific risk in type 2 long QT syndrome: implications for risk stratification for life-threatening cardiac events in patients with long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2011;8:1537-43.

93. Costa J, Lopes CM, Barsheshet A, Moss AJ, Migdalovich D, Ouellet G, McNitt S, Polonsky S, Robinson JL, Zareba W, Ackerman MJ, Benhorin J, Kaufman ES, Platonov PG, Shimizu W, Towbin JA, Vincent GM, Wilde AA and Goldenberg I. Combined assessment of sex- and mutation-specific information for risk stratification in type 1 long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2012;9:892-8.

94. Sundström E, Jensen SM, Diamant UB and Rydberg A. Implantable cardioverter defibrillator treatment in long QT syndrome patients: a national study on adherence to international guidelines. *Scand Cardiovasc J*. 2017;51:88-94.

95. Ziencuk-Krajka A, Sterliński M, Filipecki A, Owczuk R, Bednarek J, Kempa M, Sielski S, Dziduszko M, Mitkowski P, Kaźmierczak J, Kuśnierz J, Michałkiewicz D, Stec SM, Gułaj M, Majcherek R, Lubiński A and Raczak G. Implantable cardioverter-defibrillators in patients with long QT syndrome: a multicentre study. *Kardiol Pol*. 2018;76:1687-1696.

96. Brugada J, Brugada R and Brugada P. Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation*. 2003;108:3092-6.

97. Probst V, Veltmann C, Eckardt L, Meregalli PG, Gaita F, Tan HL, Babuty D, Sacher F, Giustetto C, Schulze-Bahr E, Borggrefe M, Haissaguerre M, Mabo P, Le Marec H, Wolpert C and Wilde AA. Long-term prognosis of patients diagnosed with Brugada syndrome: Results from the FINGER Brugada Syndrome Registry. *Circulation*. 2010;121:635-43.
98. Sieira J, Conte G, Ciconte G, de Asmundis C, Chierchia GB, Baltogiannis G, Di Giovanni G, Saitoh Y, Irfan G, Casado-Arroyo R, Juliá J, La Meir M, Wellens F, Wauters K, Van Malderen S, Pappaert G and Brugada P. Prognostic value of programmed electrical stimulation in Brugada syndrome: 20 years experience. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:777-84.
99. Bonny A, Tonet J, Fontaine G, Lacotte J, Coignard E, Duthoit G, Hidden-Lucet F, Charron P, Brugada P and Frank R. Brugada syndrome in pure black Africans. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008;19:421-6.
100. Milman A, Gourraud JB, Andorin A, Postema PG, Sacher F, Mabo P, Conte G, Giustetto C, Sarquella-Brugada G, Hochstadt A, Kim SH, Juang JJ, Maeda S, Takahashi Y, Kamakura T, Aiba T, Leshem E, Michowitz Y, Rahkovich M, Mizusawa Y, Arbelo E, Huang Z, Denjoy I, Wijeyeratne YD, Napolitano C, Brugada R, Casado-Arroyo R, Champagne J, Calo L, Tfelt-Hansen J, Priori SG, Takagi M, Veltmann C, Delise P, Corrado D, Behr ER, Gaita F, Yan GX, Brugada J, Leenhardt A, Wilde AAM, Brugada P, Kusano KF, Hirao K, Nam GB, Probst V and Belhassen B. Gender Differences in Patients with Brugada Syndrome and Arrhythmic Events: Data from a Survey on Arrhythmic Events in 678 Patients. *Heart Rhythm*. 2018.
101. Benito B, Sarkozy A, Mont L, Hensgens S, Berruezo A, Tamborero D, Arzamendi D, Berne P, Brugada R, Brugada P and Brugada J. Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1567-73.
102. Kitamura T, Fukamizu S, Kawamura I, Hojo R, Aoyama Y, Nishizaki M, Hiraoka M and Sakurada H. Clinical Characteristics and Long-Term Prognosis of Senior Patients With Brugada Syndrome. *JACC Clin Electrophysiol*. 2017;3:57-67.
103. Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Pérez GJ, Scornik FS and Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation*. 2002;106:2004-11.
104. Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M and Tomoike H. Sex hormone and gender difference--role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18:415-21.
105. Song M, Helguera G, Eghbali M, Zhu N, Zarei MM, Olcese R, Toro L and Stefani E. Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem*. 2001;276:31883-90.
106. Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H and Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation*. 2005;112:1701-10.
107. Matsuo K, Akahoshi M, Seto S and Yano K. Disappearance of the Brugada-type electrocardiogram after surgical castration: a role for testosterone and an explanation for the male preponderance. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2003;26:1551-3.
108. Probst V, Denjoy I, Meregalli PG, Amirault JC, Sacher F, Mansourati J, Babuty D, Villain E, Victor J, Schott JJ, Lupoglazoff JM, Mabo P, Veltmann C, Jesel L, Chevalier P, Clur SA, Haissaguerre M, Wolpert C, Le Marec H and Wilde AA. Clinical aspects and prognosis of Brugada syndrome in children. *Circulation*. 2007;115:2042-8.
109. Sacilotto L, Epifanio HB, Darrieux FC, Wulkan F, Oliveira TG, Hachul DT, Pereira AD and Scanavacca MI. Compound Heterozygous SCN5A Mutations in a Toddler - Are they Associated with a More Severe Phenotype? *Arq Bras Cardiol*. 2017;108:70-73.
110. Walsh R and Wilde AAM. SCN5A variants in Brugada syndrome: True, true false, or false true. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2019;30:128-131.

