



Biomarcatori cardiaci nella Sindrome di Brugada: previsione e stratificazione del rischio di morte improvvisa.

La morte cardiaca improvvisa (MCI)

La Morte Cardiaca Improvvisa (MCI) o Sudden Cardiac Death (SCD) è internazionalmente riconosciuta e definita come il decesso che avviene per cause cardiache in soggetti apparentemente sani.

In Italia l'incidenza riportata è di 0,53-0,67/1000 individui/anno nella fascia da 35 a 64 anni e aumenta con l'età contestualmente al crescere dell'insorgenza della malattia aterosclerotica coronarica. Negli adolescenti e giovani adulti (età < 35 anni) l'incidenza approssimativa è di 0,01/1000/per anno; nei soggetti di 35-40 anni aumenta a circa 1/1000/anno, fino a raggiungere un'incidenza di 2/1000/anno fino all'età dei 60 anni e di 200/1000/anno nella popolazione più anziana. La frequenza di MCI è più alta nella popolazione maschile (76/100000) rispetto a quella femminile (45/100000).

La MCI è la causa prevalente di morte improvvisa nei bambini, negli adolescenti e nei giovani adulti (fino ai 35-40 anni) che si verifica spesso in soggetti apparentemente sani, come prima manifestazione di una patologia sottostante non nota. In circa la metà dei giovani tra 1 e 35 anni che muoiono improvvisamente, infatti, non sono identificabili all'anamnesi precedenti segni premonitori o di allarme, e la morte rappresenta quindi l'evento "sentinella".

In circa il 30% dei casi di MCI in persone di giovane età, la patologia sottostante è di origine genetica. Circa un terzo di questi casi sono riconducibili a canalopatie cardiache che comprendono la *sindrome del QT lungo* (LQTS), *sindrome del QT corto* (SQTS), *sindrome di Brugada* (BrS) e *tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica* (CPVT). Queste patologie sono principalmente dovute a mutazioni in geni che codificano per canali ionici cardiaci, recettori e/o proteine regolatrici; sono caratterizzate da una modificazione del potenziale d'azione cardiaco o del calcio intracellulare, che predispone ad aritmie ventricolari pericolose per la vita, in grado infatti di causare sincope, respiro notturno agonico e morte improvvisa.¹

La previsione e stratificazione del rischio di MCI

La predisposizione verso la morte improvvisa è il complesso risultato dell'interazione tra un substrato vulnerabile (alterazioni genetiche o acquisite delle proprietà meccaniche o elettriche del cuore) e svariati fattori transitori che contribuiscono all'innescò dell'evento fatale.

La definizione del rischio individuale trova enormi difficoltà applicative perché esistono ancora molte carenze conoscitive e finora non sono state elaborate strategie di screening a livello della popolazione generale. È importante sottolineare come la maggior parte degli eventi di morte improvvisa si verifichino in assenza di una cardiopatia clinicamente riconosciuta in fasce di popolazione a basso rischio.

La genetica svolge un ruolo sempre più emergente nell'identificare il rischio di MCI non solo nell'ambito delle aritmie e malattie strutturali ereditarie, ma anche nel contesto di alterazioni



elettrolitiche o esposizioni a farmaci, come dimostrato dalla recente evidenza che quasi il 30% dei soggetti con QT lungo da farmaci è portatore di mutazioni-malattia per la sindrome del QT lungo. Una precisa conoscenza della patologia di base risulta indispensabile in termini di prevenzione sia per il paziente che per gli altri familiari potenzialmente a rischio. In relazione alla morte improvvisa giovanile, l'analisi del DNA, così come indicato dalle linee guida ESC, costituisce la base imprescindibile per l'avvio dello screening familiare secondo specifici protocolli diagnostici. Risulta infatti fondamentale per identificare i familiari con genotipo positivo e fenotipo negativo (i portatori silenti) e proteggerli, quando necessario, dal rischio di aritmie fatali.

La disponibilità di schemi per la stratificazione del rischio è estremamente variabile nell'ambito delle diverse canalopatie e cardiomiopatie: ad esempio, mentre la durata dell'intervallo QT corretto (QTc) è un indicatore affidabile del rischio di eventi cardiaci nella sindrome del QT lungo (LQTS), in altre patologie, come la sindrome di Brugada, le misure per la stratificazione del rischio sono meno attendibili. Al momento, le informazioni genetiche possono essere utilizzate per guidare la stratificazione del rischio solo in alcune patologie, come la LQTS e la cardiomiopatia dilatativa. Le linee guida segnalano quindi come la stratificazione del rischio rimanga totalmente insoddisfacente sia nell'ambito della popolazione generale che nei soggetti con cardiopatia e riconoscono la necessità urgente di valutare nuovi approcci metodologici.^{1,2}

Sindrome di Brugada (BrS)

I criteri più recenti per una corretta valutazione diagnostica della BrS e delle altre forme di aritmie sono indicati nelle ultime linee guida elaborate dall'ESC, HRS, EHRA e APHRS.^{3,4}

La prevalenza della BrS è stimata tra 1/1000 e 1/10000, sembra essere più elevata nel Sud-Est Asiatico rispetto ai paesi occidentali, in particolare Thailandia, Filippine e Giappone, raggiungendo l'incidenza dello 0,5-1/1000. È stato ipotizzato che la maggiore prevalenza nella popolazione asiatica possa essere in parte correlata alla presenza di una sequenza specifica nella regione del promotore del gene *SCN5A*.

