



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
“GUGLIELMO MARCONI”

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Sindrome di Brugada: caratterizzazione mediante voltage-clamp delle mutazioni
dei canali del sodio**

Tesi di laurea in
COMPUTATIONAL CARDIOLOGY

Relatore

Prof. Ing. Stefano Severi

Correlatrice

Dott.ssa Chiara Bartolucci

Presentata da

Luigi Orlandi

Anno accademico 2020/2021

Indice

Indice	2
Introduzione.....	4
Capitolo 1	6
Anatomia ed elettrofisiologia del cuore	6
1.1 Il cuore	6
1.2 Potenziale d'azione delle cellule del miocardio	7
1.3 Canali ionici del sodio voltaggio-dipendenti.....	9
1.4 Sistema di conduzione	11
1.5 L'elettrocardiogramma (ECG).....	12
Capitolo 2	15
Sindrome di Brugada	15
2.1 Introduzione alla patologia e sistemi per la diagnosi	15
2.2 Etiopatogenesi	16
2.3 Aspetti genetici	18
2.4 Sintomi, terapia e stratificazione del rischio	19
2.5 Prospetti futuri	20
Capitolo 3	21
Esperimenti di Voltage-Clamp.....	21
3.1 Introduzione	21
3.2 Voltage Clamp a due elettrodi	21
3.3 Voltage Clamp a singolo elettrodo	23
3.4 Determinazione delle correnti caratteristiche, corrente di Na	25
Capitolo 4	27
Strategia di ricerca sulla banca dati PubMed: raccolta dei dati	27
Capitolo 5	34
Analisi degli studi	34
5.1 Simona Casini et al., European Society of Cardiology (2007)	34
5.2 Christian Gütter et al., Frontiers in Physiology (2013)	41
5.3 Cristina Balla et al., International Journal of Molecular Sciences (2021)	46
5.3.1 Elettrofisiologia delle correnti	47
5.3.2 Caratterizzazione funzionale della variante P1310L	49

5.3.3 Caratterizzazione funzionale della mutazione del canale Ins1687GR	52
5.4 Michelle M. Monasky et al., “International Journal of Molecular Sciences” (2021)	53
5.4.1 Risultati.....	55
Conclusioni.....	57
Ringraziamenti	58
Bibliografia.....	59

Introduzione

La Sindrome di Brugada è una patologia cardiaca descritta nel 1992 dai fratelli Brugada che si associa a un rischio aumentato di morte improvvisa in assenza di una cardiopatia strutturale. L'incidenza di eventi letali è più elevata nei maschi nella terza e quarta decade di vita. È una patologia genetica che colpisce alcuni canali ionici, strutture poste sulla superficie delle cellule del cuore, causandone un malfunzionamento e creando così degli squilibri nell'attività elettrica aumentando il rischio di insorgenza di aritmie ventricolari potenzialmente fatali. Tipicamente gli uomini manifestano la malattia più frequentemente delle donne; essa ha una prevalenza stimata di 5 su 10.000 e una trasmissione autosomica dominante; pertanto, la probabilità di trasmettere la patologia è del 50% a ogni gravidanza. Data l'origine genetica della sindrome, indagare la storia familiare è molto importante. I pazienti con sindrome di Brugada possono avere storia familiare positiva per morte improvvisa in età giovanile (cioè un'età inferiore ai 50 anni) per cause non note, familiari a cui è stata posta diagnosi di epilessia (non per una associazione tra le due malattie, ma per la possibile confusione tra episodi epilettici e sincopi aritmiche) oppure storia di aborti tardivi in famiglia. È caratterizzata dal punto di vista elettrocardiografico da un sopraslivellamento del tratto ST nelle derivazioni precordiali di destra (V1-V2-V3, al quarto spazio intercostale a destra e sinistra dello sterno), le derivazioni che registrano l'attività elettrica del tratto di efflusso del ventricolo destro.

Nel lavoro tratterò delle caratterizzazioni in vitro dell'elettrofisiologia di correnti ioniche differenti, a seconda del tipo di mutazione riscontrata; parlerò di misurazioni effettuate con il Voltage-Clamp, tecnica utilizzata per misurare le correnti di ioni attraverso la membrana di cellule eccitabili, mantenendo la differenza di potenziale tra l'interno e l'esterno della membrana ad un potenziale di Holding (potenziale di partenza definito). Queste misurazioni vengono effettuate su cellule in cui si fa esprimere il gene che esprime il fenotipo normale, chiamate cellule wild-type (o eterologhe), e su cellule in cui viene espresso il gene con la mutazione nota.

Gli esperimenti di Voltage-Clamp vengono eseguiti mediante dei protocolli di attivazione: questi hanno il particolare scopo di capire come la singola corrente dipenda dallo specifico potenziale d'azione che le viene conferito e ci si è resi conto che andando ad applicare un potenziale di Holding via via decrescente (-80 mV/ -100 mV/ -120 mV) si osservava un maggiore o minore effetto della mutazione. In particolare, rendendo sempre più negativo il potenziale di partenza delle cellule eccitabili la perdita di funzione della corrente diveniva sempre più evidente. A questo punto ci siamo chiesti se possano esistere delle condizioni in vivo che fanno sì che il potenziale di riposo delle cellule si iperpolarizzi e se questi eventi contribuiscano all'arresto cardiaco improvviso. Un fattore che ha come chiara conseguenza la iperpolarizzazione del potenziale d'azione a riposo delle cellule è l'ipocalemia.

I valori fisiologici di potassio nel sangue possono subire delle variazioni talvolta importanti dovute solitamente all'attività fisica, alla sudorazione, all'alimentazione e può variare con l'alternanza giorno-notte e con la frequenza cardiaca. Tutti questi fattori possono far sì che si

possa avere una quantità di potassio nel sangue anche significativamente inferiore in specifici momenti della giornata nello stesso soggetto.

Nel primo capitolo andrò ad analizzare la struttura anatomica cardiaca, come i potenziali d'azione si propagano all'interno del tessuto miocardico e come questi segnali possono essere misurati in diagnostica. Nel secondo capitolo tratterò la sindrome, analizzandola nel suo insieme, studiandone etiopatogenesi, sintomi, diagnosi e terapia. Nel terzo capitolo parlerò di come essere effettuati in laboratorio caratterizzazioni in vitro dell'elettrofisiologia cardiaca mediante la tecnica del voltage-clamp. Nel quarto capitolo tratterò del reperimento dei dati attraverso il Database PubMed con una breve spiegazione su come e perché sono stati scelti gli articoli analizzati. Nell'ultimo capitolo analizzerò ciò che fino ad ora è stato fatto in letteratura in merito alle caratterizzazioni in vitro della corrente di sodio implicata negli studi elettrofisiologici della sindrome di Brugada, mediante la tecnica del Voltage-Clamp. Andrò ad analizzare come questi esperimenti sono stati portati avanti e con quali protocolli di attivazione, quale potenziale di Holding è stato utilizzato nello studio, se quest'ultimo è stato fatto variare e con quali effetti.

Capitolo 1

Anatomia ed elettrofisiologia del cuore

1.1 Il cuore

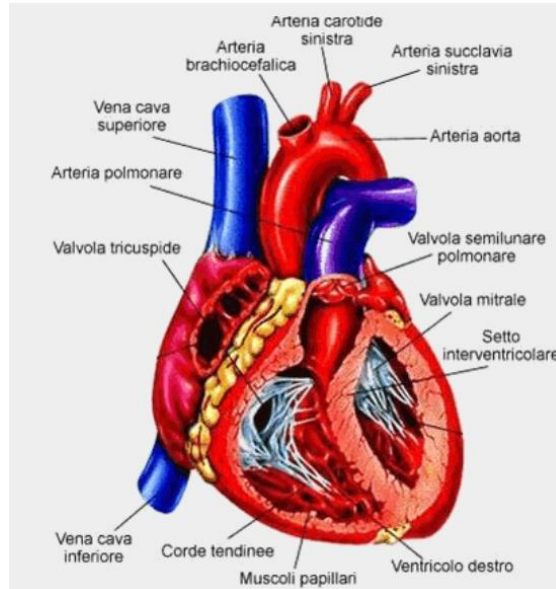


Figura 1: rappresentazione del cuore [17]

Il cuore (Figura 1) è un organo cavo muscolare con quattro cavità, occupa una posizione asimmetrica con l'apice diretto anteriormente, inferiormente e verso sinistra. Le sue quattro cavità sono funzionalmente appaiate a due a due, separate dal setto cardiaco. Ogni paio di cavità consiste di un atrio, a parete sottile, e di un ventricolo, a parete spessa. Ogni atrio comunica con il corrispondente ventricolo attraverso l'orifizio atrioventricolare, tramite una valvola cuspidata. Esso si trova nella cavità toracica e più precisamente nel mediastino medio. La base guarda in alto, indietro e a destra, mentre l'apice è rivolto in basso, in avanti e a sinistra. È compreso tra la terza e sesta costa e corrisponde posteriormente alla zona tra la quinta e l'ottava vertebra toracica. Il cuore è contenuto nel pericardio, in questo si distinguono due componenti, il pericardio fibroso (sacco fibroso del pericardio), più esterno, e il pericardio sieroso, interno. Quest'ultimo è costituito da due foglietti, uno parietale, che riveste internamente il sacco fibroso, e uno viscerale (o epicardio), che è aderente al miocardio. I due foglietti sierosi del pericardio sono separati da uno spazio virtuale chiamato cavità pericardica e contenente normalmente da 20 a 50 ml di liquido chiaro e roseo che permette al cuore una discreta libertà di movimento e di variazione di forma all'interno di questo rivestimento, minimizzando l'attrito. Lo scheletro fibroso del cuore da attacco ai fasci muscolari che costituiscono la parete degli atri e dei ventricoli. Gli orifizi che mettono in comunicazione le cavità ventricolari con i vasi efferenti sono anch'essi protetti da valvole che impediscono il reflusso la valvola semilunare polmonare nel ventricolo destro per l'arteria polmonare, la valvola semilunare aortica nel ventricolo sinistro per l'aorta. Nella cavità toracica, l'atrio destro è collocato in posizione anteriore, inferiore e a destra rispetto all'atrio sinistro. Nella volta dell'atrio destro si aprono gli sbocchi delle due vene cave, che portano il sangue non ossigenato dai tessuti periferici al cuore, e quello del seno coronario con la sua valvola (valvola di Tibesio), che convoglia il sangue refluo dal circolo coronarico. Anche l'orifizio

della vena cava inferiore è fornito di una valvola (valvola di Eustachio). La valvola tricuspide è la valvola atrioventricolare di destra e forma praticamente il pavimento dell'atrio; si inserisce sull'anello fibroso dell'ostio atrioventricolare di destra ed è composta da tre lembi, da cui il nome. Nel ventricolo destro si distinguono una via di afflusso e una di efflusso: quella di afflusso è data dall'ostio atrioventricolare destro con la valvola tricuspide, attraverso cui il sangue dall'atrio entra nel ventricolo, da qui origina la via di efflusso, costituita dall'ostio dell'arteria polmonare con le sue tre valvole semilunari, che convogliano il sangue nel lume del tronco della arteria polmonare, per immetterlo nella piccola circolazione. La muscolatura del ventricolo destro si solleva in numerosi fascetti muscolari (trabecole carnee) e nei tre muscoli papillari (anteriore, posteriore e mediale), i cui numerosi tendini (corde tendinee) si impiantano sui margini liberi della valvola tricuspide. Nella parete posteriore dell'atrio sinistro si aprono le quattro vene polmonari, due a destra e due a sinistra. Il setto interatriale presenta una leggera depressione che corrisponde alla fossetta ovale dell'atrio destro. In avanti questa depressione è limitata da una plica semilunare che rappresenta il residuo della valvola del forame ovale. In basso e in avanti presenta l'ostio della valvola bicuspidale o mitrale che dà accesso al ventricolo sinistro. La parete laterale presenta l'auricola sinistra, molto ricca di tessuto muscolare. Il ventricolo sinistro è caratterizzato da una parete muscolare più spessa, che lo porta ad avere una forza di contrazione maggiore rispetto a quella del ventricolo destro [1].

1.2 Potenziale d'azione delle cellule del miocardio

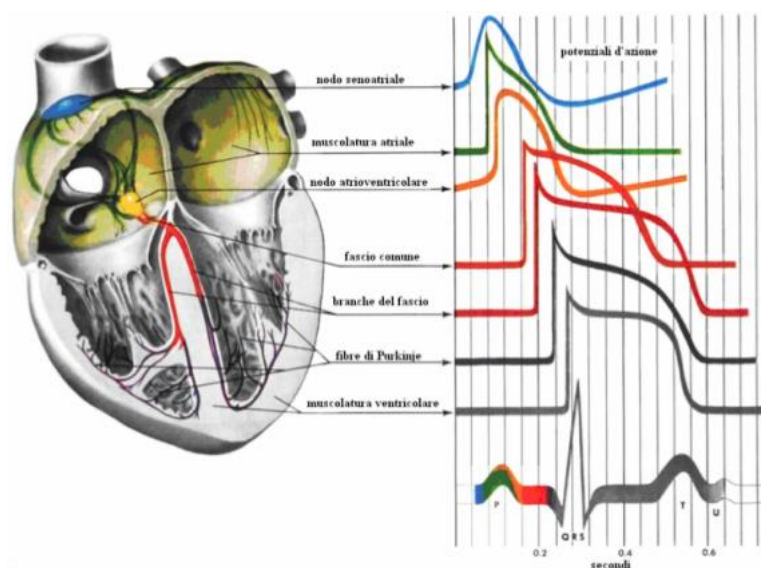


Figura 2: potenziali d'azione del cuore [18]

In condizioni normali, l'attivazione del cuore è dovuta ad un impulso che origina in una cellula o in un gruppo di cellule, costituenti il pacemaker, e dalla propagazione di questo impulso a tutte le fibre degli atri e dei ventricoli, come si può osservare in figura (Figura 2). L'arrivo del segnale elettrico alle fibre contrattili del cuore ne determina la contrazione. La regolare attività ritmica richiede la presenza di fibre automatiche specializzate. La contrazione coordinata degli atri e dei ventricoli richiede un sistema di distribuzione dell'impulso elettrico alle fibre muscolari di queste cavità in frequenza appropriata e al tempo giusto. Entrambe

queste funzioni sono esercitate da gruppi specializzati di fibre cardiache. L'automaticità che è alla base dell'attività di pacemaker è una proprietà unica non solo delle fibre del nodo seno-atriale, ma anche degli altri gruppi di fibre atriali specializzate e delle cellule del sistema di His-Purkinje. Il sistema di conduzione comprende le fibre delle vie internodali, il fascio di Bachmann, il nodo atrio-ventricolare, il fascio di His e le sue branche e le fibre periferiche del Purkinje.

Le cellule cardiache hanno una composizione ionica intracellulare diversa da quella dei liquidi extracellulari. Per le nostre considerazioni, gli ioni più importanti sono il sodio ed il potassio. La concentrazione intracellulare del K^+ è maggiore di circa 30 volte quella della concentrazione extracellulare, mentre la concentrazione intracellulare del Na^+ è di circa 30 volte inferiore. Data questa differenza e dato che la membrana a riposo è più permeabile al K^+ che al Na^+ , la membrana della fibra a riposo è polarizzata. L'entità di questa polarizzazione può essere misurata inserendo un microelettrodo nella cellula e misurando la differenza di potenziale ai capi della membrana cellulare. Con l'inizio dell'eccitazione, si ha una modificazione della permeabilità della membrana che permette agli ioni Na^+ , che portano carica positiva, di muoversi rapidamente secondo il loro gradiente elettrochimico, attraverso la membrana ed entrare nella fibra. Questo rapido ingresso di cariche positive di Na^+ inverte il potenziale transmembrana, in modo che l'interno diventi 20-30 mV più positivo dell'esterno. Possiamo schematizzare questo procedimento in cinque differenti fasi (Figura 3):

- Fase 0 (fase di depolarizzazione rapida): dovuta quasi esclusivamente all'ingresso di ioni Na^+ , grazie all'apertura di specifici canali per il Na^+ . L'ingresso di sodio rende il potenziale meno negativo, così che continuamente nuovi canali per il Na^+ si aprono, aumentando il flusso (potenziale rigenerativo), fino ad un valore (-40mV), in cui tutti i canali Na^+ si aprono; l'ingresso di Na^+ rende l'interno della cellula positivo e l'esterno negativo, questa inversione della polarità di membrana è definita overshoot.
- Fase 1 (ripolarizzazione precoce): si ha una breve ripolarizzazione parziale dovuta ad una corrente transitoria in uscita di K^+ (detta I_{to}) e ad un aumento della permeabilità al Cl^- .
- Fase 2 (plateau): durante questa fase si ha ingresso di calcio attraverso canali appositi definiti long lasting (LL), cioè si attivano e disattivano molto lentamente, sono anch'essi regolati dal voltaggio e si aprono quando il potenziale diviene meno negativo. Si ha il plateau quando l'ingresso di ioni Ca^{2+} eguaglia la fuoriuscita di ioni K^+ .
- Fase 3 (ripolarizzazione finale): quando i canali Ca^{2+} si chiudono continua la fuoriuscita di K^+ , in questo modo l'interno della cellula diventa man mano negativo, mentre l'esterno diviene positivo.
- Fase 4 (ripristinamento): nell'ultima fase si ha il ripristino delle concentrazioni ioniche ai valori di riposo, mediante tre principali trasportatori attivi: una Na^+/K^+ -ATPasi che mediante l'idrolisi dell'ATP espelle $3Na^+$ in cambio di $2K^+$, uno scambiatore Na^+/Ca^{2+} che, sfruttando il gradiente di concentrazione del sodio, espelle uno ione

calcio facendo entrare tre ioni sodio ed una Ca^{+} -ATPasi, che espelle ioni calcio mediante idrolisi di ATP.