111. Denham NC, Pearman CM, Ding WY, Waktare J, Gupta D, Snowdon R, Hall M, Cooper R, Modi S, Todd D and Mahida S. Systematic re-evaluation of SCN5A variants associated with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2019;30:118-127.
112. Gray B, Hasdemir C, Ingles J, Aiba T, Makita N, Probst V, Wilde AAM, Newbury-Ecob R, Sheppard MN, Semsarian C, Sy RW and Behr ER. Lack of genotype-phenotype correlation in Brugada Syndrome and Sudden Arrhythmic Death Syndrome families with reported pathogenic SCN1B variants. *Heart Rhythm*. 2018;15:1051-1057.
113. Scumaci D, Oliva A, Concolino A, Curcio A, Fiumara CV, Tammè L, Campuzano O, Pascali VL, Coll M, Iglesias A, Berne P, Casu G, Olivo E, Ausania F, Ricci P, Indolfi C, Brugada J, Brugada R and Cuda G. Integration of "Omics" Strategies for Biomarkers Discovery and for the Elucidation of Molecular Mechanisms Underlying Brugada Syndrome. *Proteomics Clin Appl*. 2018;12:e1800065.
114. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De Nardis R, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G and Nastoli J. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation*. 2002;105:1342-7.
115. Yamagata K, Horie M, Aiba T, Ogawa S, Aizawa Y, Ohe T, Yamagishi M, Makita N, Sakurada H, Tanaka T, Shimizu A, Hagiwara N, Kishi R, Nakano Y, Takagi M, Makiyama T, Ohno S, Fukuda K, Watanabe H, Morita H, Hayashi K, Kusano K, Kamakura S, Yasuda S, Ogawa H, Miyamoto Y, Kapplinger JD, Ackerman MJ and Shimizu W. Genotype-Phenotype Correlation of. *Circulation*. 2017;135:2255-2270.
116. Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H and Wilde AA. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:350-6.
117. Bébarová M, O'Hara T, Geelen JL, Jongbloed RJ, Timmermans C, Arens YH, Rodriguez LM, Rudy Y and Volders PG. Subepicardial phase 0 block and discontinuous transmural conduction underlie right precordial ST-segment elevation by a SCN5A loss-of-function mutation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H48-58.
118. Van Malderen SCH, Daneels D, Kerkhove D, Peeters U, Theuns DAMJ, Droogmans S, Van Camp G, Weytjens C, Biervliet M, Bonduelle M, Van Dooren S and Brugada P. Prolonged Right Ventricular Ejection Delay in Brugada Syndrome Depends on the Type of SCN5A Variant - Electromechanical Coupling Through Tissue Velocity Imaging as a Bridge Between Genotyping and Phenotyping. *Circ J*. 2017;82:53-61.
119. Matsumura H, Nakano Y, Ochi H, Onohara Y, Sairaku A, Tokuyama T, Tomomori S, Motoda C, Amioka M, Hironobe N, Toshishige M, Takahashi S, Imai K, Sueda T, Chayama K and Kihara Y. H558R, a common SCN5A polymorphism, modifies the clinical phenotype of Brugada syndrome by modulating DNA methylation of SCN5A promoters. *J Biomed Sci*. 2017;24:91.
120. Ragab AAY, Houck CA, van der Does LJME, Lanters EAH, Burghouwt DE, Muskens AJQM and de Groot NMS. Usefulness of the R-Wave Sign as a Predictor for Ventricular Tachyarrhythmia in Patients With Brugada Syndrome. *Am J Cardiol*. 2017;120:428-434.
121. Allegue C, Coll M, Mates J, Campuzano O, Iglesias A, Sobrino B, Brion M, Amigo J, Carracedo A, Brugada P, Brugada J and Brugada R. Genetic Analysis of Arrhythmogenic Diseases in the Era of NGS: The Complexity of Clinical Decision-Making in Brugada Syndrome. *PLoS One*. 2015;10:e0133037.
122. Proost D, Saenen J, Vandeweyer G, Rotthier A, Alaerts M, Van Craenenbroeck EM, Van Crombruggen J, Mortier G, Wuyts W, Vrints C, Del Favero J, Loeys B and Van Laer L. Targeted Next-Generation Sequencing of 51 Genes Involved in Primary Electrical Disease. *J Mol Diagn*. 2017;19:445-459.