La BrS è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica dominante con penetranza età e sesso dipendente: le manifestazioni cliniche della malattia sono più comuni nei soggetti adulti e sono otto volte più frequenti negli uomini rispetto alle donne. La fibrillazione ventricolare (FV) si verifica ad un'età media di 41 ± 15 anni, ma può manifestarsi a qualsiasi età, solitamente a riposo o durante il sonno. Febbre, abuso di bevande alcoliche e pasti abbondanti sono fattori scatenanti che possono slantentizzare il sopraslivellamento del tratto ST con pattern ECG di tipo 1 e predispongono all'insorgenza di FV.

In una recente metanalisi condotta nel contesto della BrS, l'incidenza annua di eventi aritmici (tachicardia ventricolare (TV) sostenuta, FV, interventi appropriati dell'ICD o morte improvvisa) è risultata del 13.5% nei pazienti con pregresso arresto cardiaco improvviso, del 3.2% nei pazienti con sincope e dell'1% nei pazienti asintomatici.⁵

Finora sono stati segnalati 12 geni associati alla BrS. In tutti e 12 i genotipi è stato dimostrato che al fenotipo BrS sono associati una diminuzione della corrente di sodio o di calcio in entrata o un aumento di una delle correnti di potassio in uscita. In circa il 30% dei pazienti BrS viene riscontrata una mutazione patogenetica nel gene *SCN5A*, che codifica per la subunità α del canale cardiaco del sodio.



I test genetici non sono raccomandati in assenza di un ECG diagnostico, invece è raccomandato per i membri della famiglia di un probando genotipizzato con successo.

Allo stato attuale, i risultati dello screening genetico non hanno alcun impatto di ordine prognostico o terapeutico.

La BrS viene diagnosticata in presenza di sopraslivellamento del tratto ST ≥ 2 mm con morfologia di tipo 1 in almeno una delle derivazioni precordiali destre V1 e/o V2 a livello del secondo, terzo o quarto spazio intercostale, che compare spontaneamente o dopo somministrazione endovenosa di un agente bloccante i canali del sodio (ajmalina, flecainide, pilsicainide o procainamide).

Molti soggetti che mostrano un ECG di tipo 1, spontaneo o indotto da farmaci, sono asintomatici.^{3,4}

Trattamenti terapeutici per i pazienti con BrS

La terapia con cardioverter-defibrillatore impiantabile (ICD) è il solo trattamento in grado di ridurre il rischio di MCI nella BrS, pertanto l'impianto di questo dispositivo è raccomandato in tutti i pazienti con TV/FV documentata o che presentino un pattern ECG di tipo 1 spontaneo e storia di episodi sincopali.

È importante notare che gli ICD non sono esenti da diversi svantaggi, specialmente nel gruppo di pazienti giovani, infatti saranno necessarie sostituzioni multiple dei dispositivi durante la loro vita. Alcuni studi hanno riportato bassi tassi di shock appropriati (8%-15%, follow-up medio 45 mesi) e alti tassi di complicanze, principalmente shock inappropriati (20%-36% a 21-47 mesi di follow-up).^{7,8,9}

I pazienti BrS asintomatici non sono considerati idonei per un ICD poiché il rischio di eventi potenzialmente letali è molto basso. In questo gruppo di pazienti, dovrebbe essere eseguita una valutazione individuale dei fattori di rischio associati (sesso, età, ECG basale, inducibilità).

Per quanto riguarda i trattamenti farmacologici sono stati testati alcuni farmaci che inibiscono la corrente transitoria di potassio in uscita (I_{to}) o aumentano le correnti di sodio e calcio:

- isoproterenolo (che aumenta la corrente di calcio di tipo L), si è dimostrato utile per il trattamento delle tempeste elettriche nella BrS, ma non sono disponibili dati controllati sul suo ruolo terapeutico;

- chinidina, un farmaco antiaritmico di classe Ia (blocca I_{to} e I_{Kr}), previene l'induzione di FV e riduce l'insorgenza di aritmie ventricolari spontanee. La chinidina è attualmente utilizzata in pazienti con ICD e shock multipli, casi in cui l'impianto di ICD è controindicato e per il trattamento delle aritmie sopraventricolari. È stato suggerito che potrebbe essere utile anche nei bambini con BrS, prima dell'impianto di ICD o in alternativa ad esso. Tuttavia, non sono stati condotti studi randomizzati sull'uso della chinidina.³

Recentemente è stato suggerito che l'ablazione epicardica a livello del tratto di efflusso ventricolare destro (RVOT) anteriore sia in grado di prevenire la comparsa di tempeste aritmiche nei pazienti con episodi ricorrenti, ma queste osservazioni devono ancora essere confermate prima di essere incorporate nella pratica clinica generale.⁶

Prognosi e stratificazione del rischio nella BrS

È stato dimostrato che diverse variabili cliniche predicono un esito peggiore nei pazienti con BrS.

La maggior parte degli studi ha concordato sull'evidenza che la presenza di episodi sincopali in pazienti con un ECG spontaneo di tipo 1 (senza condizioni note per smascherare il segno distintivo, cioè farmaci e febbre) correla con un alto rischio di eventi aritmici cardiaci al follow-up.