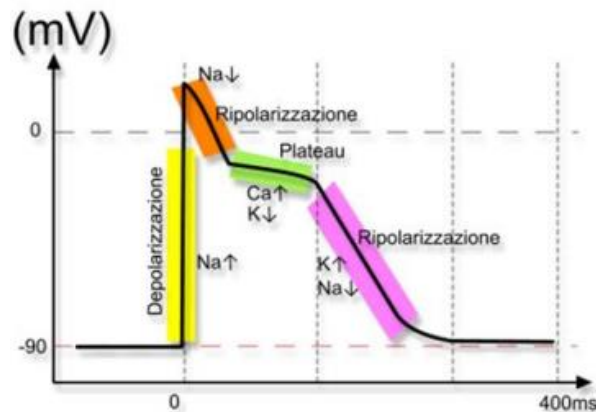


Figura 3: PDA di un miocita

Un miocita che sia stato depolarizzato non sarà più disponibile per un nuovo potenziale d'azione fino a che esso non si sia ripolarizzato parzialmente, l'intervallo fra il potenziale d'azione e il momento in cui il miocita è disponibile per un nuovo potenziale è definito Periodo Refrattario Assoluto (PRA), nel caso delle risposte rapide esso va dall'inizio della fase 0 a circa metà della fase 3. La refrattarietà è dovuta alla chiusura delle barriere h dei canali Na^{+} . La completa eccitabilità non viene ristabilita fino a quando non si ha completa ripolarizzazione del miocita, questo intervallo che segue il PRA è chiamato Periodo Refrattario Relativo. Questo periodo è indispensabile per il corretto funzionamento del cuore, poiché permette un alto rendimento della funzione di pompa del cuore, in quanto il ventricolo può riempirsi completamente di sangue prima di eseguire un'altra contrazione; inoltre permette di avere una netta distinzione tra fase pulsoria (sistole) e fase di riposo (diastole), in maniera tale da permettere l'apporto di sangue attraverso le coronarie, che può avvenire solo in fase diastolica [2].

1.3 Canali ionici del sodio voltaggio-dipendenti

Il canale del sodio, o, specificando meglio, i vari tipi di canali del sodio, sono proteine integrali di membrana da cui sono formati i canali ionici che conducono i cationi del sodio (Na^{+}) attraverso la membrana cellulare. Essi sono molto numerosi sia in prossimità del livello del cono d'emergenza dell'assone dei motoneuroni, che al livello del sistema di conduzione cardiaco ove permettono la generazione e la trasmissione di stimoli pacemakers.

I canali del sodio sono costituiti da una grossa sub-unità α che si associa ad altre proteine, come le sub-unità β . Una α -subunità forma il cuore del canale. Quando la proteina della sub-unità α viene espressa da una cellula, riesce a formare canali che conducono il Na^{+} in una modalità regolata dalla tensione elettrica (voltage-gated way), anche se le sub-unità β o altre proteine modulatorie note non vengono espresse. Quando proteine accessorie si assemblano con sub-unità α , il complesso risultante può mostrare un'alterata dipendenza dalla tensione elettrica oppure localizzarsi in parti diverse della cellula.

La sub-unità- α ha quattro domini ripetuti, etichettati I, II, III, IV, e ognuno contiene sei regioni trans-membranarie, etichettate da S1 a S6. La regione altamente conservata S4 agisce come

sensore di tensione elettrica del canale, come si può osservare in figura (Figura 4). La sensibilità alla tensione elettrica di questo canale è dovuta ad aminoacidi positivi che si trovano in ogni terza posizione. Quando vengono stimolati da un cambiamento della tensione elettrica trans-membranaria, questa regione si muove verso il lato extracellulare della membrana cellulare, facendo sì che il canale diventi permeabile agli ioni. Gli ioni vengono trasportati passivamente attraverso un poro, che può rompersi in due regioni. La porzione più esterna (rivolta alla parte extracellulare) del poro è formata dalle "P-loops" (la regione tra S5 e S6) dei quattro domini. Questa regione è la parte più stretta del poro ed è responsabile della sua selettività agli ioni. La porzione più interna del poro (rivolta alla parte citoplasmatica) è formata dalle regioni S5 e S6 combinate dei quattro domini. La regione che unisce i domini III e IV è importante per il funzionamento del canale. Questa regione scollega il canale dopo attivazione prolungata, inattivandolo.

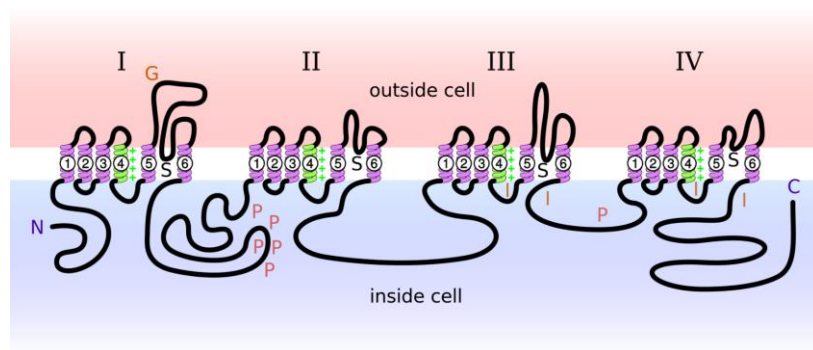


Figura 4: canale del sodio [4]

I canali del sodio regolati dalla tensione (voltage-gated) hanno tre tipi di stati:

- Disattivato
- Attivato
- Inattivo

Si pensa che i canali nello stato disattivato siano bloccati nel loro lato intracellulare da una "porta di attivazione", che viene rimossa in risposta allo stimolo che apre il canale. Si pensa che la capacità per inattivare sia dovuta ad una "spina rimorchiata" (formata dai domini III e IV della sub-unità alfa), nota come "porta di inattivazione", che blocca l'interno del canale poco dopo la sua attivazione. Quando vi giunge un Potenziale d'azione, il canale rimane inattivato per un paio di millisecondi dopo la depolarizzazione. Tale fase di inattivazione si conclude quando il potenziale di membrana della cellula si ripolarizza seguendo la fase discendente del potenziale d'azione stesso. Ciò permette ai canali di poter essere riattivati ancora durante il successivo potenziale d'azione. Il comportamento di questo canale può essere modellato con uno schema di Markov o con il Modello di Hodgkin-Huxley. Nel primo modello ogni canale occupa uno stato distinto, con proprie equazioni differenziali che ne descrivono le transizioni tra uno stato e l'altro; nel secondo i canali sono considerabili come una popolazione affetta da tre variabili di regolazione indipendenti, ognuna delle quali può assumere un valore compreso tra 1 (permeabilità totale agli ioni) e 0 (totale impermeabilità).

Il prodotto di queste variabili rappresenta la percentuale di conduzione dei canali. Il modello Hodgkin-Huxley è rappresentabile con l'equivalente schema Markoviano [4].

1.4 Sistema di conduzione

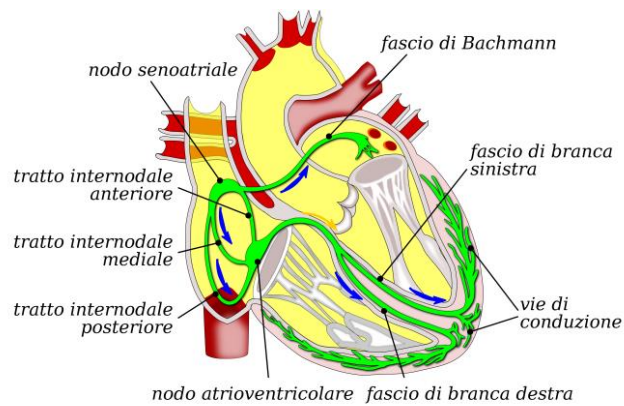


Figura 5: sistema di conduzione

Il sistema di conduzione elettrica (Figura 5) del cuore è un tessuto che crea e conduce un impulso elettrico dagli atri a tutto il corpo ventricolare del cuore, creando così la contrazione adatta a perfondere con il sangue tutto l'organismo.

Il sistema di conduzione del miocardio è formato da:

- Nodo senoatriale.
- Nodo atrioventricolare.
- Fascio di His.
- Branche (destra e sinistra).
- Fibre del Purkinje.

Il nodo senoatriale produce l'impulso nervoso che genera la contrazione del cuore. Questa proprietà è chiamata automatismo, ovvero quella di produrre spontaneamente lo stimolo che regola la frequenza cardiaca, è un vero e proprio segnapassi (pacemaker naturale) del cuore appunto esso è situato nell'atrio destro, vicino allo sbocco della vena cava superiore. Il nodo seno atriale emette ritmicamente un impulso che depolarizza il muscolo cardiaco adiacente, le onde che ne derivano si propagano attraverso gli atri fino a raggiungere la seconda struttura di conduzione specifica.

Il nodo atrioventricolare si trova nel pavimento dell'atrio destro a sinistra dell'orifizio del seno coronario, la sua estremità è in continuità con il miocardio atriale e con le fibre dei tratti internodali. Lo stimolo giunto nel nodo atrio ventricolare rallenta in modo che la depolarizzazione dei due atri possa essere completata, successivamente, riacquista velocità diffondendosi attraverso il successivo tessuto specializzato nella conduzione.

Il fascio di His è la continuazione del nodo atrio ventricolare ed è situato nella porzione membranosa e prossimale del setto interventricolare. Tale fascio si divide in due branche, destra e sinistra, per servire i due ventricoli. Perifericamente entrambe le branche del fascio comune si dividono e formano la rete subendocardiaca delle fibre del Purkinje, che si estendono nelle pareti ventricolari in rapporto diretto con le fibre della muscolatura ventricolare. Pertanto, non appena l'impulso elettrico partito dal nodo seno atriale arriva ai ventricoli, il cuore batte ed il sangue scorre a raggiungere tutte le parti del corpo. Lo stimolo che parte dal nodo del seno prende il nome di ritmo sinusale e propagandosi spegne gli altri centri sussidiari di regolazione del ritmo cardiaco che si trovano lungo il sistema di conduzione che sta a valle del nodo seno atriale. Esiste, inoltre, un ulteriore gruppo di fibre atriali costituito dal fascio di Bachmann e dalle vie intermodali di conduzioni dell'atrio destro. Il ciclo di contrazione e rilassamento del cuore si manifesta come una sequenza di onde di depolarizzazione e ripolarizzazione, che vengono rilevate sulla superficie corporea come differenze di potenziali variabili nel tempo, l'elettrocardiogramma e la registrazione nel tempo dell'attività elettrica del cuore [3].

1.5 L'elettrocardiogramma (ECG)

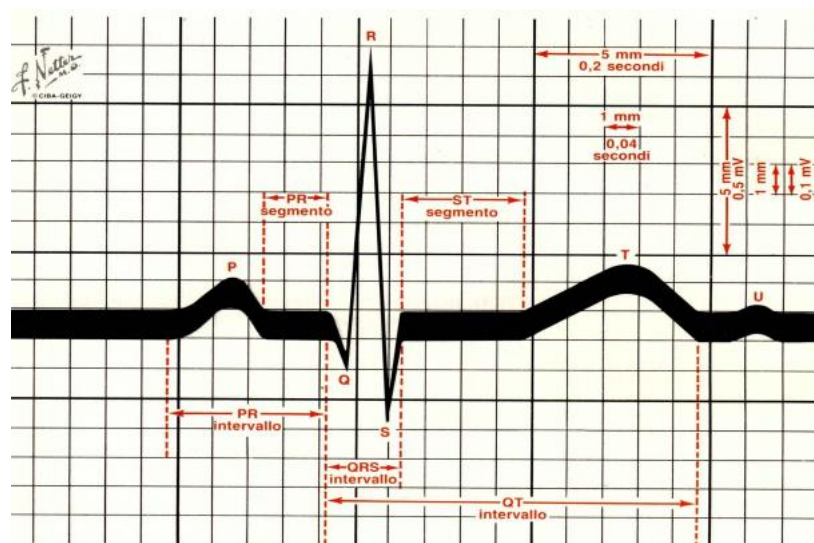


Figura 6: tracciato ECG

L'elettrocardiogramma (Figura 6) è un grafico rappresentante variazioni di voltaggio in rapporto al tempo. Tali variazioni, dovute alla depolarizzazione e ripolarizzazione del muscolo cardiaco, producono campi elettrici che raggiungono la superficie del corpo dove sono localizzati gli elettrodi. La carta su cui viene registrato l'elettrocardiogramma è divisa in linee spaziate di 1 mm sia in orizzontale che verticale. Quando il tracciato è standardizzato appropriatamente, ogni spazio verticale rappresenta una modificazione di voltaggio pari a 0,1 millivolt, ed ogni spazio orizzontale un intervallo di tempo di 0,04 secondi. Ogni quinta linea, orizzontale e verticale, è più marcata. L'intervallo di tempo fra le linee più marcate è di 0,2 secondi. Le modificazioni di voltaggio tra due linee più marcate è di 0,5 millivolt.

Sulla superficie cardiaca vengono posizionati degli elettrodi, i quali identificheranno un'asse, chiamato asse di una determinata direzione. A seconda di come è posizionato il vettore elettrico complessivo, che corrisponde alla somma di tutta l'attività elettrica cardiaca, sull'ECG verrà riportato qualcosa di diverso. Dipendentemente dalla linea sulla quale andiamo a valutare il vettore dell'attività elettrica, si avranno delle deflessioni più o meno importanti positive o negative. In particolare, definito l'asse di derivazione, se il vettore della corrente ha verso ad esso concorde, sul galvanometro misura una forte deflessione verso l'alto; mentre se il vettore ha verso opposto all'asse, si misura una forte deflessione verso il basso.

Inoltre, l'inclinazione del vettore rispetto all'asse di derivazione influenza tali deflessioni rendendole più o meno importanti. Le due situazioni non rilevabili sono quelle vettore corrente perpendicolare all'asse o assenza di corrente. Le connessioni elettriche convenzionali usate per registrare l'elettrocardiogramma sono le derivazioni degli arti, le derivazioni degli arti amplificate e le derivazioni precordiali.

Le derivazioni degli arti sono bipolari e identificano variazioni di potenziale elettrico tra due punti. La prima derivazione è la connessione tra gli elettrodi sul braccio sinistro e sul braccio destro. Il galvanometro è situato fra questi due punti di contatto. Quando il braccio sinistro si trova in un campo di forza positivo rispetto al braccio destro, nella I derivazione, si osserva una deflessione verso l'alto (positiva). La seconda derivazione è la connessione tra gli elettrodi della gamba sinistra e del braccio destro. Quando la gamba sinistra si trova in un campo di forze positive rispetto al braccio destro, in questa derivazione si rileva una deflessione verso l'alto. La terza derivazione è la connessione tra la gamba sinistra e il braccio sinistro; quando la gamba sinistra si trova in un campo di forze positive rispetto al braccio sinistro, si rileva in questa derivazione una riflessione positiva. Con tali derivazioni bipolari si analizza come il vettore elettrico superficiale si posiziona rispetto agli assi su un piano frontale.

Le derivazioni degli arti amplificate sono unipolari in quanto registrano le variazioni di potenziale in un punto (braccio destro, braccio sinistro, gamba sinistra) rispetto ad un altro punto in cui l'attività elettrica non varia significativamente durante la contrazione cardiaca. La derivazione viene detta amplificata per il particolare tipo di circuito elettrico che consente di ottenere una traccia di ampiezza aumentata rispetto alle più vecchie derivazioni unipolari di Wilson. La derivazione aVR rileva i potenziali elettrici del braccio destro riferiti ad un punto zero ottenuto unendo i cavi provenienti dal braccio sinistro e dalla gamba sinistra. La derivazione aVL registra i potenziali del braccio sinistro in relazione alla connessione dei cavi provenienti dal braccio destro e dal piede sinistro. La derivazione aVF rileva i potenziali del piede sinistro con riferimento al congiungimento dei cavi provenienti da entrambe le braccia.