123. Azzariti DR, Riggs ER, Niehaus A, Rodriguez LL, Ramos EM, Kattman B, Landrum MJ, Martin CL and Rehm HL. Points to consider for sharing variant-level information from clinical genetic testing with ClinVar. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2018;4.
124. Ackerman MJ, Tester DJ, Jones GS, Will ML, Burrow CR and Curran ME. Ethnic differences in cardiac potassium channel variants: implications for genetic susceptibility to sudden cardiac death and genetic testing for congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc.* 2003;78:1479-87.
125. 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 and 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;1:600-7.
126. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG and Consortium EA. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285-91.
127. Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD, Berg JS, Biswas S, Bowling KM, Conlin LK, Cooper GM, Dorschner MO, Dulik MC, Ghazani AA, Ghosh R, Green RC, Hart R, Horton C, Johnston JJ, Lebo MS, Milosavljevic A, Ou J, Pak CM, Patel RY, Punj S, Richards CS, Salama J, Strande NT, Yang Y, Plon SE, Biesecker LG and Rehm HL. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am J Hum Genet.* 2016;99:247.
128. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, Harris-Kerr C, Pungliya MS, Alders M, Wilde AA and Ackerman MJ. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation.* 2009;120:1752-60.
129. Giudicessi JR, Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Salisbury BA, Wilde AA and Ackerman MJ. Phylogenetic and physicochemical analyses enhance the classification of rare nonsynonymous single nucleotide variants in type 1 and 2 long-QT syndrome. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5:519-28.
130. Rehm HL, Berg JS, Brooks LD, Bustamante CD, Evans JP, Landrum MJ, Ledbetter DH, Maglott DR, Martin CL, Nussbaum RL, Plon SE, Ramos EM, Sherry ST, Watson MS and ClinGen. ClinGen--the Clinical Genome Resource. *N Engl J Med.* 2015;372:2235-42.