Esistono poche controversie sull'alto rischio di recidiva di arresto cardiaco tra i pazienti che sono sopravvissuti a una prima FV, infatti si è concordi sul fatto che questi soggetti dovrebbero essere protetti con un ICD, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio.⁴

Tra gli altri indicatori di stratificazione del rischio sono stati recentemente proposti la presenza di QRS frammentato e un periodo refrattario effettivo < 200 ms. Inoltre è stato ripetutamente osservato che il genere maschile è associato a più eventi aritmici.

La fibrillazione atriale (FA) spontanea, che può comparire dal 10% al 53% dei casi, ha dimostrato di avere un significato prognostico ed è stata associata a una maggiore incidenza di episodi sincopali e FV documentata.

Il rischio di episodi aritmici letali o quasi letali tra i pazienti precedentemente asintomatici con BrS varia a seconda della serie: tasso di eventi dell'8% a 33 ± 39 mesi di follow-up riportato da Brugada et al (2003); tasso di eventi del 6% a 34 ± 44 mesi di Priori et al (2012); tasso di eventi dell'1% dopo 40 ± 50 mesi e 30 ± 21 mesi di follow-up, rispettivamente, da Eckardt et al (2005) e Giustetto et al (2009), e, infine, Probst et al (2010) hanno riportato un tasso di eventi dell'1,5% a 31 mesi.

Diversi studi concordano sul fatto che l'inducibilità dello studio elettrofisiologico (EPS) sia maggiore tra i pazienti BrS con precedente morte improvvisa o sincope, tuttavia non c'è consenso sul valore dell'EPS nel predire l'esito. I risultati pubblicati da Brugada et al (2003) al indicano che l'inducibilità durante l'EPS è un predittore indipendente di eventi aritmici e Giustetto et al (2009) hanno sottolineato il valore predittivo negativo (nessuno dei pazienti con un EPS negativo ha sviluppato eventi aritmici contro il 15% dei pazienti con un risultato positivo durante 30 ± 21 mesi di follow-up), mentre il resto dei registri non è riuscito a dimostrarlo. Il registro PRELUDE (PROgrammed ELEctrical stimuLation PreDICTive valuE) non ha confermato che la mancanza di inducibilità abbia un valore predittivo negativo in BrS.

Né una storia familiare positiva di morte improvvisa né la presenza di mutazioni del gene *SCN5A* hanno dimostrato essere un marker di rischio in nessuno dei grandi studi. Tuttavia, alcuni tipi specifici di mutazioni, come quelli che determinano una proteina troncata, o alcuni SNP comuni, potrebbero avere un significato prognostico.³

Biomarcatori cardiaci nella BrS

Come evidenziato dai dati descritti finora è evidente l'impossibilità di effettuare una esaustiva prognosi e stratificazione del rischio nei soggetti BrS, risulta fondamentale perciò individuare nuovi biomarcatori che possano essere utilizzati per il monitoraggio ed il trattamento dei pazienti, migliorando quindi l'approccio terapeutico e la qualità di vita.

Nell'agosto del 2020 il gruppo di ricerca del dott. Hamilton ha pubblicato nella rivista *European Heart Journal* i risultati di uno studio internazionale in cui sono stati identificati, per la prima volta, un gruppo di autoanticorpi specifici per proteine cardiache, nel siero di pazienti affetti da BrS.¹⁰

Lo studio, svolto presso l'Università di Toronto e validato nei centri di ricerca di Zurigo, Monaco, Rochester, Arezzo e Nantes, ha previsto la ricerca di specifici autoanticorpi (anticorpi rivolti contro i tessuti del paziente stesso) che aggrediscono proteine delle cellule cardiache e sono responsabili della infiammazione cardiaca riscontrata in pazienti BrS.



Tutti i pazienti presi in esame sono stati classificati secondo lo *Shangai score*: sono stati inclusi solo i soggetti con una diagnosi certa di BrS e con un punteggio, che valuta la storia clinica, familiare e genetica, pari o superiore a 3,5. (Tabella 1)

È stato quindi valutato il profilo di espressione proteica nel siero dei pazienti affetti da BrS verso soggetti controllo: sono stati identificati tramite gel 2D e spettrometria di massa 4 autoanticorpi specifici differenzialmente espressi, presenti solo nei pazienti BrS, ossia actina cardiaca α , actina scheletrica α , cheratina 24 e connexina 43.

Le differenze di espressione della 4 proteine, tra soggetti BrS e popolazione controllo, è stata validata tramite due ulteriori metodiche di rilevamento ossia Western Blot e saggi ELISA.

Come possibile vedere nei grafici riportati, i dati di densità ottica rilevati nel gruppo BrS e nella coorte di conferma sono significativamente elevati rispetto ai dati rilevati nei campioni controllo. (Figura 1)

I risultati ottenuti suggeriscono 100% di specificità (soggetti sani non presentano alterazioni del profilo proteico identificato, alta probabilità che un soggetto sano risulti negativo al test) e sensibilità nei pazienti BrS (i soggetti affetti da BrS presentano tutti il profilo proteico identificato alterato, con basso rischio di falsi positivi).

L'analisi immunoistochimica del miocardio di 9 pazienti BrS ha confermato infine la presenza di un'espressione alterata delle 4 proteine e il loro coinvolgimento nella formazione di aggregati nel sarcoplasma delle cellule miocardiche. Si suppone, quindi, che questi aggregati inneschino una reazione infiammatoria nei cardiomiociti, con conseguente formazione e rilascio di specifici autoanticorpi facilmente rilevabili nel siero.