Le derivazioni precordiali sono unipolari e vengono registrate in determinati punti del torace da uno a sei. La designazione V indica che l'elettrodo mobile registra il potenziale elettrico sotto l'elettrodo rispetto ad un V, cioè ad una connessione terminale centrale, ottenuta connettendo i fili provenienti dal braccio destro, dal braccio sinistro e dalla gamba sinistra. Il potenziale elettrico della connessione centrale e terminale non varia significativamente nel corso del ciclo cardiaco; le registrazioni ottenute con le connessioni V, pertanto, raffigurano le variazioni elettriche che hanno luogo sotto l'elettrodo precordiale mobile. La posizione V1 corrisponde al quarto spazio intercostale alla destra dello sterno; V2 corrisponde al quarto

spazio intercostale a sinistra dello sterno; V4 si trova sulla linea emiclavare sinistra; V3 è situata a metà strada tra V2 V4; V 5 si trova nel quinto spazio intercostale sinistro sull'ascellare anteriore; V6 è situata nel quinto spazio intercostale sinistro sulla linea ascellare media.

In condizioni fisiologiche l'impulso è prodotto nel nodo seno atriale e si propaga in fase di depolarizzazione atriale. Il vettore elettrico ha verso concorde all'asse della prima derivazione e forma con esso un certo angolo. Dunque, si rileva una deflessione verso l'alto (positiva). La deflessione misurata è l'onda P, indicativa quindi della depolarizzazione atriale.

Inseguito, il vettore si propaga fino al nodo atrioventricolare: qui si rileva un rallentamento dell'attività necessario per permettere agli altri di completare la depolarizzazione. Il segnale poi passa al fascio Comune di His per poi separarsi tra branca destra e sinistra. La depolarizzazione dei ventricoli è più complessa di quella atriale, in particolare vi è prima una fase chiamata settale che coinvolge le due branche. Il vettore della depolarizzazione settale ha verso opposto rispetto all'asse della prima derivazione; quindi, si rileva una deflessione verso il basso (onda Q), la cui ampiezza dipende dall'angolo formato con l'asse, mentre rispetto all'aVF il vettore continua ad avere lo stesso verso dell'asse quindi la deflessione è positiva (onda R). Dunque, lo stesso evento elettrico si riflette nelle diverse direzioni con due flessioni di segno opposto. Alla depolarizzazione settale segue la depolarizzazione apicale e ventricolare precoce: il vettore è diretto in basso a sinistra, determinando un'ampia deflessione positiva (onda R) sulla derivazione I e aVF.

Fase di depolarizzazione ventricolare tardiva in segnale arriva alle fibre di Purkinje e, considerando che il ventricolo sinistro pesa più del destro il vettore elettrico risultante è diretto in direzione del ventricolo sinistro. Dunque, la deflessione continua verso l'alto nella prima derivazione mentre si ha una deflessione negativa nella derivazione aVF (onda S). L'ultima fase è la ripolarizzazione ventricolare: il cuore è completamente polarizzato e per un breve periodo è in uno stato isoelettrico, diverso da quello precedente alla depolarizzazione settale causato da un ritardo di conduzione fra nodo SA e fibre successive, poiché ora vi è un'assenza di conduzione. Il vettore è diretto dal cardio all'epicardio e sul tracciato si misura una deflessione verso l'alto sia per la prima derivazione che l'aVF, che descrive l'onda T.

- Onda P: depolarizzazione atriale.
- Complesso QRS: depolarizzazione ventricolare.
- Onda T: ripolarizzazione ventricolare.
- Onda U: ripolarizzazione dei muscoli papillari [2,4].

Capitolo 2

Sindrome di Brugada

2.1 Introduzione alla patologia e sistemi per la diagnosi

La Sindrome di Brugada (BrS) è una rara malattia congenita autosomica dominante che predispone alla fibrillazione ventricolare (VF) ed alla morte cardiaca improvvisa (SCD), senza riscontrare anomalie strutturali cardiache importanti. La BrS Colpisce principalmente i pazienti di mezza età, con una probabilità di diagnosi 8 volte superiore negli uomini rispetto che nelle donne. La diagnosi si basa sull'analisi del tracciato elettrocardiografico: nei pazienti affetti da Brs si osserva un sovraslivellamento del tratto ST nelle derivazioni precordiali di destra.

Tra la popolazione, la possibilità di poter contrarre la malattia sembra essere molto bassa, interessando 5 casi su 10.000 persone e il suo reale impatto sulla morte cardiaca improvvisa è incerto.

La diagnosi di sindrome di Brugada può essere ostacolata per l'incompleta manifestazione nell'ECG dinamico come mostrato in figura (Figura 7). Inizialmente, sono stati descritti i pattern di ripolarizzazione:

- Pattern di ECG di tipo I.
- Pattern di ECG di tipo II.
- Pattern di ECG di tipo III.

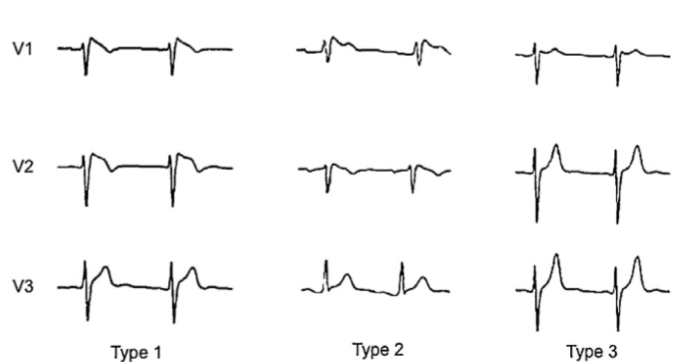


Figura 7: pattern di BrS

Nel pattern di tipo I si osserva un'elevazione del segmento ST concavo più alto almeno di 2 mm seguito da un'onda T negativa, con poca o nessuna separazione isoelettrica. Questa caratteristica risulta essere presente in tutte e tre le derivazioni precordiali di destra (V1, V2, V3). Anche nel pattern di tipo II è possibile osservare il sovraslivellamento del segmento ST, questa volta però seguita da un'onda T positiva o bifasica che compone una configurazione a sella. Ad oggi solo il pattern di tipo I è segno inequivocabile di sindrome di Brugada con elevazione del punto J superiore ai 2 mm. Pattern di tipo II e di tipo II non sono considerati diagnostici. Il pattern di tipo I può essere osservato in modo spontaneo o può essere indotto

mediante test farmacologici per via endovenosa (nei pazienti che risultano “asintomatici” nell’analisi elettrocardiografica). Un recente rapporto della conferenza di consenso [5] ha presentato il “Punteggio di Shanghai” secondo cui i pazienti possono ricevere punti per:

- i. ECG.
- ii. Risultati clinici.
- iii. Storia familiare.
- iv. Risultati genetici.

I pazienti poi vengono ulteriormente suddivisi in non diagnosticati, possibili, probabili o affetti da BrS. Da sempre si pensava che la BrS fosse una malattia mendeliana, con un’eredità autosomica dominante con penetranza incompleta ma ciò è stato superato. Un recente studio ha esaminato la co-segregazione della mutazione SCN5A in una vasta famiglia genotipica, dimostrando che in alcuni membri della famiglia la mutazione non è stata riscontrata. Ciò suggerisce che sono presenti altre mutazioni in altri geni che sono responsabili di causare BrS. Inoltre, alcune varianti patogene non si manifestano con un fenotipo non normale e per questo motivo risulta estremamente importante informare i pazienti di risultati non attendibili, che potrebbero essere clinicamente non significativi.

Essa viene definitivamente diagnosticata quando il paziente presenta almeno uno dei seguenti criteri:

- Anamnesi familiare: morte cardiaca improvvisa di un membro della famiglia con età inferiore ai 45 anni.
- Sintomi correlati all’aritmia: sincope, convulsioni o agonie respiratorie notturne.
- Aritmie ventricolari: TVP (Tachicardia Ventricolare Parossistica) o FV (Fibrillazione Ventricolare) [5, 6, 7].

2.2 Etiopatogenesi

La mutazione più comune è la mutazione con perdita di funzione in SCN5A, il gene responsabile della subunità α del canale del sodio. Dal 2001 sono state riscontrate più di 80 mutazioni del gene SCN5A che sono state successivamente associate alla BrS [20]. Queste mutazioni portano ad una ridotta espressione o funzione dei canali del Na^+ , causando anomalie durante i processi di conduzione o ripolarizzazione, producendo il caratteristico ECG del blocco di branca destra e il sovraslivellamento del tratto ST. Il pattern di tipo II è stato anche associato a mutazioni in SCN5A, glicerol-3fosfato deidrogenasi, che è il dominio responsabile di un sito omologo di SCN5A e CACNA1C, gene responsabile della subunità α dei canali cardiaci del calcio di tipo L.

Per comprendere le basi elettrofisiologiche della sindrome, bisogna analizzare la corrente del sodio durante lo sviluppo del potenziale d’azione cardiaco. I canali voltaggio-dipendenti del sodio sono costituiti da una subunità associata ad altre proteine, come le subunità beta (SCN1B, SCN2B, SCN3B). Il gene SCN5A codifica la subunità alfa del canale del sodio del

cuore. Sono state rilevate mutazioni con perdita di funzione in SCN5A in associazione alla BrS, che porta ad un progressivo difetto della conduzione cardiaca e a disturbi di sovrapposizioni di conduzione. Ciò comporta una ridotta disponibilità di corrente di sodio durante la fase 0 della depolarizzazione (fase di salita), associata ad una impossibilità di esprimere le proteine funzionali ed a un ridotto scambio ionico attraverso la membrana cellulare. È stato osservato anche il coinvolgimento della mutazione del gene SCN10A nello sviluppo della BrS.

Vi sono tre teorie principali circa i meccanismi elettrofisiologici alla base della BrS:

- Teoria della depolarizzazione (Figura 8).

La velocità di conduzione del potenziale d'azione cardiaco coinvolge i canali del sodio che depolarizzano la membrana cellulare con una conseguente conduzione attraverso le gap-junction nei cardiomiociti. Una qualsiasi forma di interruzione di propagazione di tale potenziale può causare un difetto di conduzione e quindi un'aritmia. Circa un quarto dei casi di BrS è stato attribuito ad una mutazione con perdita di funzione del gene SCN5A, portando ad una diminuzione significativa di corrente all'interno della fase 0 (di depolarizzazione). Il conseguente rallentamento della fase di salita durante la fase 0 ha dimostrato poter svolgere un ruolo importante durante le aritmie ventricolari di BrS.

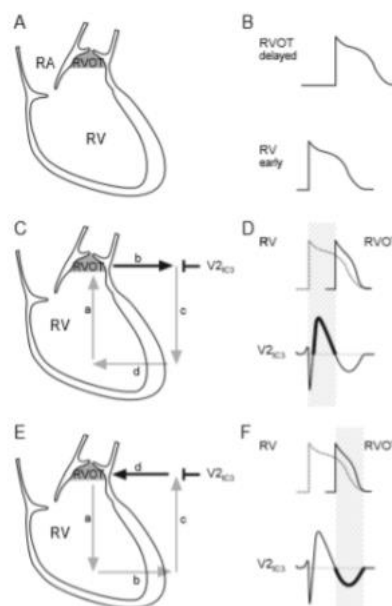


Figura 8: teoria della depolarizzazione

- Teoria della ripolarizzazione (Figura 9).

La teoria della ripolarizzazione afferma che l'accorciamento della durata del potenziale d'azione attraverso la parete di miocardio sia uno dei principali responsabili del fenotipo della BrS. Le mutazioni di SCN5A possono avere effetti opposti sulla lenta e rapida inattivazione dei canali del Na^+ con effetti sulla ripolarizzazione. Le interruzioni nell'inattivazione rapida portano ad una corrente di sodio elevata, che prolunga la ripolarizzazione a basse frequenze cardiache. Il ritardo del recupero del canale del sodio riduce la corrente di Na^+ e accorcia il

potenziale differenziale. Questo comportamento bifasico, quindi di un prolungamento del recupero seguito da un accorciamento dell'APD (Action Potential Duration), è stato riscontrato in uno studio di mappatura in pazienti affetti da BrS. Esperimenti condotti su cani hanno fornito importanti informazioni in merito al meccanismo dell'eterogeneità nella ripolarizzazione e sul rientro delle correnti ridotte. Confrontando i valori di APD ottenuti dall'epicardio (in particolare l'epicardio RVOT (Right Ventricular Outflow Tract)) con i valori ottenuti dall'endocardio, si è osservato un accorciamento maggiore dell'APD nell'epicardio a causa di una corrente transitoria verso l'esterno (I_{to}) relativamente maggiore. Ciò si traduce con una perdita della morfologia dell'epicardio, vista in precedenza.

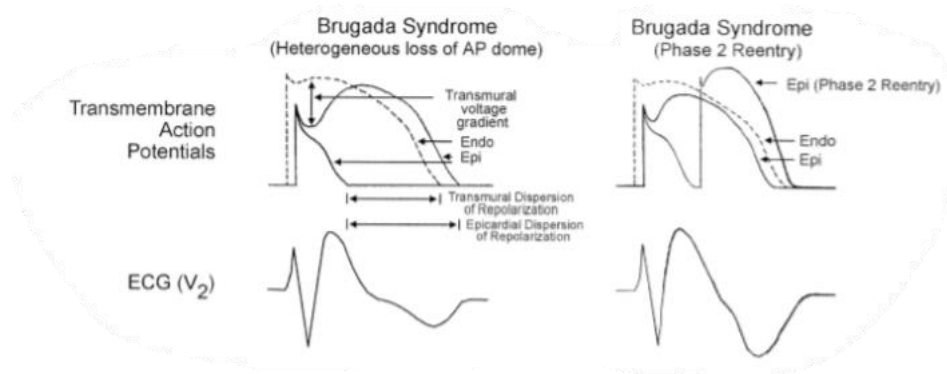


Figura 9: teoria della ripolarizzazione

- Missmatch carico-corrente.

Nel 2010 è stato introdotto il fenomeno del mismatch carico-corrente nel subepicardio, con la possibilità di essere alla base per lo sviluppo di aritmie ventricolari in pazienti con segni di BrS. Ciò è stato dimostrato mediante simulazioni di discontinuità del ventricolo destro al computer. La riduzione della corrente di sodio può essere causata da una perdita di funzione del canale, da un guasto nei pori che portano all'eccitazione subepicardica o dall'attivazione ritardata per il mismatch carico-corrente. Il lavoro computazionale ha anche mostrato che l'interruzione dell'equilibrio della corrente verso l'interno potrebbe influenzare l'eccitazione, e potrebbe quindi causare l'innalzamento del segmento ST. È stato confermato in un modello espantato di cuore umano che esclusivamente la mancata eccitazione locale è correlata al sovraslivellamento del tratto ST e non ad un'attivazione ritardata o alla ripolarizzazione precoce. Pertanto, modificando l' I_{to} o la I_{Ca} , si può compensare la corrente ridotta di sodio e l'entità dell'elevazione del tratto ST può diminuire [5, 6, 7].

2.3 Aspetti genetici

La sindrome di Brugada è caratterizzata da un'ereditarietà autosomica dominante (rischio di trasmissione del difetto genetico pari al 50%) con penetranza incompleta (non tutti i soggetti portatori del difetto genetico presentano la patologia a livello clinico). Il gene principale correlato alla patologia è SCN5A, localizzato sul cromosoma 3, responsabile di circa il 20% dei casi. Le mutazioni di questo gene provocano riduzione della corrente del sodio, che ha il ruolo di attivare elettricamente le cellule del cuore. Il secondo gene più frequentemente correlato alla patologia è CACNA1c, che controlla la corrente del calcio e la durata dell'attivazione elettrica; questo gene è responsabile di circa il 5% dei casi di patologia. Tutti

gli altri geni responsabili di sindrome di Brugada sono stati identificati come causa di malattia in pochi pazienti e sono considerati varianti rare. L'analisi genetica nella sindrome di Brugada permette di identificare una mutazione causativa in circa un quarto dei pazienti. In questi casi è possibile utilizzare l'informazione per identificare eventuali altri soggetti affetti nella famiglia. Tuttavia, dato che non tutti i geni responsabili della malattia sono noti, il risultato negativo del test genetico non può escludere la presenza della sindrome [6].

2.4 Sintomi, terapia e stratificazione del rischio

I sintomi nella sindrome di Brugada sono legati all'insorgenza di aritmie ventricolari (tachicardia ventricolare e fibrillazione ventricolare), che inducono un'interruzione dell'attività di pompa del cuore. Nei casi più lievi, in cui le aritmie ventricolari hanno durata breve e si interrompono spontaneamente, i pazienti possono lamentare palpitazioni, talora accompagnate da una sensazione di vertigine o da un temporaneo oscuramento della vista. Quando le aritmie ventricolari hanno durata più prolungata, il paziente può andare incontro ad una sincope (transitoria perdita di coscienza), che avviene generalmente in assenza di segni premonitori: per tale motivo i pazienti rischiano, cadendo, di subire traumi.