Apêndice

Apêndice A - Aprovação do Comitê de Ética – CAPPesq



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

4042/14/022

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO GENÉTICO EM ARRITMIAS CARDÍACAS: AVALIAÇÃO DE PACIENTES E FAMILIARES.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Mauricio Ibrahim Scanavacca **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Dra. Luciana Sacilotto **CAAE:** 39327214.8.0000.0068

Coautores: Dra. Denise Tessariol Hachul, Dr. Francisco Carlos da Costa Darrieux, Dr. Alexandre da Costa Pereira

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: Dr. Maurício Ibrahim Scanavacca

Instituição: HCFMUSP

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Retificação do parecer 1.175.097

Justificativa: O conteúdo das aprovações das emendas 1 e 2, cito 1.152.183 e 1.175.097, respectivamente, estão idênticos, sendo que os documentos submetidos não são os mesmos. Estamos anexando novamente os documentos nesta notificação (como backup), contudo já se encontram anexados desde 29/07, na emenda 2.

Data do Envio: 11/09/2015

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11113

Número do Parecer: 1.239.543

Data da Relatoria: 16/09/2015

Apresentação da Notificação: Cientes da informação que o projeto se destinará a ser tese de doutorado da Dra. Luciana Sacilotto. Cientes das modificações no projeto comunicadas em carta datada de 21 de julho de 2015

Objetivo da Notificação: Informar a inclusão da pesquisadora Luciana Sacilotto e modificações no projeto

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não foram modificados pelas alterações no projeto segundo informou o pesquisador responsável.

Comentários e Considerações sobre a Notificação: Sem comentários adicionais

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Sem considerações adicionais

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Apêndice A - Aprovação do Comitê de Ética – CAPPesq



Hospital das Clínicas da FMUSP Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Recomendações: Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Cientes

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

COMISSÃO CIENTIFICA
RECEBIDO
24 / 09 / 2015
Anna Lucia

São Paulo, 22 de setembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE:..... SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo genético em arritmias cardíacas: avaliação de pacientes e familiares.
- PESQUISADOR: Mauricio Ibrahim Scanavacca
- NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 33507
- CARGO/FUNÇÃO: Médico Diretor da Unidade Clínica de Arritmia e Marcapasso
- UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Descrição e objetivo da pesquisa:

O Sr. (a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar uma **doença genética (hereditária) que leva a alguns tipos de problemas do ritmo do coração (arritmias)**. **As arritmias genéticas que serão investigadas são Síndrome do Qt longo Congênito, Síndrome de Brugada e Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica, que são doenças que você possa ter ou em algum membro da sua família.**

Com este estudo poderemos **buscar** informações importantes, por exemplo, em relação aos **diferentes sintomas e as respostas ao tratamento entre pessoas com o mesmo tipo de doença**. **O exame genético pode identificar melhor a doença em seus familiares**, que devem realizar acompanhamento médico, quando indicado. **Além disso, será possível identificar familiares portadores da alteração genética, mesmo com exames cardiológicos normais.**

Para participar desse projeto de pesquisa, basta ceder uma amostra de sangue. **Desta amostra de sangue será pesquisada a alteração genética.**

III - RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS:

O único **desconforto pode ser a** picada de agulha em seu braço (como em qualquer exame de sangue). O risco mínimo, neste caso, se refere à possibilidade de um pequeno hematoma (roxo ou vermelhidão) no local da coleta de sangue, além da possibilidade de dor mínima na região do procedimento. Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado.

Benefícios: Trata-se de estudo genético observacional, que visa identificar a alteração genética que causa as Arritmias Cardíacas. **Caso seja possível identificar a mutação, você terá o benefício de diagnosticar os seus familiares que podem estar afetados e não sabem.** O diagnóstico precoce possibilita um melhor tratamento.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOS SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNADO

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas;
2. O Sr.(a) tem plena liberdade de não autorizar a utilização da coleta do seu sangue para ser usado nessa pesquisa e isso não lhe trará nenhum prejuízo. Portanto, o uso do material sanguíneo para essa pesquisa só será feito após a leitura, entendimento e consentimento das informações contidas nesse termo de consentimento.
3. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento de participar do estudo.
4. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Para manter sua privacidade, será fornecido um número de registro à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido no mais absoluto sigilo e não será divulgado em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.
5. Os resultados obtidos que estiverem associados à sua identificação não serão de forma nenhuma divulgados a terceiros.
6. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
7. Os pacientes que concordarem em participar do projeto deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. O não consentimento não acarretará na falta de atendimento no Instituto do Coração/HCFMUSP ou de qualquer outra instituição participante/colaboradora desse projeto.
8. O principal investigador é o Dr Mauricio Ibrahim Scanavacca que pode ser encontrado no endereço Av Dr. Eneas Carvalho de Aguiar, nº 44, andar AB. Telefone: 11 2661-5341. Se o Sr (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Apêndice 3

Painel de 100 genes: associação clínica com SQTL e SBr.

Genes	Associação Clínica	Genes	Associação Clínica
<i>ABCC9</i>	SBr	<i>KCNH2</i>	SQTL
<i>ACTA2</i>		<i>KCNJ2</i>	SQTL
<i>ACTC1</i>		<i>KCNJ5</i>	SBr, SQTL
<i>ACTN2</i>		<i>KCNJ8</i>	SBr
<i>AGTR1</i>		<i>KCNK17</i>	
<i>AKAP9</i>	SQTL	<i>KCNN3</i>	
<i>ANK2</i>	SQTL	<i>KCNQ1</i>	SQTL
<i>ASPH</i>		<i>LMF1</i>	
<i>C9ORF3</i>		<i>LMNA</i>	
<i>CACNA1C</i>	SBr, SQTL	<i>MYBPC3</i>	
<i>CACNA2D1</i>	SBr	<i>MYL2</i>	
<i>CACNB2</i>	SBr	<i>MYL3</i>	
<i>CALM1</i>	SQTL	<i>MYLK2</i>	
<i>CALM2</i>	SQTL	<i>MYOZ2</i>	
<i>CALR3</i>		<i>MYPN</i>	
<i>CASQ2</i>		<i>NEXN</i>	
<i>CAV1</i>		<i>NKX2-5</i>	
<i>CAV3</i>	SQTL	<i>NPPA</i>	
<i>CTNNA3</i>		<i>PDLIM3</i>	
<i>DES</i>		<i>PITX2</i>	
<i>DMD</i>		<i>PKP2</i>	SBr
<i>DSC2</i>		<i>PRKAG2</i>	
<i>DSG2</i>		<i>PRRX1</i>	
<i>DSP</i>		<i>RANGRF</i>	SBr
<i>DTNA</i>		<i>RYR2</i>	SQTL
<i>EMD</i>		<i>SCN10A</i>	SBr
<i>EYA4</i>		<i>SCN1B</i>	SBr, SQTL
<i>FBN1</i>		<i>SCN2B</i>	SBr
<i>FHL2</i>		<i>SCN3B</i>	SBr
<i>FKTN</i>		<i>SCN4B</i>	SQTL
<i>FLNC</i>		<i>SCN5A</i>	SBr, SQTL
<i>GJA1</i>		<i>SLMAP</i>	SBr
<i>GJA5</i>		<i>SNTA1</i>	SQTL
<i>GLA</i>		<i>SYNE2</i>	
<i>GPD1L</i>	SBr	<i>SYNPO2L</i>	
<i>HCN1</i>		<i>TAZ</i>	
<i>HCN2</i>		<i>TBX5</i>	
<i>HCN4</i>	SBr	<i>TCAP</i>	
<i>ILK</i>		<i>TGFB3</i>	
<i>JPH2</i>		<i>TMEM43</i>	
<i>JUP</i>		<i>TNNC1</i>	
<i>KCNA5</i>		<i>TNNI3</i>	
<i>KCND2</i>	SBr	<i>TNNI3K</i>	
<i>KCND3</i>	SBr	<i>TNNT2</i>	
<i>KCNE1</i>	SQTL	<i>TPM1</i>	
<i>KCNE1L</i>		<i>TRDN</i>	SQTL