Lo studio ha permesso di identificare quindi dei potenziali biomarcatori sierici specifici nei pazienti affetti da BrS, facilmente rilevabili con un semplice esame del sangue.^{10,11,12}

Valutazione biomarcatori sierici nella coorte BrS (AOU Sassari) e stratificazione del rischio di MCI

Nell'arco temporale 2017-2021, presso il reparto di cardiologia dell'ASSL di Nuoro, il progetto "*Epidemiologia e genetica della morte improvvisa in Sardegna e correlazione con le canalopatie*" (Responsabile Scientifico Dott. Gavino Casu) ha conseguito i seguenti obiettivi:

- identificare i soggetti sardi affetti da canalopatie effettuando la valutazione clinica e genetica nei pazienti con pregressa diagnosi e/o con sospetta canalopatia (sospetto clinico, screening dei componenti familiari, storia personale e/o familiare di MCI),
- fornire adeguata assistenza terapeutica al paziente secondo le linee guida internazionali, per cercare di ridurre al minimo gli eventi avversi.

L'attività ambulatoriale, tuttora in corso presso l'AOU Sassari, consente di eseguire ogni anno circa 800-900 visite di controllo e diagnostiche .

Finora, presso l'ambulatorio di canalopatie, sono stati sottoposti a visita medica circa 2000 soggetti, tra questi 620 (30%) hanno ricevuto una diagnosi clinica:

- 400 pazienti risultano affetti da BrS (67%),
- 172 hanno ricevuto diagnosi di LQTS (26%),
- 48 manifestano CPVT (7%),
- 1 soggetto presenta SQTs. (Figura2)

Nei pazienti BrS l'età media al momento della diagnosi risulta essere circa 42 anni, circa il 79% dei soggetti sono probandi e l'incidenza è maggiore negli uomini (63%) rispetto alle donne (27%). Il 21% presentano un



ECG di tipo 1 spontaneo, in circa il 18% dei pazienti è stato impiantato un defibrillatore (ICD) e il 17% segue terapia farmacologica (idrochinidina).

I risultati conseguiti hanno permesso di avere una popolazione di circa 400 pazienti con diagnosi clinica di BrS.

Il progetto "*Biomarcatori cardiaci nella Sindrome di Brugada: previsione e stratificazione del rischio di morte improvvisa*" utilizzerebbe parte di questa ampia coorte sarda per validare la specificità dei biomarcatori cardiaci nei pazienti BrS, evidenziati dallo studio di Chatterjee et al (2020).

Il progetto prevede la valutazione della storia clinica, familiare e genetica di ciascun paziente BrS con l'assegnazione di uno specifico punteggio, secondo lo *Shangai score*. Quindi circa 250 soggetti sardi BrS verrebbero sottoposti ad un prelievo ematico in modo da consentire la conservazione di aliquote di sangue e siero, formando così un'ampia biobanca. Ciascun campione verrà poi sottoposto ad analisi genetica NGS e validazione con sequenziamento Sanger, per identificare eventuali mutazioni patogenetiche responsabili dell'insorgenza di BrS.

Lo step successivo prevederà la ricerca e quantificazione dei 4 autoanticorpi specifici differenzialmente espressi nei pazienti BrS ossia actina cardiaca α , actina scheletrica α , cheratina 24 e connexina 43.

Obiettivi generali e specifici del progetto

L'obiettivo generale del progetto prevede la ricerca di correlazioni tra i livelli di espressione dei 4 biomarcatori riscontrati nella popolazione sarda BrS e i parametri valutati nell'elaborazione dello *Shangai score* (storia clinica, familiare e genetica) oltre sesso e età.

In particolare verranno perseguiti i seguenti obiettivi specifici:

- I. stimare le correlazioni tra i biomarcatori sierici e l'insorgenza di eventi avversi nei soggetti BrS, distinguendo quindi tra pazienti BrS con alto e basso rischio di insorgenza di aritmie, consentendo così una stratificazione del rischio di insorgenza di MCI.
- II. stimare l'assoluta specificità dei biomarcatori di BrS, includendo nello studio pazienti che presentino mutazioni patogenetiche del gene *SCN5A*, ma che risultino affetti da altre forme di cardiomiopatie (es Sindrome del QT lungo) e pazienti affetti da altre canalopatie (LQTS, CPVT e FVI)
- III. stimare valore diagnostico e prognostico dei biomarcatori, ripetendo il loro dosaggio nel tempo (valutazione annuale per un gruppo ristretto di pazienti) e inserendo nell'analisi i nuovi pazienti BrS sintomatici che giungeranno presso l'ambulatorio di canalopatie dell'ospedale Santissima Annunziata di Sassari durante il periodo di svolgimento del progetto.

Modalità di esecuzione del progetto

Popolazione in studio

(Unità Operativa Cardiologia Ospedale Santissima Annunziata, Sassari)

La popolazione di riferimento è rappresentata da soggetti sottoposti a valutazione clinica presso l'ambulatorio di canalopatie e che abbiano ricevuto diagnosi di BrS.

Si tratta di circa 400 pazienti BrS con età media al momento della diagnosi di 42 anni, il 79% dei soggetti sono probandi e l'incidenza è maggiore negli uomini (63%) rispetto alle donne (27%). Il 21% presentano un



ECG di tipo 1 spontaneo, in circa il 18% dei pazienti è stato impiantato un defibrillatore (ICD) e il 17% segue terapia farmacologica (idrochinidina).