Nei casi più gravi, infine, quando l'aritmia non si interrompe, il paziente ha un arresto cardiaco e può morire improvvisamente. Gli eventi aritmici si manifestano soprattutto durante il sonno o dopo pasti abbondanti, e comunque più spesso in condizioni di riposo; al contrario, l'attività sportiva non sembra aumentare il rischio di eventi aritmici. In alcuni pazienti si può osservare il cosiddetto "respiro agonico notturno", testimonianza di una sincope che avviene durante il sonno. La percentuale di pazienti con sindrome di Brugada in cui si manifesta un arresto cardiaco nel corso della vita è circa il 10%, mentre il 30% dei pazienti presenta almeno un episodio sincopale. Da questi dati risulta evidente che la maggior parte dei pazienti con sindrome di Brugada, pur evidenziando le alterazioni elettrocardiografiche della malattia, non manifesta sintomi. Gli uomini fra i 30 ed i 50 anni hanno il rischio più elevato di aritmie, mentre la presenza di sintomi in età pediatrica è un evento raro. Spesso la malattia viene diagnosticata o sospettata in modo casuale in soggetti asintomatici e la valutazione presso un centro specializzato è fondamentale per individuare precocemente i soggetti a rischio più elevato.

Attualmente l'unica strategia efficace per la prevenzione della morte cardiaca improvvisa causata dalla BrS è l'uso dell'ICD (Implantable Cardioverter Defibrillator). Sono ad oggi in uso diversi trattamenti farmacologici, in particolare chinidina e fosfodiesterasi III, ma sono necessari ulteriori studi per capire il loro effettivo beneficio in pazienti affetti da BrS.

Considerando che alla base della BrS vi è uno squilibrio nell'elettrofisiologia cardiaca, l'utilizzo di farmaci che contribuiscono ad un ripristino di tale equilibrio può rilevarsi molto importante. I farmaci attualmente disponibile per prevenire episodi di BrS sono la chinidina, il bepridil e il cilostazolo. I beta-antagonisti e gli inibitori della fosfodiesterasi III possono essere utilizzati nel trattamento di fibrillazioni ventricolari improvvise. Le opzioni interventistiche propongono l'inserimento di un ICD e l'ablazione con radiofrequenza.

L'inserimento dell'ICD sembra essere sicuro a lungo termine e riduce la mortalità cardiaca in paziente affetti da BrS. Tuttavia, il suo utilizzo non è privo di complicanze, dovute principalmente ad insufficienza di piombo o infezioni. Inoltre, la qualità della vita risulta fortemente influenzata dalla inadeguatezza dell'erogazione degli shock da parte del defibrillatore, il più delle volte dovuta a presenza di aritmie sopraventricolari. In alcuni casi può essere utilizzata l'ablazione con radiofrequenza per prevenire il verificarsi di VT/FV. I substrati elettrofisiologici sono stati frequentemente localizzati nel RVOT nella BrS. Una volta che la localizzazione dei substrati viene confermata dalla mappatura epicardica ed endocardica, questi possono essere eliminati attraverso l'ablazione.

Vi sono molti fattori di rischio che sono stati associati ad una maggiore probabilità di sviluppare VT/FV. Questi includono il genere maschile, l'insorgenza della sincope, mutazioni genetiche associate a SCN5A, presenza di un Brugada pattern di tipo I spontaneo, pattern di ripolarizzazione precoce nelle derivazioni inferolaterali, l'onda S nella I derivazione, onda T alternata, morfologia del complesso QRS frammentata, sovraslivellamento del tratto ST durante il recupero da sforzo, un periodo refrattario ventricolare abbreviato < 200 ms, il prolungamento dell'intervallo di attivazione-recupero e aritmie indotte mediante stimolazione elettrica. Un aspetto fondamentale nella gestione dei pazienti con sindrome di Brugada è rappresentato dalla corretta valutazione del rischio di sviluppare aritmie. Si possono distinguere tre categorie di rischio:

1. Rischio ALTO: pazienti sopravvissuti ad un episodio di arresto cardiaco o con ECG di tipo 1 spontaneo e che abbiano avuto una o più sincopi;
2. Rischio INTERMEDIO: pazienti asintomatici con ECG di tipo 1 spontaneo;
3. Rischio BASSO: pazienti asintomatici e senza ECG di tipo 1 spontaneo, nei quali la diagnosi può essere posta solo in seguito a test farmacologico [6, 7].

2.5 Prospetti futuri

Una delle sfide per una migliore gestione futura della malattia resta quella di sviluppare un miglior protocollo di rischio standardizzato che possa assistere al meglio i medici nei processi clinici decisionali, soprattutto per quanto riguarda gli individui asintomatici. Con la scoperta della terapia di ablazione a radiofrequenza, vi è un'arma terapeutica in più alternativa all'impianto di un ICD, ciò può evitare tutte le complicanze che possono verificarsi in seguito all'impianto di un ICD. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche per mettere a punto al meglio la terapia e diversificare la stessa al meglio per ogni categoria di pazienti. Sono inoltre necessari ulteriori studi su popolazioni di pazienti di cui fanno parte bambini ed anziani, qui bisogna rendere chiari la prevalenza, la diagnosi a lungo termine e le caratteristiche cliniche. Attualmente si consiglia, nella gestione di queste categorie di pazienti, di analizzare caso per caso le diverse presentazioni cliniche, andando ad analizzare storia familiare e dati genetici dei singoli pazienti. In un recente studio è stato proposto un modello di rischio da adottare nei bambini che segue quattro diverse caratteristiche: SCD o sincope, ECG con pattern di tipo I, disfunzione del nodo del seno e/o tachicardia atriale e anomalie di conduzione. Tuttavia, sono necessarie ulteriori prove per convalidare questo modello di rischio [5, 6, 7].

Capitolo 3

Esperimenti di Voltage-Clamp

3.1 Introduzione

In un esperimento di Voltage-Clamp (VC), il potenziale di membrana di una cellula è controllato da un dispositivo esterno (l'amplificatore VC), con l'obiettivo di misurare le correnti ioniche che fluiscono attraverso i canali nella membrana cellulare. Tutto ciò richiede una compensazione attiva del flusso di corrente attraverso la membrana. Il potenziale di membrana viene misurato e confrontato con il segnale di comando; l'amplificatore VC compensa, mediante iniezione di carica, la deviazione per mantenere l'errore più basso possibile. La qualità della registrazione della corrente è principalmente determinata da questo segnale di errore. In pratica, le prestazioni di un dato sistema VC sono limitate da tre fattori:

1. La geometria non ideale della cellula (errore di space clamp). Una performance ideale può essere ottenuta mediante un sistema VC in una cellula perfettamente sferica con la punta della corrente iniettata esattamente nel centro. In realtà con le cellule reali, ci saranno sempre delle deviazioni locali del potenziale di membrana.
2. Le proprietà elettriche dei microelettrodi di registrazione.
3. La resistenza elettriche R_S delle strutture intracellulari poste tra la punta degli elettrodi di registrazione e la membrana cellulare (errore di resistenza in serie).

In elettrofisiologia cardiaca vengono utilizzati principalmente sistemi ad elettrodo singolo. Per completezza tratteremo anche la tecnica del clamp a due elettrodi [16].

3.2 Voltage Clamp a due elettrodi

Nel 1949 Cole descrisse il primo sistema di Voltage Clamp. Il circuito equivalente del sistema VC a due elettrodi è mostrato in figura 10.

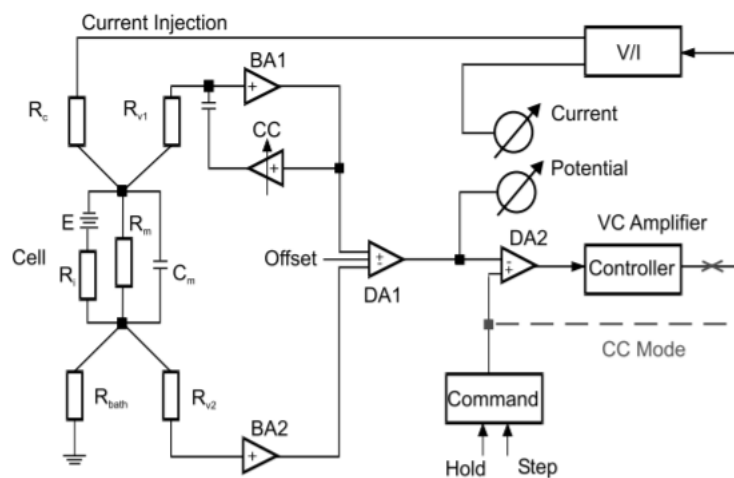


Figura 10: VC a due elettrodi

Il potenziale di membrana viene registrato in modo differenziale per compensare le resistenze extracellulari in serie.

Per aumentare la velocità di risposta del circuito viene utilizzato un circuito di compensazione della capacità con feedback positivo e con disposizione dello schermo pilotato. Quando la compensazione ottimale è raggiunta, il circuito può essere considerato come un elemento di ritardo del primo ordine con costante di tempo T_e . Il segnale di potenziale di membrana ottenuto in questo modo viene sottratto dal segnale di comando per mezzo di un amplificatore differenziale che fornisce il segnale di errore, che è il segnale di ingresso del controller. L'uscita del controller è collegata ad un circuito che converte la tensione in corrente, che può essere collegato ad un amplificatore ad alta tensione, a sua volta connesso ad un microelettrodo ad iniezione di corrente (TEVC A). In questo caso, la resistenza dell'elettrodo esegue la conversione del segnale di uscita del controller in quella iniettata in corrente, che in generale risulta non lineare ed instabile, influenzando le prestazioni del clamp. Un approccio migliore consiste nell'utilizzare una tensione per il convertitore di corrente (sorgente di corrente controllata in tensione (VCCS), TEVC B). In questo caso, l'influenza dell'elettrodo può essere notevolmente ridotta.

Nel primo caso (TEVC A), la corrente di membrana viene registrata con un circuito di massa virtuale, mentre nel secondo caso (TEVC B), la corrente viene misurata in modo differenziale nel convertitore tensione/corrente. Il sistema TEVC A è caratterizzato dalla costante di tempo introdotta dall'elettrodo di iniezione di corrente, che risulta essere in parallelo con la resistenza di membrana (R_m) e la capacità cellulare. La costante di tempo è compresa tra i millisecondi e i secondi e ciò limita notevolmente le prestazioni del sistema di clamp. Entrambe le resistenze non sono lineari e variano nel tempo, a volte anche di ordini di grandezza. La funzione di trasferimento risulta essere adimensionale (V/V). Con questo tipo di approccio, la corrente di clamping avrà bisogno di un circuito di feedback chiuso.

Le prestazioni del secondo sistema non dipendono più dalla costante di tempo, ed è quindi indipendente dalla resistenza dell'elettrodo, questo perché l'uscita del sistema è una corrente che viene iniettata nella cellula. L'intensità della corrente può essere misurata direttamente nel dispositivo VCCS, il principale vantaggio rispetto al sistema TEVC A. In questo caso, la funzione di trasferimento ha la dimensione di una conduttanza (A/V). Le prestazioni del clamp dipendono principalmente dalla capacità della membrana, che è una costante, e dalla massima quantità di corrente disponibile, che dipende dalla tensione di uscita del circuito VCCS. Uno dei principali vantaggi di questo approccio è che la corrente di clamp può essere ottenuta facilmente aprendo il circuito di feedback e applicando un segnale di ingresso direttamente al circuito della VCCS. Uno svantaggio del sistema TEVC B è che questo approccio dipende da delle capacità casuali all'uscita VCCS. Queste capacità determinano la "piccola" costante di tempo T_e , e può quindi definire il guadagno e la velocità di risposta massima del sistema. Inoltre, la corrente necessaria per caricare queste capacità viene aggiunta alla corrente di membrana. Queste capacità devono essere ridotte al minimo, ad esempio attraverso l'ausilio di sistemi di schermatura pilotati o circuiti elettronici di compensazione della capacità [16].

3.3 Voltage Clamp a singolo elettrodo

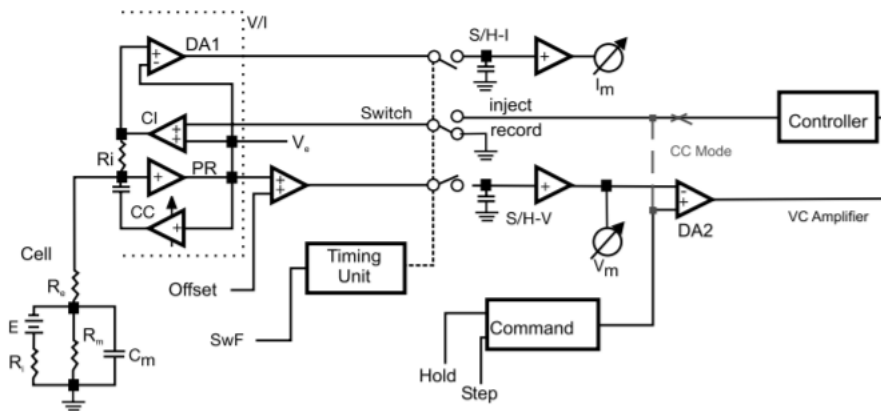


Figura 11: VC a singolo elettrodo

I sistemi di single elettrode clamp (Figura 11) sono caratterizzati da una modalità discontinua di funzionamento: per un periodo di tempo T_I la corrente viene fatta passare attraverso l'elettrodo di registrazione, mentre la registrazione del potenziale viene fermata, durante il periodo T_V , non passa corrente e si attiva l'eventuale registrazione. Nel 1971, Brennecke e Lindemann [19] hanno descritto il primo amplificatore first time-sharing. Il loro obiettivo era evitare errori di resistenza in serie disattivando l'iniezione di corrente durante la registrazione del potenziale. Sulla base di questo approccio, nel 1975 nasce il primo clamp a singolo elettrodo (SEVC), descritto per la prima volta da Wilson e Goldner [19]. Il principio di questo sistema comporta grandi vantaggi:

- Si può eseguire il clamping di corrente e di tensione in strati profondi (registrazione "cieca").
- Il potenziale di membrana viene misurato senza flusso di corrente attraverso il microelettrodo, ovvero senza alcun deterioramento dato dalle resistenze in serie.
- L'amplificatore misura il potenziale di membrana e la corrente durante ogni ciclo.
- Le registrazioni possono essere eseguite con tutti i tipi di configurazioni: sharp microelectrode, perforated and tight seal patch clamp.

L'azione discontinua è descritta matematicamente dalla frequenza di commutazione f_{sw} e dal duty cycle D :

$$f_{sw} = 1/(T_I + T_V); \quad D = T_I/(T_I + T_V) \quad T_{S/H} = 1/f_{sw}$$

La selezione di una frequenza di commutazione e di un duty cycle adeguati è fondamentale per la corretta applicazione dei sistemi SEVC. L'errore (dovuto all'ondulazione del potenziale di membrana risultante causato dall'iniezione continua di corrente) è proporzionale alla quantità di corrente iniettata e all'inverso della capacità di membrana. Dipende anche dalla frequenza di commutazione e dal duty cycle. Questi sistemi possono essere considerati lineari

se questo errore risulta inferiore ad 1 mV. In questo caso, il dead time dalla modalità di funzionamento discontinua può essere approssimato con un ritardo del primo ordine con una costante di tempo $T_S \frac{H}{H}$ correlata alla frequenza di commutazione.

Questa costante di tempo verrà aggiunta alla somma delle costanti di tempo “piccole” del circuito di controllo e contribuirà principalmente alla risultante costante di tempo equivalente. Questa costante di tempo equivalente deve essere mantenuta nell’intervallo dei microsecondi per ottenere una buona precisione nel clamp e una risposta veloce del clamp, ciò significa che devono essere utilizzate delle frequenze di commutazione elevate (10-40 kHz).

Questo può essere ottenuto con un convertitore tensione-corrente opportunamente progettato (dispositivo VCCS), con una compensazione elettronica per la costante di tempo dell’elettrodo nel sito di registrazione. Ciò consente la quasi completa cancellazione di qualsiasi capacità parassita attorno all’elettrodo, in modo che l’elettrodo si comporti come un resistore ohmico puro. La relazione tra frequenza di commutazione, costante di tempo dell’elettrodo, compensazione della capacità e la larghezza di banda del microelettrodo di registrazione, il setting del filtro e la frequenza di campionamento dell’acquisizione dei dati sono stati sperimentalmente analizzati e portano alla “switching frequency formula”:

$$f_e > 3f_{sw}, f_{sw} > 2f_s, f_s > 2f_f > f_m$$

In cui la f_e è la frequenza di taglio superiore del microelettrodo, f_{sw} la frequenza di commutazione del dSEVC, f_s la frequenza di campionamento del sistema di acquisizione dei dati, f_f la frequenza di taglio superiore del filtro passa basso per la registrazione della corrente e la f_m è la frequenza di taglio superiore della membrana. La frequenza è di 80-160 kHz, la frequenza di commutazione del dSEVC è stata selezionata tra i 30 e i 50 kHz, i dati sono stati campionati ad una frequenza di 10 kHz e i segnali di corrente sono stati filtrati ad una frequenza di 5 kHz. Questi settings vengono attualmente utilizzati per le registrazioni in molti laboratori. Il protocollo di commutazione induce un ritardo nel circuito di controllo che risulta proporzionale all’inverso della frequenza di commutazione. Pertanto, la dinamica dei sistemi SEVC sono per lo più determinati dalla capacità della cella e dalla frequenza di commutazione. Se viene eseguita l’ottimizzazione precedentemente descritta, i parametri dell’amplificatore VC possono essere calcolati dalla relazione tra la costante di tempo e la capacità della cella. Dopo aver selezionato correttamente una frequenza di commutazione, è possibile prendere in considerazione un amplificatore SEVC in entrambe le modalità di voltage clamp come un TEVC idealizzato (TEVC B) con un secondo elettrodo virtuale. Attualmente le registrazioni del clamp possono essere ottenute in un modo simile, come con la configurazione TEVC B, semplicemente aprendo il circuito di feedback e applicando un segnale di ingresso direttamente al circuito VCCS. Grazie all’operazione di commutazione, si ottengono valori accurati sia della corrente iniettata che del potenziale di membrana risultante [16].