Indagine genetiche, immunoenzimatiche ed elaborazione statistica
(Unità Operativa di Genetica/Statistica Cardiovascolare)

Le indagini di genetica molecolare verranno condotte sui campioni ottenuti dalla popolazione in studio per la ricerca di mutazione nei geni malattia (*CACNA1C*, *CACNA2D1*, *CACN2B*, *GPD1L*, *HCN4*, *KCND3*, *KCNE3*, *KCNJ8*, *RANGRF*, *SCN1B*, *SCN3B* e *SCN5A*) mediante sequenziamento massivo parallelo (NGS) e validazione con sequenziamento Sanger.

Circa 250 campioni sierici verranno sottoposti a test immunoenzimatici per quantificare l'eventuale presenza dei 4 biomarcatori BrS .

Tempi di realizzazione

36 mesi così suddivisi:

- 18 mesi circa per raccolta campioni ematici di circa 250 pazienti BrS, analisi genetica (esoma) presso il Next Generation Sequencing Core - settore di Bioscienze del CRS4 e validazione delle mutazioni riscontrate tramite sequenziamento Sanger.
- 12 mesi circa per elaborazione *Shangai score* ed analisi dei 4 biomarcatori in collaborazione con equipe laboratorio di Biochimica dell'Università di Sassari/Cagliari.
- 6 mesi circa per elaborazioni statistiche.

Table 1 Clinical data and Shanghai Scores of BrS patients with serum biomarker profiling

Cohort ^a	Research ID	Sex	Age ^b	Shanghai score (ShS)					Shanghai score total ^h	Biomarker ⁱ
				ECG ^c	Clinical history ^d	Family history ^e	Genetics ^f	Mutation ^g		
SickKids (Discovery)	HRC095	M	35-55	3.5	2	0	0	None	5.5	Positive
	HRC289	M	35-55	3.5	0	0	0.5	VUS: CACNA1C, KCNE3	3.5	Positive
	HRC0409	M	35-55	2	3	0	0	None	5	Positive
Zurich	ZH-BrS150	M	35-55	3.5	0	0	0.5	SCN5A c.1007C>T (p. Pro336Leu)	4	Positive
	ZH-BrS169	M	35-55	3	1	0	0	None	4	Positive
	ZH-BrS173	M	M	2	0	2	0.5	VUS: RANGRF	4.5	Positive
	ZH-BrS196	F	35-55	3.5	0	2	0.5	SCN5A c.3352C>T (p.Gln1118Ter)	6	Positive
	ZH-BrS197	M	15-35	3.5	0	0	0.5	SCN5A c.844C>G (p.Arg282Gly)	4	Positive
	ZH-BrS200	M	15-35	2	0	2	0.5	SCN5A c.3508 + 1G>A	4.5	Positive
	ZH-BrS240	F	55+	3.5	0	0	0.5	SCN5A c.3508 + 1G>A	4	Positive
	ZH-BrS250	F	55+	2	0	2	0		4	Positive
	ZH-BrS253	M	35-55	3.5	3	0	0.5		7	Positive
	ZH-BrS256	M	55+	3.5	1	0	0.5	SCN5A c.4501C>G (p.Leu1501Val)	5	Positive
	ZH-BrS263	M	15-35	3.5	3	0	0	None	6.5	Positive
	ZH-BrS258	M	35-55	3.5	2	0	0	None	5.5	Positive
Münster	12819-4	M	35-55	2	0	2	0.5	SCN5A c.4387A>T, (p.Asn1463Tyr)	4.5	Positive
	12924-1	M	55+	3.5	3	0	0		6.5	Positive
	10021-49	M	35-55	2	0	2	0.5	SCN5A c.4477_4479del (p.Lys1493del)	4.5	Positive
Mayo Clinic	BrSM-01	M	35-55	2	0	2	0.5	SCN5A c.1127 G>A (p.Arg376Cys)	4.5	Positive
	BrSM-02	F	35-55	3.5	0	2	0.5	SCN5A c.5027 T>C (p.Met1676Thr)	6	Positive
	BrSM-04	M	35-55	3.5	0	0	0.5	SCN5A c.3695 G>A (p.Arg1232Trp)	4	Positive

^aSource of samples defined as a discovery cohort (SickKids) and validation cohorts (Zurich, Münster, and Mayo Clinic).

^bAge at time of blood draw.

^cECG (12-lead/ambulatory) as defined by the Shanghai criteria where 3.5 points = spontaneous type 1 Brugada ECG pattern at nominal or high leads, 3 points = fever-induced type 1 Brugada ECG pattern at nominal or high leads, and 2 points = type 2 or three Brugada ECG pattern that converts with provocative drug challenge.

^dClinical history as defined by the Shanghai criteria where 3 points = unexplained cardiac arrest or documented ventricular fibrillation/polymorphic ventricular tachycardia, 2 points = either nocturnal agonal respirations or suspected arrhythmic syncope, 1 point = syncope of unclear mechanism/unclear aetiology, 0.5 points = atrial flutter/fibrillation in patients under 30 years without alternative aetiology.

^eFamily history as defined by the Shanghai criteria where 2 points = first or second degree relative with definite BrS, 1 point = suspicious SCD (fever, nocturnal, Brugada aggravating drugs) in a first or second degree relative, 0.5 points = unexplained SCD less than 45 years in first- or second-degree relative with negative autopsy.

^fGenetics as defined by the Shanghai criteria where 0.5 points = probable pathogenic mutation in Brugada Syndrome susceptibility gene.

^gMutation found in individual; no genetic data available.

^hTotal Shanghai score (ShS) as defined by the Shanghai criteria where a score of ≥ 3.5 is a probable/definite diagnosis of BrS, 2-3 points is a possible diagnosis of BrS, and < 2 is non-diagnostic of Brugada Syndrome.

ⁱBrS biomarker result.



Saggio ELISA conferma presenza di anticorpi vs connexin-43 (A), cardiac α -actin (B), skeletal α -actin (C) e keratin-24 (D) nel gruppo di studio e di validazione vs controlli.

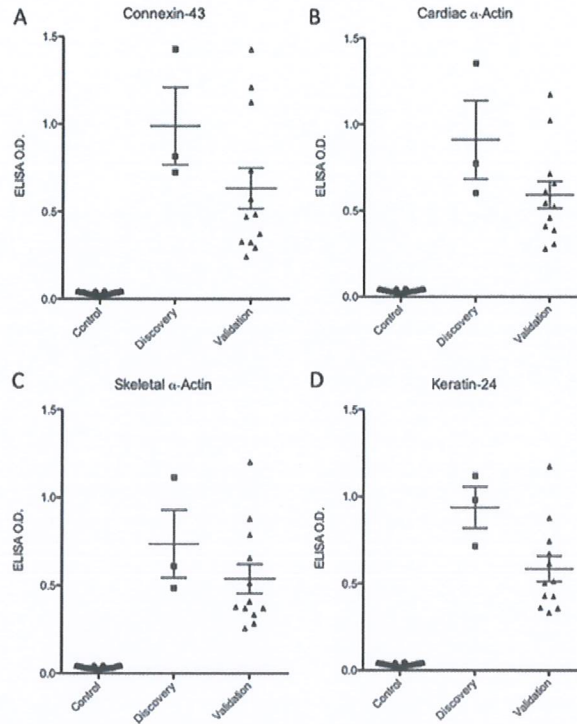


Figura 1: I dati di densità ottica rilevati nel gruppo BrS e nella coorte di conferma sono significativamente elevati rispetto ai dati rilevati nei campioni controllo.¹⁰

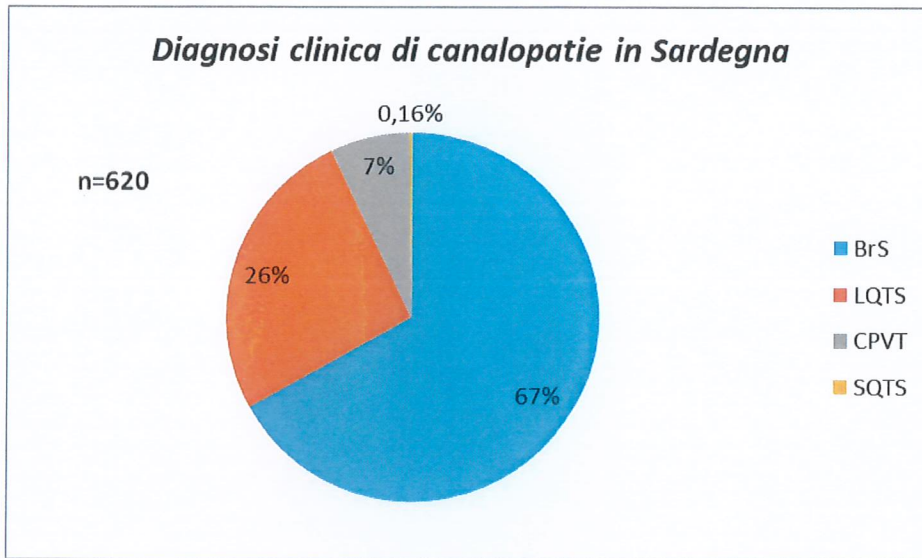
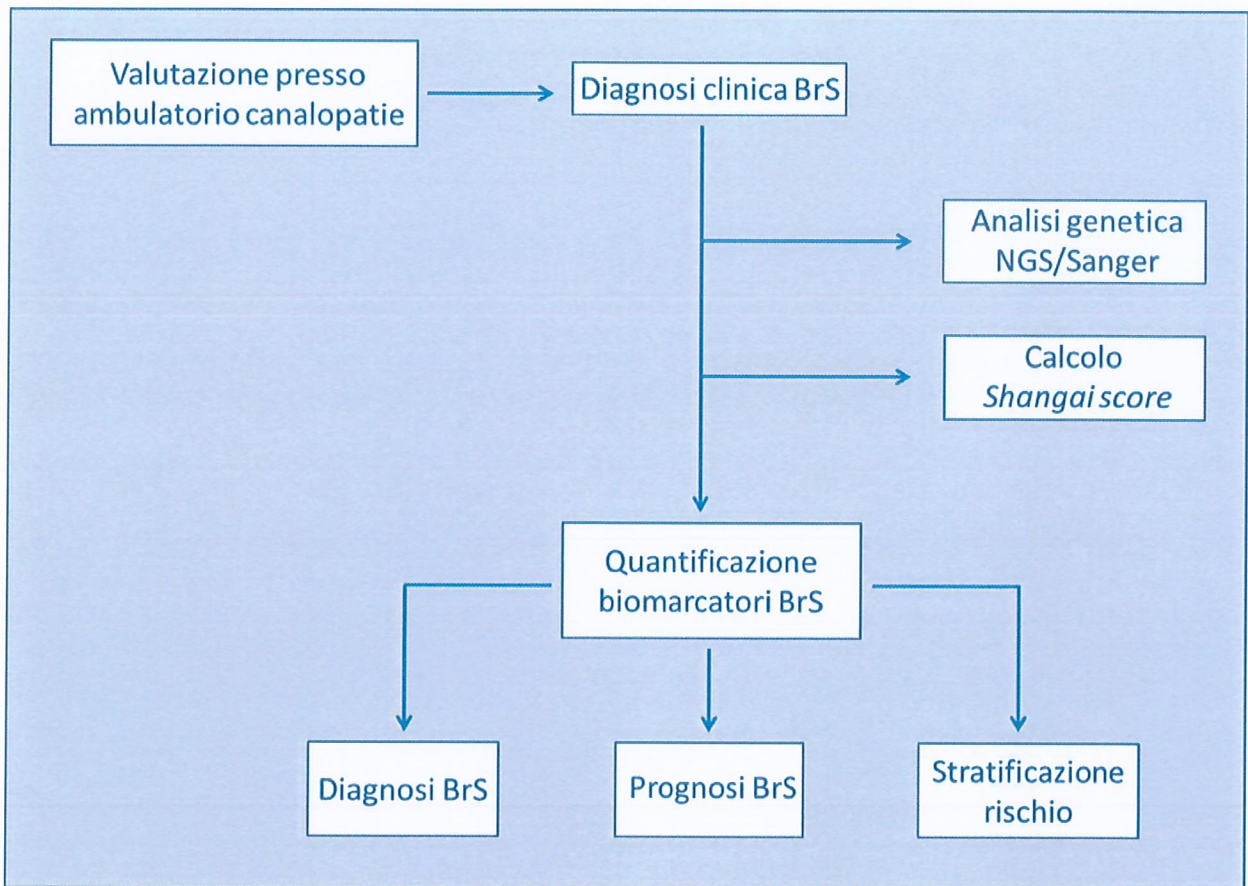