3.4 Determinazione delle correnti caratteristiche, corrente di Na

Per caratterizzare una singola corrente ionica non è sufficiente isolarla dalla sovrapposizione delle conduttanze, devono essere registrati diversi parametri che determinano il flusso di corrente. Per raggiungere questo obiettivo, sono stati progettati vari modelli di voltage-clamp. Il modello di voltage-clamp più semplice è l'applicazione di impulsi quadrati. Gli impulsi quadrati sono spesso applicati come una serie graduata a potenziali crescenti, ad esempio con un incremento di 5 mV da -70 a -20 mV per ottenere la relazione tra la tensione e la corrente di sodio.

La corrente di sodio (I_{Na}) è la prima corrente nel potenziale d'azione atriale e ventricolare, e la sua attivazione provoca la depolarizzazione. Il punto di threshold della corrente di sodio nelle cellule ventricolari è compreso tra i -55 e i -40 mV, questo potenziale d'azione relativamente negativo consente l'attivazione di I_{Na} in modo semplice con i modelli di voltage-clamp. Un salto da un potenziale di holding di -80 mV a un potenziale positivo attiverà I_{Na} istantaneamente. La dimensione della corrente dipende dalla conduttanza e dalla forza motrice. La conduttanza è proporzionale al numero di canali del sodio aperto, che sono determinati dalla posizione dei gate di attivazione m e di inattivazione h.

Le equazioni che descrivono la I_{Na} sono:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} * m^3 * h * j$$

g_{Na} è la conduttanza di picco; m, h e j sono variabili che possono variare tra 0 e 1, caratterizzano la probabilità che i due gate caratteristici del canale del sodio siano aperti, per l'attivazione i gate m e per l'inattivazione i gate h. In aggiunta si può osservare la variabile j che fa riferimento ad una possibile lenta inattivazione dei gates.

$$g_{Na} = I_{Na} / (V - E_{Na})$$

dove V è il potenziale di membrana, E_{Na} il potenziale di inversione di I_{Na} e la differenza tra i due la driving force.

Da cui:

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} * m^3 * h * j * (V - E_{Na})$$

Per caratterizzare la I_{Na} attraverso un esperimento di voltage-clamp, il modello dovrebbe essere progettato in maniera tale da non avere interferenze con altre correnti ioniche. Le correnti di overlapping che possono interferire con la I_{Na} sono principalmente la $I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$, I_{to} e I_{K1} ; altre correnti associate al K^+ come la I_{Ks} e la I_{Kr} si attivano troppo lentamente. Se la I_{Na} deve essere direttamente registrata, queste correnti devono essere bloccate.

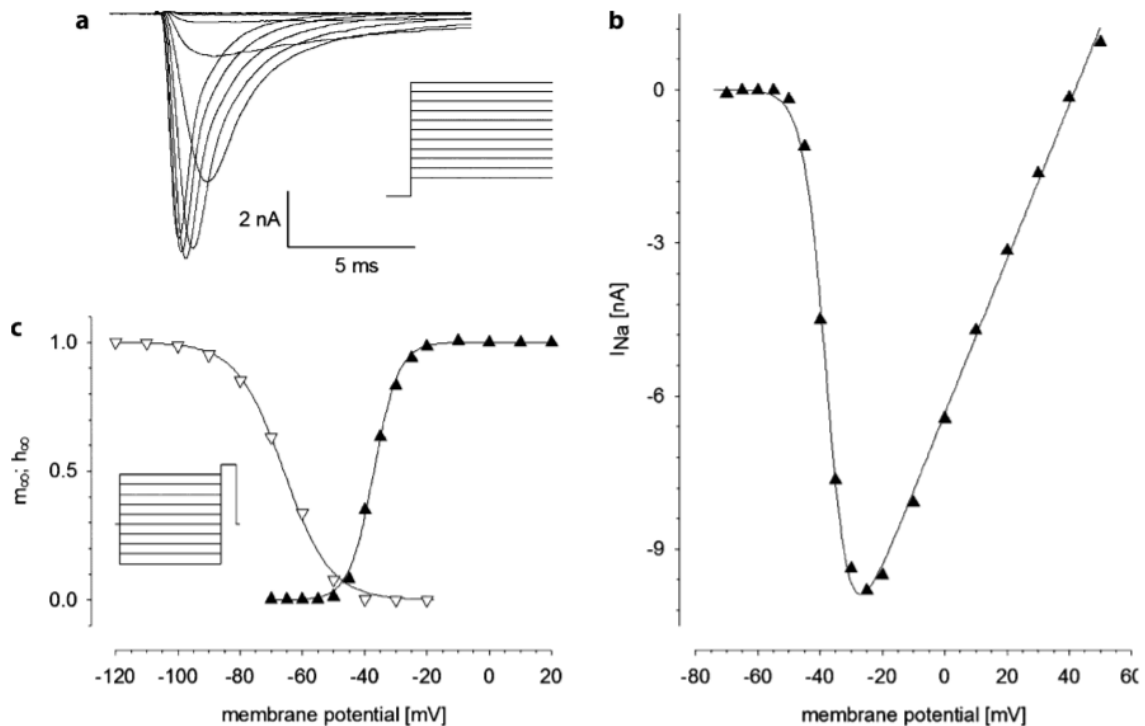


Figura 13: esempio in VC di prova [16]

Un esempio di monitoraggio della I_{Na} nelle cellule ventricolari di guinea pig è mostrato nella figura 13. La soluzione conteneva 1 mM di nifedipina per la $I_{Ca,L}$ e il K^+ è stato sostituito con Cs^+ sia nella pipetta che nella soluzione esterna per impedire il flusso di corrente attraverso i canali K^+ .

La I_{Na} è stata caratterizzata applicando degli impulsi di voltage-clamp rettangolari con un potenziale di holding pari a -80 mV e una frequenza di stimolazione pari a 0.5 Hz.

Si parte con un impulso singolo di clamp della durata di 20 ms per poi aumentare gradualmente il potenziale tra -70 e +50 mV (ampiezza del gradino di 5 mV a potenziali ≤ -20 mV e gradini di ampiezza 10 mV a potenziali > 20 mV) sono stati utilizzati per determinare la dipendenza dalla tensione e l'attivazione in regime stazionario (m_∞) della I_{Na} . La corrente si attiva rapidamente e aumenta fino a raggiungere l'ampiezza massima dopo 1-2 ms per poi decadere nuovamente dopo pochi ms (fig. 13a). La I_{Na} è stata calcolata come la differenza tra la corrente di picco e la corrente al termine dell'impulso di clamp. La relazione tensione-corrente viene quindi costruita tracciando il picco delle correnti in funzione del potenziale di clamp (fig. 13b). Tra -50 e -25 mV l'ampiezza della I_{Na} aumenta all'aumentare del potenziale di clamp, dopo i -25 mV l'ampiezza della corrente diminuisce all'aumentare del potenziale di clamp. In particolare, si può osservare che la direzione della corrente inverte la propria direzione a +40 mV (fig. 13b). L'attivazione dello stato stazionario (m_∞) può essere calcolata attraverso i dati già utilizzati per calcolare la relazione tensione-corrente, calcolando g_{Na} per ciascun potenziale e normalizzando questi dati alla conduttanza di picco più alta, impostata ad "1" (fig. 13c).

Questi valori vengono tracciati in funzione del potenziale di clamp e vengono interpolati con la funzione di Boltzmann:

$$m_{\infty}(V) = 1/[1 + e^{(V_{1/2}-V)/k}]$$

Lo stato stazionario d'inattivazione (h_{∞}) è stato determinato mediante un protocollo a doppio impulso, che combina l'applicazione di potenziali via via crescenti tra -120 mV e -10 mV (con durata di 130 ms e gradino di ampiezza pari a 10 mV) e un successivo clamp di prova a -20 mV (della durata di 20 ms). L'idea di questo protocollo è quella di settare i gate h sul loro valore di potenziale dal clamp di condizionamento; quindi, bloccare la membrana cellulare ad un potenziale costante, il cui valore di attivazione è uno.

In queste condizioni, la variabile di inattivazione è l'unico parametro che determina l'ampiezza della corrente di coda. Pertanto, i valori di h_{∞} possono essere dedotti direttamente dall'ampiezza della corrente di picco durante il secondo step di clamp. L'ampiezza più alta della corrente di picco è impostata su "1" e le ampiezze delle correnti di coda, provocate dai clamp di condizionamento, sono normalizzate su questo valore. Questi valori sono tracciati in funzione del clamp di condizionamento (fig. 13c) e interpolati con la seguente funzione di Boltzmann:

$$h_{\infty}(V) = 1/[1 + e^{(V - V_{1/2})/k}]$$

La I_{Na} si attiva molto velocemente ed ha ampiezze elevate. Ciò può comportare una perdita del controllo della tensione e quindi a risultati errati. Per evitare questo problema devono essere prese diverse precauzioni durante la registrazione della corrente. Si dovrebbe mantenere una I_{Na} piccola, all'interno dell'intervallo di sicurezza del circuito di voltage-clamp. Le registrazioni vengono generalmente eseguite a temperatura ambiente e con una concentrazione esterna di Na^+ ridotta, ad esempio in fig. 13c la concentrazione di NaCl era di 30mM.

Gli elettrodi di patch-clamp dovrebbero avere una resistenza alla punta relativamente bassa (consigliata tra 1 e 2M Ω) e dovrebbero essere scelte delle cellule piccole in modo da ottenere aree piccole con un numero ridotto di canali Na^+ [16].

Capitolo 4

Strategia di ricerca sulla banca dati PubMed: raccolta dei dati

Per la ricerca bibliografica degli studi raccolti in letteratura sugli esperimenti di voltage-clamp e per le caratterizzazioni delle correnti in canali del sodio mutati, è stata utilizzata la banca dati PubMed. Dapprima si è proceduto ad una ricerca preliminare sull'argomento da approfondire mediante l'impiego di key-words e in seguito si sono analizzati i vari articoli leggendo l'abstract di ciascuno. Nel caso in cui, dopo una prima sinossi, i papers fossero risultati idonei alla trattazione scientifica, questi sono stati tradotti in italiano e rielaborati in modo tale da riportare nella corrente tesi gli esperimenti e le argomentazioni più esplicative

delle caratterizzazioni elettrofisiologiche delle mutazioni del canale SCN5A, (il canale voltaggio dipendente del sodio implicato nella Sindrome di Brugada).

Gli studi selezionati da tale indagine e riportati nel presente trattato sono stati raccolti in una tabella riassuntiva che li ha classificati mediante i seguenti criteri:

- Titolo dell'elaborato.
- Autori della trattazione.
- Anno di pubblicazione.
- Rivista scientifica.
- Mutazione esaminata nello studio.
- Descrizione del protocollo utilizzato nello studio.

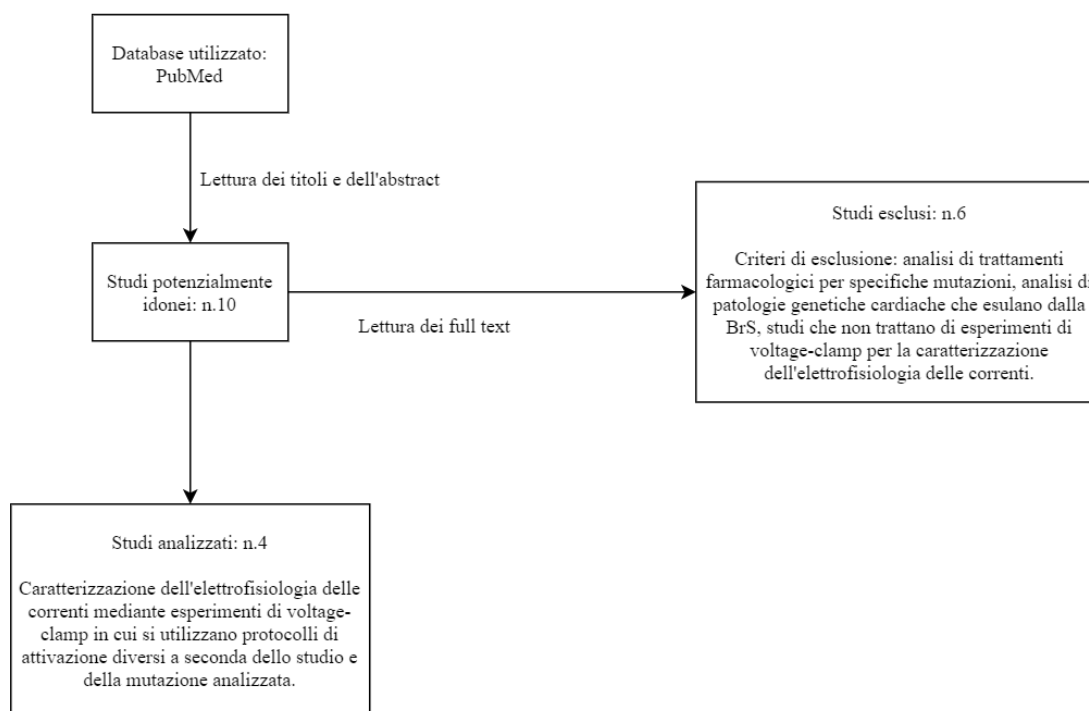


Diagramma Flow Chart

Titolo	Autori	Anno	Rivista	Mutazione	Descrizione del protocollo
Characterization of a novel SCN5A mutation associated with Brugada syndrome reveals involvement of	Simona Casini, Hanno L. Tan, Zahurul A. Bhuiyan, Connie R. Bezzina, Phil Barnett, Elisabetta	2007	Cardiovascular Research	G1319V	Le correnti di sodio per le cellule WT e per i G1319V sono state misurate mediante l'aumento dei passaggi depolarizzanti,

<p>DIIS4-S5 linker in slow inactivation</p>	<p>Cerbai, Alessandro Mugelli, Arthur A.M. Wilde, Marieke W. Veldkamp</p>			<p>da un potenziale di holding di -120 mV. I_{NaL} è stata analizzata come una corrente sensibile alla tetrodotossina (TTX) di 30 $\mu\text{mol/L}$, utilizzando un protocollo di tensione di rampa discendente. Per analizzare la cinetica di inattivazione, si è interpolato il decadimento della corrente whole-cell a vari potenziali con una funzione biesponenziale. Per studiare se la mutazione ha influenzato in modo diverso i componenti lenti e veloci del gating di inattivazione, è stata esaminata separatamente la dipendenza dalla tensione dell'inattivazione rapida e lenta. I_{Na} è stata espressa come corrente relativa (P2/P1) dopo un impulso di condizionamento di 1000 ms a potenziali</p>
---	---	--	--	--

					compresi tra -160 e -15 mV e un breve intervallo di ripolarizzazione (20 ms) a -120 mV per consentire recupero dalla disattivazione rapida.
Characterization of N-terminally mutated cardiac Na ⁺ channels associated with long QT syndrome 3 and Brugada syndrome	Christian Gütter, Klaus Benndorf and Thomas Zimmer	2013	Frontiers in Physiology	R18Q R27H G35S V95I R104Q K126E	Le correnti sono state ricavate da potenziali di test da -80 mV a +40 mV con incrementi di 5 o 10 mV ad una frequenza d'impulso di 1.0 Hz e potenziale di holding pari a -120 mV. Lo stato stazionario d'inattivazione è stato determinato mediante un protocollo a doppio impulso che consiste nell'applicazione di un impulso con voltaggio compreso tra -140 mV e -30 mV dalla durata di 500 ms, seguito da un impulso di test costante a -20 mV di 10 ms con una frequenza di pulsazione a 0.5 Hz.