Figura 2: Diagnosi clinica di canalopatie in Sardegna

Su un totale di 620 soggetti che hanno ricevuto finora diagnosi clinica di canalopatia il 67% manifestano BrS, il 26% LQTS, il 7% CPVT e 1 solo paziente SQTS.



Rappresentazione schematica progetto di ricerca





Attività lavorativa prevista

- 1) **Valutazione pazienti con sospetta diagnosi di BrS** presso ambulatorio canalopatie.
- 2) **Prelievo** campione ematico paziente con diagnosi clinica BrS.
- 3) **Estrazione DNA e siero**, stoccaggio a -20°C.
- 4) **Sequenziamento NGS e validazione Sanger** delle mutazioni riscontrate.
- 5) **Calcolo *Shangai score*** dei pazienti BrS sulla base della storia clinica, familiare e genetica.
- 6) Quantificazione biomarcatori BrS nel siero di 250 soggetti (BrS, LQTS, CPVT, FVI e controlli).
- 7) Analisi statistiche e correlazioni per valutare diagnosi, prognosi e stratificazione del rischio di MCI nei pazienti BrS

Materiale e Strumentazione necessaria:

- estrattore acidi nucleici,
- centrifuga refrigerata,
- sequenziatore NGS e Sanger,
- quantificatore DNA,
- termoblocco per provette 1,5-2 ml,
- termociclatore,
- microcentrifuga,
- lettore saggi immunoenzimatici,
- plasticeria laboratorio,
- assay per dosaggio DNA,
- reagenti sequenziamento NGS e Sanger,
- saggi immunoenzimatici,
- software per interpretazione analisi genetiche.



COSTI PROGETTO

Tabella A: Costo complessivo del progetto

	Numero	Disponibilità (mesi)	Costi a carico del progetto (3 anni)
Borsa di ricerca/contratto di ricerca UO Cardiologia Biologo	1	36	150.000€
Borse di ricerca/contratti di ricerca UO Cardiologia Tecnico/Statistico	1-2	6-12	30.000€
Spese reagenti ed analisi (Tabelle B e C)	2	36	208.000€
Spese extra (Tabella D)			27.000€
Totale			415.000€

Tabella B: Costi previsti per analisi genetiche di circa 250 pazienti BrS

DIAGNOSI GENETICA BrS (n=250)	COSTO SINGOLO CAMPIONE	COSTO COMPLESSIVO PREVISTO
WES Agilent v6+UTRr2 (Next Generation Sequencing Core - settore di Bioscienze del CRS4)	500€	125.000€
Reagenti e analisi Sanger	60 €	15.000€
Software analisi	6.000 €/anno	18.000€
Totale		158.000 €



Tabella C: Costi previsti per test immunoenzimatici in circa 250 campioni

SAGGI IMMUNOENZIMATICI	COSTO SINGOLO CAMPIONE	COSTO COMPLESSIVO PREVISTO
Assay Kit	100 €	25.000€
Strumento (operatore, reagenti)	100 €	25.000€
Totale		50.000 €