<p>Functional Characterization of Two Novel Mutations in SCN5A Associated with Brugada Syndrome Identified in Italian Patients</p>	<p>Cristina Balla, Elena Conte, Rita Selvatici, Renè Massimiliano Marsano, Andrea Gerbino, Marianna Farnè, Rikard Blunck, Francesco Vitali, Annarita Armaroli, Alessandro Brieda, Antonella Liantonio, Annamaria De Luca, Alessandra Ferlini, Claudio Rapezzi, Matteo Bertini, Francesca Gualandi, and Paola Imbrici</p>	<p>2021</p>	<p>International Journal of Molecular Sciences</p>	<p>P1310L Ins1687GR</p>	<p>Per determinare le relazioni tra la corrente ed il voltaggio, le correnti sono state ricavate attraverso impulsi di depolarizzazione di 20 ms da -100 a +70 mV, con incrementi di 5 mV dal potenziale di holding di -150 mV. (con una durata di cinque secondi tra impulsi). Le ampiezze di picco della corrente ad ogni step di voltaggio sono state definite come le ampiezze di corrente massime. Le ampiezze di corrente sono state normalizzate alla capacità della cellula (C_m) per ottenere la densità di corrente (pA/pF). La voltaggio-dipendenza dello stato stazionario d'inattivazione è stata misurata utilizzando un protocollo d'attivazione a due impulsi in cui si modificava</p>
--	--	-------------	--	-----------------------------	---

					l'impulso che regolava il potenziale di membrana tra -150 e -20 mV, incrementandolo, ogni 100 ms, di 10 mV; questo era seguito da un impulso di test a -20 mV per 20 ms, da un potenziale di holding a -150 mV.
Novel SCN5A p.Val1667Asp Missense Variant Segregation and Characterization in a Family with Severe Brugada Syndrome and Multiple Sudden Deaths	Michelle M. Monasky, Emanuele Micaglio, Giuseppe Ciconte, Ilaria Rivolta, Valeria Borrelli, Andrea Ghiroldi, Sara D'Imperio, Anna Binda, Dario Melgari, Sara Benedetti, Predrag Mitrovic, Luigi Anastasia, Valerio Mecarocci, Žarko Calović, Giorgio Casari e Carlo Pappone	2021	International Journal of Molecular Sciences	p.V1667D	Il potenziale di holding era di -100 mV. Lo stato stazionario d'attivazione è stato studiato con impulsi da -80 a +75 mV (+5 mV di incremento, 25 ms di durata) mentre il protocollo di inattivazione allo stato stazionario ha avuto un primo step di durata di 500 ms (da -140 a +10 mV, incremento di +10 mV) seguito da un impulso di test di -10 mV (durata 20 ms). Il recupero dall'inattivazione è stato studiato attraverso un protocollo in cui due step da 10 mV (rispettivamente 500 ms e 20 ms

					<p>di durata) sono stati divisi per un impulso di 100 mV di durata crescente da 0,01 ms a 3 s. La dipendenza dal tempo dell'inizio dell'inattivazione intermedia e lenta è stata misurata utilizzando un protocollo a due impulsi: il primo impulso P1 è passato dal potenziale di mantenimento di -100 mV a -10 mV (durata crescente da 1 a 1000 ms), quindi un passo indietro a -100 mV per 20 ms lascia che i canali si riprendano dalla disattivazione rapida e infine il secondo impulso P2 a -10 mV (durata 20 ms) consente la registrazione della corrente di sodio. Il rapporto P2/P1 risultante è stato normalizzato e tracciato rispetto alla durata P1.</p>
--	--	--	--	--	--

Capitolo 5

Analisi degli studi

5.1 Simona Casini et al., European Society of Cardiology (2007)

In questo studio sono state riportate le conseguenze funzionali di una nuova mutazione in SCN5A, G1319V che si trova nell'anello che collega i segmenti transmembrana 4 e 5 nel dominio III (DIIS4-S5), una regione finora considerata esclusivamente coinvolta nell'inattivazione rapida del canale del sodio.

Le correnti di sodio (I_{Na}) sono state registrate nella configurazione whole-cell della tecnica di patch-clamp. Gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente (20°C) con l'uso di un amplificatore Axopatch 200B (Axon Instruments). La resistenza in serie è stata compensata di $\geq 80\%$ e gli elettrodi patch avevano una resistenza della punta di 2–3 M Ω . Le correnti sono state filtrate a 5 kHz e digitalizzate a 20 kHz. Il controllo della tensione, l'acquisizione dei dati e l'analisi sono stati eseguiti con un software personalizzato. La presenza di una corrente di sodio interna persistente (I_{NaL}), la dipendenza dalla tensione di attivazione, lo stato stazionario d'inattivazione, il recupero dall'inattivazione, lo sviluppo di un'inattivazione lenta e la dipendenza dalla tensione di un'inattivazione lenta e veloce sono state determinate utilizzando i protocolli di voltage-clamp descritti nelle figure rilevanti [18]. In tutti i protocolli sono stati utilizzati un potenziale di holding di -120 mV e un tempo di ciclo di 5 s.

La dipendenza dalla tensione della curva di attivazione è stata interpolata con la funzione di Boltzmann:

$$y = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V - V_{\frac{1}{2}}}{k}\right)}$$

In cui $V_{\frac{1}{2}}$ è la tensione semimassima di attivazione e k il fattore di pendenza. Il recupero dall'inattivazione è stato analizzando interpolando i dati con una funzione biesponenziale:

$$y = y_0 + A_f * \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right)\right] + A_s * \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right)\right]$$

dove A_f e A_s indicano le frazioni delle componenti veloce e lenta del recupero dall'inattivazione e τ_f e τ_s le costanti di tempo rispettivamente per il recupero dell'inattivazione rapida e lenta.

Lo sviluppo dell'inattivazione lenta è stato interpolato con una funzione esponenziale:

$$y = A + A_0 * \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

dove τ è la costante di tempo per lo sviluppo dell'inattivazione lenta e A la frazione di canali che entrano nello stato di inattivazione lenta allo stato stazionario.

In questa paziente è stata diagnosticata la BrS quando si è presentata al Pronto Soccorso a causa di un dolore toracico e il suo ECG ha rivelato un sopraslivellamento del tratto ST precordiale destro tipico della BrS. La causa del dolore toracico non era l'infarto del miocardio (enzimi cardiaci negativi), ma la polmonite con febbre (38,5 °C). L'ECG si è normalizzato quando è stato istituito un trattamento antibiotico e la febbre si è calmata. Questa dipendenza dalla temperatura delle elevazioni ST ha sollevato il sospetto di BrS [18]. Di conseguenza, mentre il successivo esame cardiologico (ecocardiografia, risonanza magnetica cardiaca, angiografia coronarica con angiografia ventricolare sinistra) non ha rivelato alcuna malattia cardiaca strutturale, il test dell'ajmalina ha suscitato una tipica risposta BrS.

Le correnti di sodio per le cellule WT e per G1319V sono state evocate aumentando i passaggi depolarizzanti da un potenziale di holding di -120 mV (Figura 14, pannello superiore). Come mostrato dalle relazioni medie corrente-tensione (Figura 14, pannello inferiore), le ampiezze massime della corrente di picco non erano significativamente diverse tra i due gruppi (WT: $I_{peak,max} = -5,8 \pm 0,7$ nA, n = 15; G1319V: $I_{peak,max} = -5,8 \pm 0,6$ nA, n = 20), indicando che il numero di canali funzionali è simile nelle cellule WT e nel mutante.

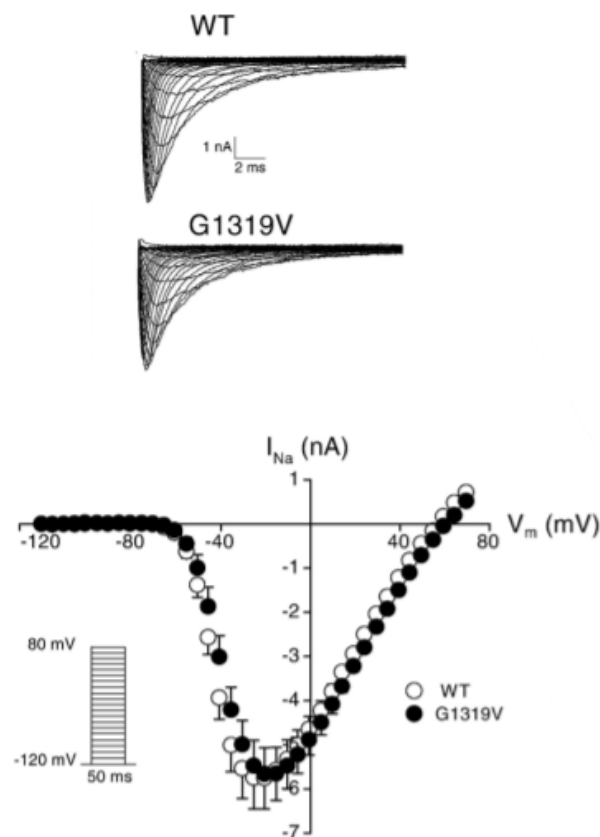


Figura 14: corrente di sodio nella configurazione whole-cell in risposta a depolarizzazioni a gradino crescenti in cellule WT e in G1319V (pannello superiore), relazione corrente-tensione media del sodio per i canali WT e in G1319V [18].

I_{NaL} è stata analizzata come una corrente sensibile alla tetrodotossina (TTX) in quantità 30 $\mu\text{mol/L}$, utilizzando un protocollo di tensione di rampa discendente (Figura 15). Nell'intervallo dei potenziali di membrana testati, i canali G1319V non avevano I_{NaL} rilevabile (Figura 15) [18].

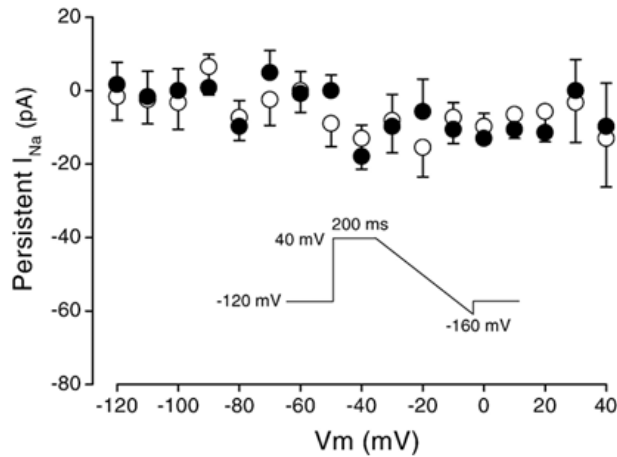


Figura 15: relazione corrente-tensione media di sodio persistente nei canali WT (pallini bianchi) e in G1319V (pallini neri) [18].

La relazione normalizzata conduttanza-tensione (Figura 16), ha mostrato un piccolo spostamento depolarizzante (+ 3,7 mV, $p = 0,04$) in dipendenza della tensione di attivazione per i canali G1319V rispetto ai canali WT senza variazioni di pendenza. Pertanto, il grado di depolarizzazione richiesto per l'attivazione è stato aumentato nei canali G1319V [18].

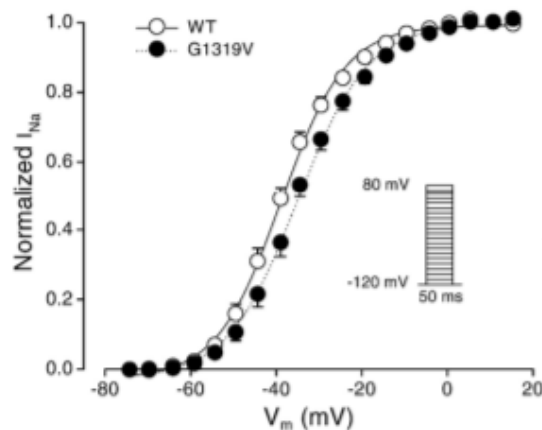


Figura 16: dipendenza dalla tensione dell'attivazione per i canali wild-type e G1319V. La conduttanza di picco normalizzata è stata tracciata in funzione del potenziale di membrana [18].

Per analizzare la cinetica di inattivazione, si è interpolato il decadimento della corrente whole-cell a vari potenziali con una funzione biesponenziale. La costante di tempo lenta del decadimento della corrente, τ_s , era simile nelle cellule WT e in G1319V (Figura 17). La costante di tempo veloce del decadimento della corrente, τ_f , è stata leggermente prolungata in G1319V rispetto alle cellule WT, ma solo significativamente tra -50 e -40 mV. Le ampiezze delle componenti inattivanti veloci e lente del decadimento di corrente (A_f e A_s) erano comparabili per i canali WT e G1319V a tutte le tensioni (non mostrate) [18].

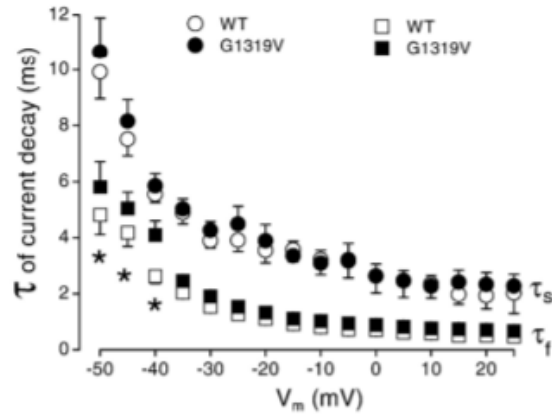


Figura 17: andamento temporale del decadimento della corrente. Le costanti di tempo veloce e lenta del decadimento della corrente per i canali WT e G1319V sono tracciate in funzione del potenziale di membrana [18].

L'indagine sulla dipendenza dalla tensione dell'inattivazione in stato stazionario (Figura 18) ha mostrato che $V_{1/2}$ dei canali G1319V è spostato di -6.0 mV a un potenziale più negativo, che riflette una maggiore inattivazione [18].

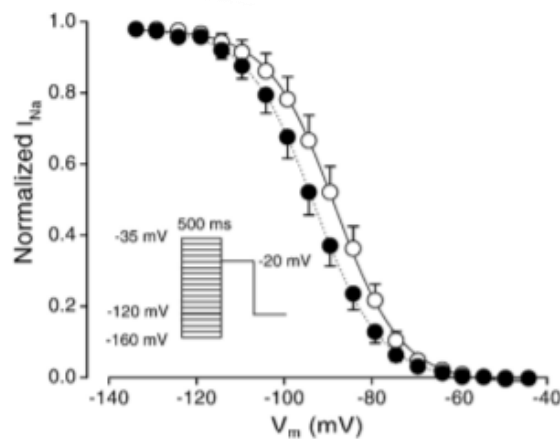


Figura 18: dipendenza dalla tensione in stato stazionario d'inattivazione per i canali WT e per G1319V. Le correnti di picco di sodio sono state normalizzate ai valori massimi in ciascuna cellula e tracciate in funzione della tensione [18].

Il recupero dall'inattivazione (Figura 19) è notevolmente rallentato in G1319V, a causa di un quasi raddoppio della costante del tempo di recupero rapido. Al contrario, non sono state osservate differenze significative nell'ampiezza dei componenti di recupero veloce (A_f) e lento (A_s) dall'inattivazione tra i canali WT e G1319V [18].

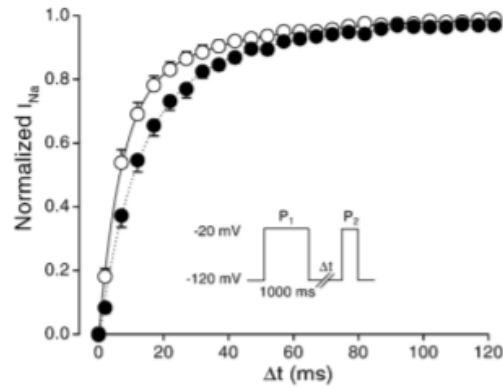


Figura 19: andamento temporale del recupero dall'inattivazione per i canali WT e G1319V. Le correnti di picco di sodio ottenute da P2 sono state normalizzate ($P2/P1$) e tracciate in funzione dell'intervallo di recupero [18].

Durante la depolarizzazione prolungata, i canali cardiaci del sodio possono entrare in uno stato di inattivazione lenta, uno stato conformazionale distinto dall'inattivazione rapida, che richiede un periodo prolungato di iperpolarizzazione per riprendersi [9,10]. La Figura 20 mostra l'andamento temporale dell'ingresso nello stato inattivato lento per le cellule WT e G1319V. Mentre la costante di tempo (τ) per lo sviluppo dell'inattivazione lenta non era diversa per WT e G1319V, la frazione di canali (A) che sono entrati nello stato di inattivazione lenta è stata quasi raddoppiata per G1319V rispetto alle cellule WT [18].

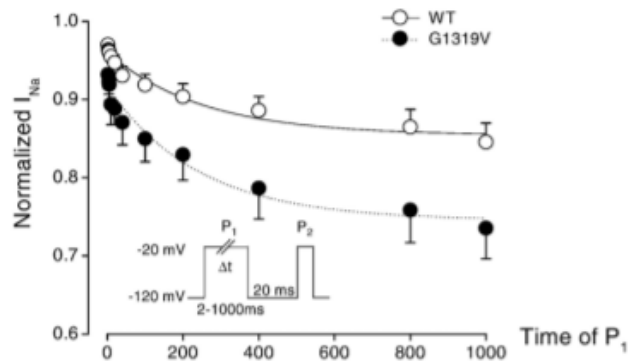


Figura 20: sviluppo dell'inattivazione lenta per i canali wild-type (WT) e G1319V. Le correnti di picco del sodio ottenute da P2 sono state normalizzate ($P2/P1$) e tracciate in funzione della durata della fase di condizionamento ($P1$) [18].

Per studiare se la mutazione ha influenzato in modo diverso le componenti lente e veloci del gating di inattivazione, è stata esaminata separatamente la dipendenza dalla tensione dell'inattivazione rapida (Figura 21, pannello superiore) e lenta (Figura 21, pannello inferiore). Nel pannello inferiore della Figura 21, I_{Na} è stata espressa come corrente relativa ($P2/P1$) dopo un impulso di condizionamento di 1000 ms a potenziali compresi tra -160 e -15 mV e un breve intervallo di ripolarizzazione (20 ms) a -120 mV per consentire recupero dalla disattivazione rapida [18].

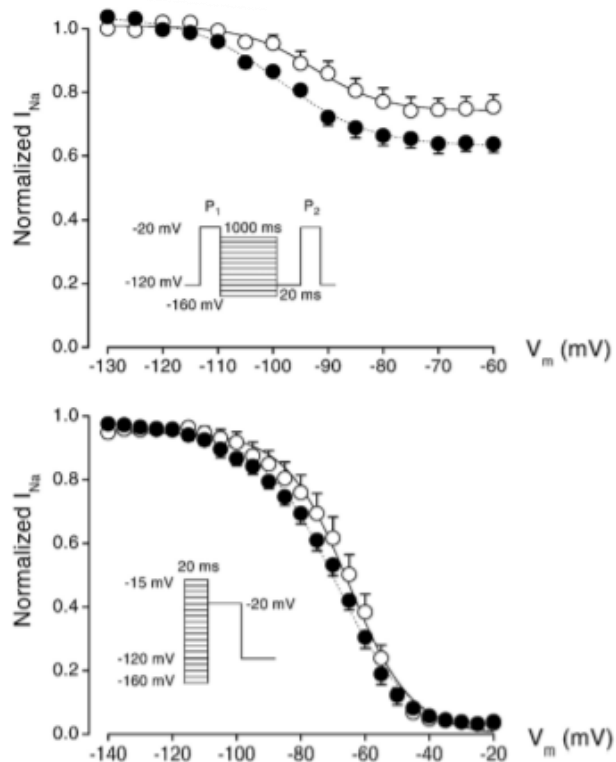


Figura 21: dipendenza della tensione in stato stazionario dell'inattivazione lenta per i canali WT e G1319V (pannello superiore), dipendenza dalla tensione dell'inattivazione rapida per i canali WT e G1319V [18].

In linea con l'inattivazione lenta avanzata descritta in Figura 20, quasi il 40% dei canali G1319V è entrato nello stato di inattivazione lenta, ma solo circa il 20% dei canali WT. Inoltre, il $V_{1/2}$ dell'inattivazione lenta è stato spostato di $-6,8$ mV nei canali G1319V. Infine, il fattore di pendenza k della curva di inattivazione lenta era significativamente maggiore per i canali G1319V, indicando una sensibilità ridotta alle variazioni di tensione rispetto ai canali WT.

Per studiare la dipendenza dalla tensione dell'inattivazione rapida (Figura 21, pannello inferiore), i canali Nav1.5 sono stati stimolati con un breve impulso di condizionamento (20 ms) per evitare l'ingresso nello stato di inattivazione lenta. In queste condizioni, $V_{1/2}$ e il fattore di pendenza k erano simili per i canali WT e G1319V. Pertanto, concludiamo che lo spostamento negativo nell'inattivazione allo stato stazionario osservato utilizzando il protocollo in Figura 18 (con il quale non è possibile distinguere gli effetti sull'inattivazione rapida e lenta), era esclusivamente dovuto ai cambiamenti nella dipendenza dalla tensione dell'inattivazione lenta piuttosto che alle variazioni della componente veloce. Pertanto, la mutazione G1319V colpisce principalmente l'inattivazione lenta. Gli intervalli QRS più ampi durante il test da sforzo osservati nei portatori di G1319V (Figura 22) suggeriscono una riduzione più evidente della disponibilità del canale del sodio a frequenze cardiache elevate per G1319V, che sarebbe in linea con il ritardo osservato nel recupero dall'inattivazione (Figura 19) e la maggiore inattivazione lenta (Figura 20 e 21, pannello superiore) [18].

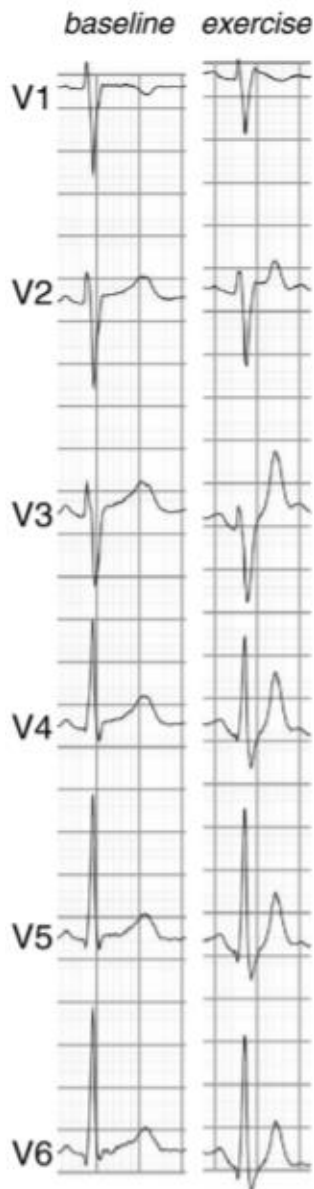


Figura 22: ECG basale e durante il test da sforzo [18].

Per verificare questa ipotesi, il picco della I_{Na} è stato rilevato da una serie di passaggi depolarizzanti, a frequenze di stimolazione di 1 e 3 Hz (Figura 23, pannello superiore). A 1 Hz, il picco della I_{Na} è rimasto invariato sia nelle cellule WT (n = 8) che in G1319V (n = 12). A 3 Hz, tuttavia, quando il tempo diastolico era notevolmente ridotto, G1319V (n = 9) ha mostrato una significativa diminuzione del picco della corrente rispetto alle WT (n = 5) a tutti i valori di impulso (Figura 23, pannello inferiore) [18].

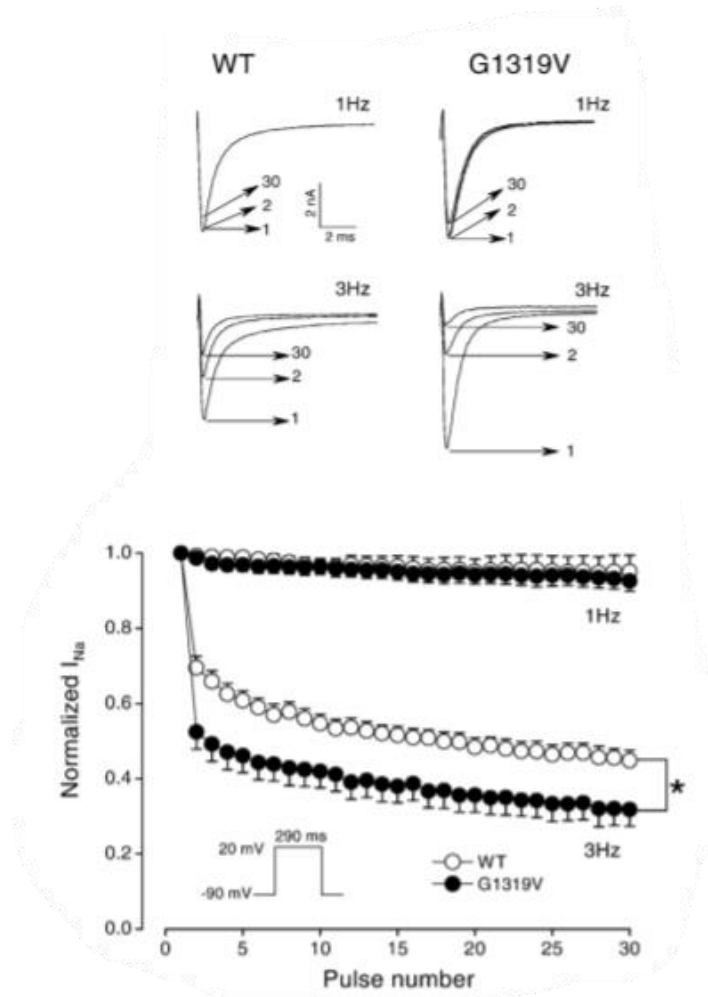


Figura 23: corrente di picco di sodio sovrapposta delle WT e di G1319V registrata durante la 1°, 2°, 30° depolarizzazione in un treno d'impulsi, a frequenza di stimolazione 1 e 3 Hz (pannello superiore), ampiezze della corrente di sodio di picco normalizzate WT e G1319V durante successivi stimoli depolarizzanti a frequenze di stimolazione 1 e 3 Hz. Le correnti sono state normalizzate al primo impulso e tracciate in funzione del numero di stimolo [18].

5.2 Christian Gütter et al., *Frontiers in Physiology* (2013)

In questo studio sono state caratterizzate sei nuove varianti attribuite alla BrS mediante esperimenti di voltage clamp. È stata applicata la tecnica di voltage clamp a due elettrodi negli oociti di *Xenopus*, utilizzando l'iniezione del c-RNA, ed è stata utilizzata la tecnica whole cell in patch clamp usando la trasfezione delle cellule HEK293 [12].

Le correnti sono state ricavate da potenziali di test da -80 mV a 40 mV con incrementi di 5 o 10 mV ad una frequenza di impulso di 1.0 Hz (potenziale di holding di -120 mV). Le cellule che producevano un'ampiezza di picco della corrente > 6 nA sono state escluse dall'analisi dei dati. Lo stato stazionario di attivazione (m_{∞}) è stato valutato adattando l'equazione di Boltzmann alla conduttanza normalizzata come funzione del voltaggio [12]:

$$m_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-(V - V_m)}{s}\right)}$$

Lo stato stazionario d'inattivazione è stato determinato mediante un protocollo a doppio impulso che consiste nell'applicazione di un impulso con voltaggio compreso tra -140 mV e

-30 mV dalla durata di 500 ms, seguito da un impulso di test costante a -20 mV di 10 ms con una frequenza di pulsazione a 0.5 Hz. L'ampiezza di picco della I_{Na} è stata normalizzata durante l'impulso di test al picco massimo della corrente ed è stata tracciata in funzione del potenziale. I dati sono stati interpolati con l'equazione di Boltzmann [12]:

$$h_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V - V_h}{s}\right)}$$

V rappresenta il potenziale di test, V_m e V_h sono rispettivamente il potenziale di attivazione e di inattivazione, ed s rappresenta la pendenza in mV. Il materiale di cui sono composte le pipette è il vetro borosilicato. Le punte di vetro sono state lucidate a calco dal microforgiatore MF 830. La resistenza della pipetta era compresa tra 1.4 e 2.6 M Ω . La compensazione delle resistenze in serie è stata adattata in modo da evitare che le oscillazioni andassero oltre un massimo del 25% della resistenza in serie non compensata. Le correnti sono state filtrate con una frequenza di taglio di 10 kHz.

Le correnti di whole-cell di Na^+ sono state registrate con la tecnica di voltage clamp a due elettrodi. Per tutte le registrazioni è stato utilizzato l'amplificatore TEC-05-S. La soluzione di (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES/KOH, pH 7.4, è stata utilizzata per determinare le ampiezze di picco della corrente, lo stato stazionario di attivazione, lo stato stazionario di inattivazione e la ripresa dopo l'inattivazione. Innanzitutto, è stata misurata la corrente in ingresso alla fine di un impulso di test della durata di 200 ms che potrebbe essere bloccata da 10 μ M di tetrodotossina in una concentrazione esterna di 96 mM di Na^+ ($I_{persistent}$). Successivamente, la concentrazione extracellulare di sodio è stata ridotta a 20 mM in modo tale da assicurare un adeguato controllo del voltaggio per i primi millisecondi dell'impulso di prova e per determinare l'ampiezza di picco della corrente nello stesso ovocita ($I_{transient}$). Nel suddetto caso la soluzione utilizzata era (in mM): 20 NaCl, 78 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES/KOH, pH 7.4. Le correnti sono state ricavate da potenziali di test da -80 mV a 40 mV dalla durata di 200 ms con un incremento di 5 o 10 mV (potenziale di holding -120 mV, frequenza di pulsazione 1.0 Hz).

L'espressione di un gran numero di varianti del canale del sodio mutate associate alla BrS, si traduce anche in una significativa riduzione dell'ampiezza di picco della corrente o anche in canali non funzionanti. Sorprendentemente, durante l'espressione delle sei varianti mutate N-terminali nelle cellule HEK293, in cinque di queste non è stata osservata una riduzione di corrente. R18Q, R27H, G35S, V95I e K126E hanno generato correnti whole-cell che erano comparabili a quelle osservate per hNav1.5 (gate di inattivazione del canale). Tuttavia, l'espressione di R104Q non ha portato canali funzionanti nelle cellule HEK293 (Figura 24).

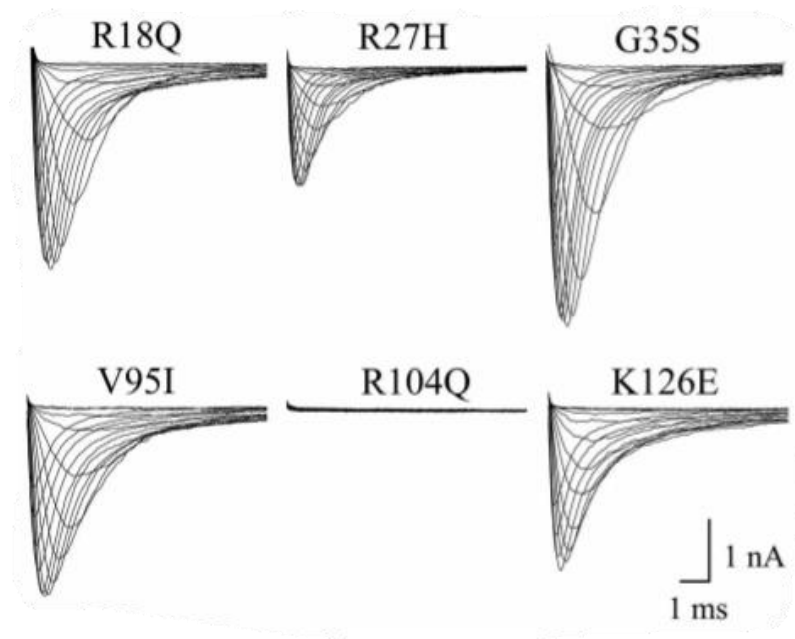


Figura 24: correnti di sodio in configurazione whole-cell espresse in HEK293 dei canali hNav1.5 mutati associati alla BrS [12].

È interessante come, nel momento in cui si inietta il cRNA di questa variante mutata negli ovociti di *Xenopus*, è stata osservata una corrente d'ingresso tipica di Na^+ , ma il picco delle correnti è stato ridotto del 29% rispetto al Nav1.5.

Nelle cellule HEK293, due delle cinque mutazioni funzionali del canale sono state caratterizzate mediante uno spostamento positivo del rapporto dello stato stazionario di attivazione. In R27H e K126E, il potenziale di attivazione V_m è stato rispettivamente spostato a 4 mV e 2.8 mV, e in R27H la pendenza è significativamente aumentata [12].

Questo cambiamento in R27H e in K126E è stato accompagnato rispettivamente da un'inattivazione più lenta del canale (in R27H) a potenziali di membrana meno depolarizzati (Figura 25).

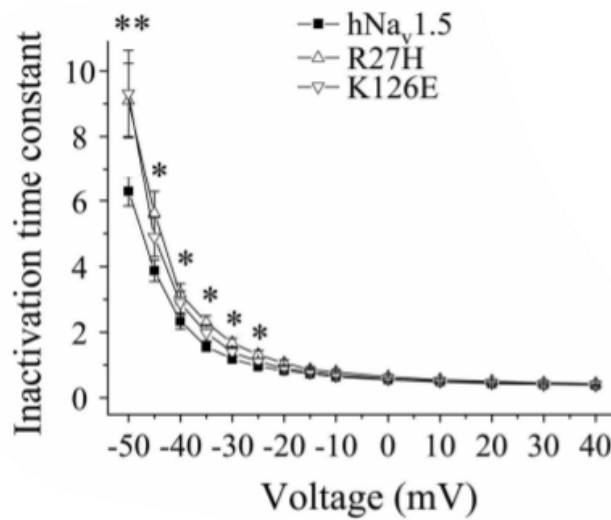


Figura 25: costante di tempo di inattivazione tracciata in funzione del voltaggio. I canali K126E vengono inattivati più lentamente a -50 mV. I canali R27H vengono inattivati più lentamente da -50 a -25 mV [12].