Tabella D: Spese Extra

	COSTO ANNUO	COSTO COMPLESSIVO PREVISTO
Partecipazione congressi, convegni, seminari	6.000 €	18.000€
Pubblicazioni	3000 €	9.000€
Totale		27.000 €



Bibliografia

1. Maria Teresa La Rovere La *prevenzione della morte improvvisa nelle nuove linee guida europee*, G Ital Cardiol, vol17, Febbraio 2016.
2. Itoh H, Crotti L, Aiba T, Spazzolini C, Denjoy I, Fressart V, Hayashi K, Nakajima T, Ohno S, Makiyama T, Wu J, Hasegawa K, Mastantuono E, Dagradi F, Pedrazzini M, Yamagishi M, Berthet M, Murakami Y, Shimizu W, Guicheney P, Schwartz PJ, Horie M. *The genetics underlying acquired long QT syndrome: impact for genetic screening*. Eur Heart J. 2016 May 7;37(18):1456-64. doi: 10.1093/eurheartj/ehv695. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26715165; PMCID: PMC4914885.
3. Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C. *HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013*. Heart Rhythm. 2013 Dec;10(12):1932-63. doi: 10.1016/j.hrthm.2013.05.014. Epub 2013 Aug 30. PMID: 24011539.
4. Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekvål TM, Spaulding C, Van Veldhuisen DJ; Task Force per il Trattamento dei Pazienti con Aritmie Ventricolari e la Prevenzione della Morte Cardiaca Improvvisa della Società Europea di Cardiologia. *Linee guida ESC 2015 per il trattamento dei pazienti con aritmie ventricolari e la prevenzione della morte cardiaca improvvisa. Task Force per il Trattamento dei Pazienti con Aritmie Ventricolari e la Prevenzione della Morte Cardiaca Improvvisa della Società Europea di Cardiologia (ESC)* G Ital Cardiol (Rome). 2016 Feb;17(2):108-70. Italian. doi: 10.1714/2174.23496. PMID: 27029760.
5. Fauchier L, Isorni MA, Clementy N, Pierre B, Simeon E, Babuty D. *Prognostic value of programmed ventricular stimulation in Brugada syndrome according to clinical presentation: an updated meta-analysis of worldwide published data*. Int J Cardiol. 2013 Oct 3;168(3):3027-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.04.146. Epub 2013 May 1. PMID: 23642819.
6. Nademanee K, Veerakul G, Chandanamatta P, Chaothawe L, Ariyachaipanich A, Jirasirojanakorn K, Likittanasombat K, Bhuripanyo K, Ngarmukos T. *Prevention of ventricular fibrillation episodes in Brugada syndrome by catheter ablation over the anterior right ventricular outflow tract epicardium*. Circulation. 2011 Mar 29;123(12):1270-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972612. Epub 2011 Mar 14. PMID: 21403098.
7. European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society, Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, Gregoratos G, Klein G, Moss AJ, Myerburg RJ, Priori SG, Quinones MA, Roden DM, Silka MJ, Tracy C, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Antman EM, Anderson JL, Hunt SA, Halperin JL, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG,



- Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death)*. J Am Coll Cardiol. 2006 Sep 5;48(5):e247-346. doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.010. PMID: 16949478.
8. Sarkozy A, Boussy T, Kourgiannides G, Chierchia GB, Richter S, De Potter T, Geelen P, Wellens F, Spreeuwenberg MD, Brugada P. *Long-term follow-up of primary prophylactic implantable cardioverter-defibrillator therapy in Brugada syndrome*. Eur Heart J. 2007 Feb;28(3):334-44. doi: 10.1093/eurheartj/ehl450. Epub 2007 Jan 24. PMID: 17251258.
 9. Rosso R, Glick A, Glikson M, Wagshal A, Swissa M, Rosenhek S, Shetboun I, Khalamizer V, Fuchs T, Boulos M, Geist M, Strasberg B, Ilan M, Belhassen B; Israeli Working Group on Cardiac Pacing and Electrophysiology. *Outcome after implantation of cardioverter defibrillator [corrected] in patients with Brugada syndrome: a multicenter Israeli study (ISRABRU)*. Isr Med Assoc J. 2008 Jun;10(6):435-9. Erratum in: Isr Med Assoc J. 2008 Jul;10(7):549. PMID: 18669142.
 10. Chatterjee D, Pieroni M, Fatah M, Charpentier F, Cunningham KS, Spears DA, Chatterjee D, Suna G, Bos JM, Ackerman MJ, Schulze-Bahr E, Dittmann S, Notarstefano PG, Bolognese L, Duru F, Saguner AM, Hamilton RM. *An autoantibody profile detects Brugada syndrome and identifies abnormally expressed myocardial proteins*. Eur Heart J. 2020 Aug 7;41(30):2878-2890. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa383. PMID: 32533187.
 11. Wilde AAM, Lodder EM. *A highly specific biomarker for Brugada syndrome. Also too good to be true?* Eur Heart J. 2020 Aug 7;41(30):2891-2893. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa468. PMID: 32558881.
 12. Hamilton RM, Chatterjee D, Saguner AM. *Biomarkers in inherited arrhythmias: opportunities for validation and collaboration*. Eur Heart J. 2020 Dec 14;41(47):4521-4522. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa672. PMID: 32918454.


CASU
GAVINO
REGIONE
AUTONOMA
DELLA
SARDEGNA
17.10.2022
06:26:11
UTC