Le costanti di tempo dello stato stazionario di inattivazione e di attivazione in R18Q, G35S e in V95I non sono cambiati paragonandoli al hNav1.5, come mostrato in Figura 26. Analizzando lo stato stazionario d'inattivazione nel sistema di espressione dei canali del sodio dei mammiferi si è osservata un numero aumentato di proteine canale K126E: il corrispondente potenziale di inattivazione V_h era aumentato di 3.4 mV rispetto a quello di hNav1.5 [12].

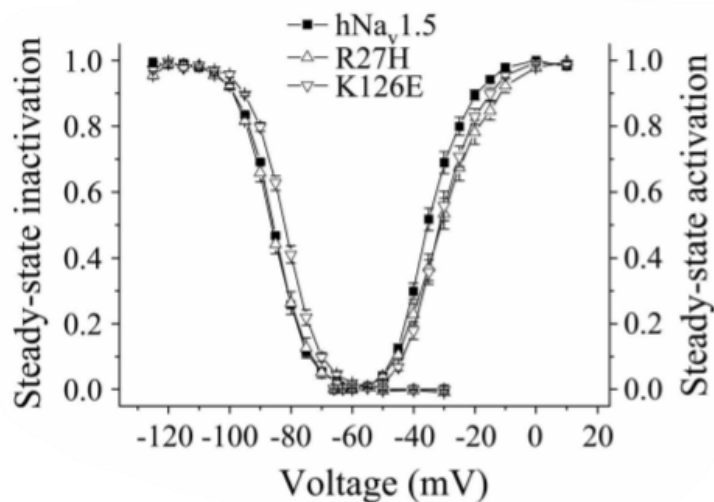


Figura 26: curve dello stato stazionario di attivazione e di inattivazione. Il potenziale di semi-attivazione (V_m) è stato significativamente spostato verso potenziali depolarizzati sia in R27H che in K126E. Il potenziale di semi-inattivazione (V_h) è stato spostato esclusivamente in K126E [12].

Le costanti di tempo per la ripresa dall'inattivazione non erano significativamente alterate nei canali mutati nella BrS.

Si è notata una diminuzione dell'ampiezza della costante di tempo di ripresa veloce e un aumento dell'ampiezza della costante di tempo di ripresa lenta in R27H. Analizzando le registrazioni degli ovociti con i canali mutati con la BrS, sorprendentemente, i parametri elettrofisiologici dello stato stazionario di attivazione, d'inattivazione e di recupero dall'inattivazione erano indistinguibili da quelli osservati in hNav1.5. Nessuno dei difetti dovuti alla perdita di funzione, osservati nei canali R27H e K126E nelle cellule HEK293, sono stati invece rilevati nel sistema di espressione dell'ovocita. L'espressione funzionale di R104Q negli ovociti di *Xenopus* ha permesso di determinare le proprietà elettrofisiologiche di questi canali mutati. Oltre ad una ridotta densità del picco di corrente, si è osservata una significativa riduzione della disponibilità del canale (Figura 27) [12].

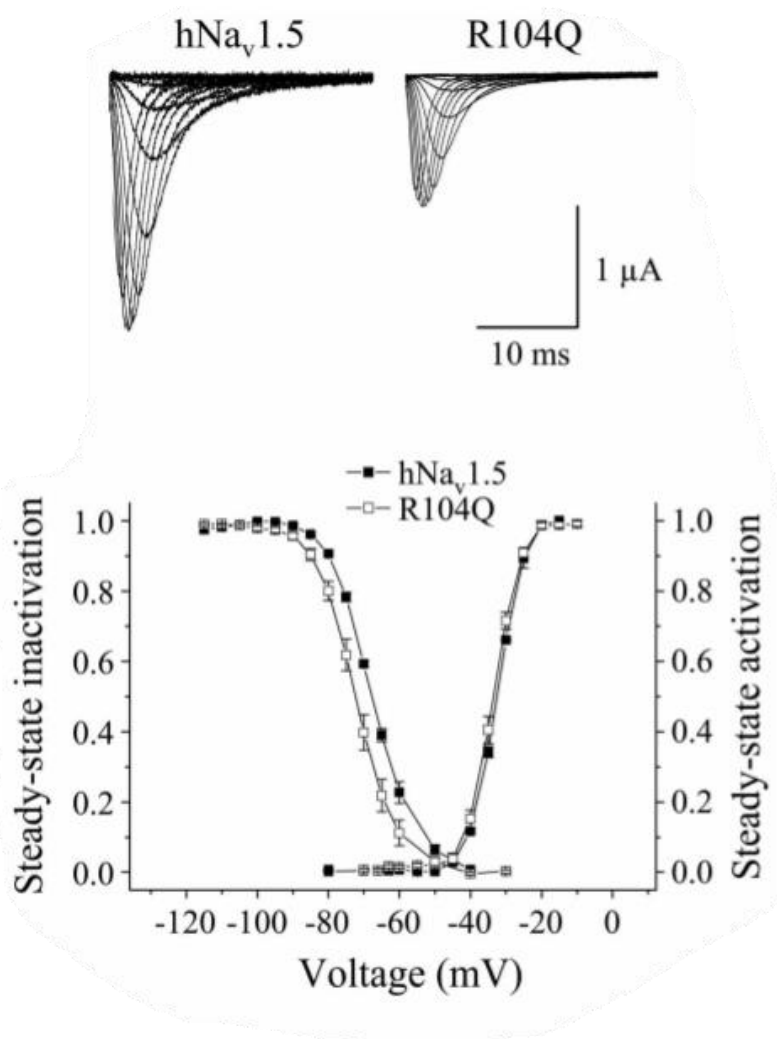


Figura 27: correnti di sodio nella configurazione Whole-Cell. Le ampiezze di picco della corrente erano significativamente ridotte in R104Q (pannello superiore), curve dello stato stazionario d'attivazione e di inattivazione (pannello inferiore) [12].

Il potenziale di inattivazione è stato spostato di 2.6 mV nella direzione di iperpolarizzazione. Allo stesso tempo, nel canale R104Q, il recupero dall'inattivazione è stato decelerato.

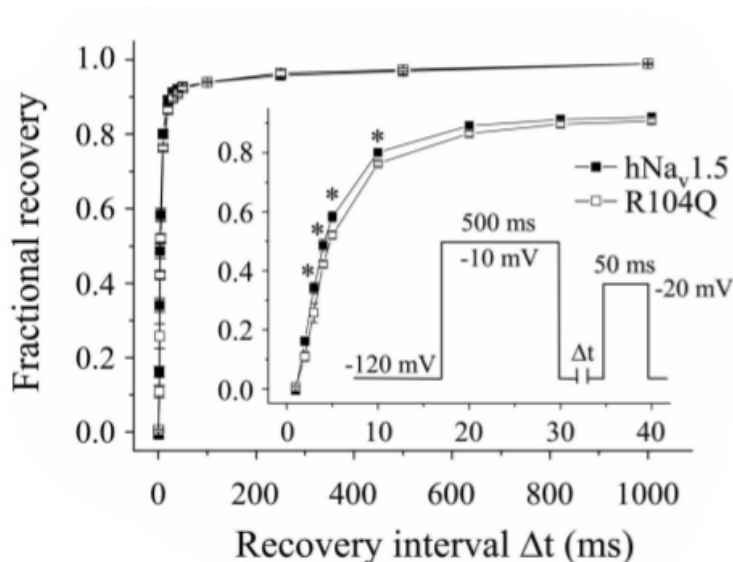


Figura 28: il recupero dall'inattivazione era più lento in R104Q [12].

Le costanti di tempo dello stato stazionario di attivazione e di inattivazione sono rimaste costanti rispetto ai corrispondenti dati di Nav1.5.

In conclusione, l'espressione di R18Q, G35S e V95I nelle cellule HEK293 e negli ovociti di *Xenopus* non ha provocato alcuna perdita di funzione, caratteristica tipica osservata nei canali mutati della BrS. Nelle cellule HEK293, i canali mutati R27H e K126E sono stati caratterizzati da uno spostamento positivo delle curve dello stato stazionario di attivazione. Questo è un risultato che corrisponde al fenotipo della BrS. Nelle cellule HEK293 il canale R104Q non era funzionante, mentre negli ovociti di *Xenopus* è stata riscontrata un'espressione funzionale di R104Q ma con un'ampiezza della corrente significativamente diminuita e con un tempo di recupero rallentato [12].

Da questo studio si sono ottenuti tre importanti risultati: in primo luogo, due mutazioni generano una perdita o un guadagno di funzione (R104Q e R27H) nella BrS. In secondo luogo, la maggior parte dei canali espressi in maniera eterologa o sono risultati indistinguibili dai hNav1.5 wild-type o sono caratterizzati da mutazioni elettrofisiologiche blande. Inoltre, analizzando le alterazioni del sistema elettrofisiologico che presenta i canali del sodio mutati, è stato osservato che queste sono molto più frequenti nei mammiferi che negli ovociti di *Xenopus* [12].

5.3 Cristina Balla et al., International Journal of Molecular Sciences (2021)

In questo studio sono riportati i risultati clinici di due famiglie italiane affette da BrS, in cui sono state riscontrate due varianti della mutazione SCN5A, le varianti P1310L e Ins1687GR. La variante P1310L è stata identificata in un uomo di 64 anni che aveva presentato a 56 anni un pattern di tipo I di BrS nell'ECG. Egli aveva una storia familiare positiva in quanto il fratello era morto di morte improvvisa all'età di 51 anni ed aveva ricevuto l'impianto di un ICD come prima prevenzione. In seguito, egli ha sviluppato aritmie ventricolari multiple che sono state trattate con l'ICD [11].

A causa di queste ricorrenti aritmie è stato sottoposto ad un'ablazione a radiofrequenza di una porzione dell'epicardio, portato a termine con successo. Nel secondo paziente, appartenente alla seconda famiglia in esame, è stata riscontrata la variante Ins1687GR. La paziente donna, dell'età di 57 anni, a 28 anni aveva subito un arresto cardiaco post partum e aveva ricevuto un ICD per prevenire altri arresti cardiaci. La madre della paziente era morta improvvisamente all'età di 38 anni [11].

5.3.1 Elettrofisiologia delle correnti

Generalmente le registrazioni vengono effettuate cinque minuti dopo aver stabilito la configurazione whole-cell. Soltanto le cellule con una resistenza di accesso $< 5 \text{ M}\Omega$ sono state utilizzate, le resistenze d'ingresso erano generalmente $> 600 \text{ M}\Omega$. Le correnti capacitive e le resistenze in serie (80%) venivano parzialmente compensate mediante l'utilizzo di circuiti amplificatori. Le correnti di dispersione erano sempre minori di 200 pA a *potenziali di holding* di -150 mV . Le cellule che presentavano una corrente $< 500 \text{ pA}$ o $> 5000 \text{ pA}$ sono state escluse dall'analisi. Le registrazioni di patch-clamp sono state analizzate offline utilizzando ClampFit 10.6 e il software Kaleidagraph.

Per determinare le relazioni tra la corrente ed il voltaggio, le correnti sono state ricavate attraverso impulsi di depolarizzazione di 20 ms da -100 a $+70 \text{ mV}$, con incrementi di 5 mV dal potenziale di holding di -150 mV , con una durata di cinque secondi tra impulsi (Figura 29) [11].

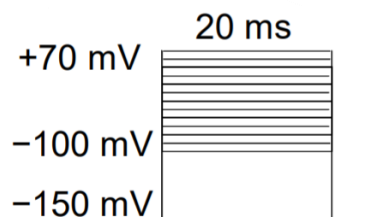


Figura 29: potenziale di holding di -150 mV con step di depolarizzazione di 20 ms da -100 mV a $+70 \text{ mV}$ per ricavare la relazione tra il voltaggio e la corrente [11].

Le ampiezze di picco della corrente ad ogni step di voltaggio sono state definite come le ampiezze di corrente massime. Le ampiezze di corrente sono state normalizzate alla capacità della cellula (C_m) per ottenere la densità di corrente (pA/pF).

La voltaggio-dipendenza dell'attivazione è stata misurata utilizzando il medesimo protocollo. Per analizzare le caratteristiche della dipendenza del voltaggio di attivazione, le ampiezze di picco della corrente venivano convertite in conduttanze ad ogni voltaggio così come segue:

$$g_{Na} = I_{Na}/(V_m - E_{rev})$$

dove V_m è il voltaggio di clamp e E_{rev} il potenziale di inversione per gli ioni sodio, che è stato determinato dall'equazione di Nernst ($E_{rev} = +68 \text{ mV}$). I valori di g_{Na} sono stati normalizzati alla conduttanza massima e tracciati in funzione del voltaggio.

Le relazioni tra la conduttanza ed il voltaggio sono state adattate all'equazione di Boltzmann:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{1}{(1 + \exp(-\frac{V_m - V_h}{k}))}$$

nella quale equazione V_h è il potenziale di membrana di semi-attivazione e k il fattore di pendenza [11].

La voltaggio-dipendenza dello stato stazionario d'inattivazione è stata misurata utilizzando un protocollo d'attivazione a due impulsi. Il primo impulso, che regolava il potenziale di membrana, veniva incrementato ogni 100 ms di 10 mV, con un potenziale di holding di -150 mV; questo era seguito da un impulso di test di -20 mV per 20 ms con un potenziale di holding di -150 mV. Le ampiezze di corrente misurate ad ogni impulso di test sono state normalizzate all'ampiezza di corrente massima (I_{max}) e sono state tracciate in funzione dell'impulso del voltaggio. Le curve dello stato stazionario d'inattivazione sono state interpolate con l'equazione di Boltzmann [11]:

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + \exp(\frac{(V_m - V_h)}{k})}$$

in cui V_h è il potenziale di membrana per la semi-inattivazione e k è il fattore di pendenza. Il decadimento della corrente di sodio, che avviene a -30 mV, è stato interpolato con una funzione esponenziale in modo tale da calcolare τ , la costante di tempo d'inattivazione, utilizzando l'equazione [11]:

$$I(t) = I_0 + A * \exp(-t/\tau)$$

La corrente I_{Na} sostenuta è stata valutata andando mediante depolarizzazioni con step di voltaggio da -120 mV a -30 mV in un intervallo di 100 ms (Figura 30) [11].

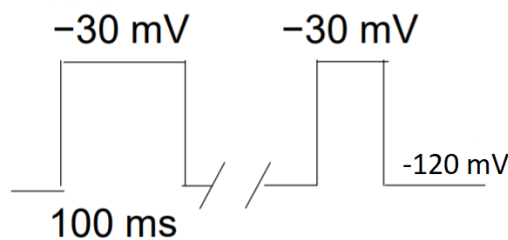


Figura 30: depolarizzazioni con step di voltaggio da -120 mV a -30 mV con intervallo di 100 ms.

Il recupero dall'inattivazione è stato stimato utilizzando un protocollo a due impulsi (con un intervallo tra gli impulsi di 5 s) da un potenziale di holding a -160 mV a -30 mV. Il voltaggio tra gli impulsi era a -160 mV e l'intervallo tra gli impulsi è stato modificato tra 0.3 a 1000 ms. Le ampiezze di picco della corrente misurate ad ogni impulso di test sono state normalizzate alle ampiezze di corrente misurate durante ogni impulso e sono state tracciate rispetto agli intervalli tra gli impulsi [11].

Il tempo di ripresa dall'inattivazione è stato analizzato attraverso l'interpolazione del rapporto tra le ampiezze di corrente con la funzione biesponenziale:

$$I(t) = \left[A_{fast} * \exp\left(\frac{t}{\tau_{fast}}\right) \right] + \left[A_{slow} * \exp\left(\frac{t}{\tau_{slow}}\right) \right]$$

con τ_{fast} e τ_{slow} che sono rispettivamente le costanti di tempo di recupero veloce e lento, A_{slow} e A_{fast} le ampiezze delle componenti lenta e veloce. L'area compresa tra l'intersezione delle curve voltaggio-dipendenza d'attivazione e d'inattivazione è stata calcolata utilizzando la regola dei trapezi, per analizzare l'effetto sulle correnti di finestra di Nav1.5. La sovrapposizione delle due curve definisce una finestra di potenziali (range di voltaggi) all'interno della quale i canali del sodio hanno una bassa probabilità di essere parzialmente attivati ma non totalmente inattivati e in cui alcuni canali potrebbero aprirsi. Una finestra di corrente più grande prevede un aumento del numero dei canali che si aprono a tensioni iperpolarizzate con un conseguente aumento della corrente di Na^+ entrante [11].

5.3.2 Caratterizzazione funzionale della variante P1310L

Per verificare se la mutazione P1310L fosse responsabile della BrS nei pazienti affetti, in questo studio si sono registrate le correnti del sodio mediante la tecnica del patch clamp nelle cellule HEK293, che esprimevano il canale Nav1.5 wild type o i canali mutati. La figura 31 mostra delle correnti tipiche del sodio, ricavate dalle cellule WT e dalle cellule che presentavano i canali mutati con la variante P1310L [11].

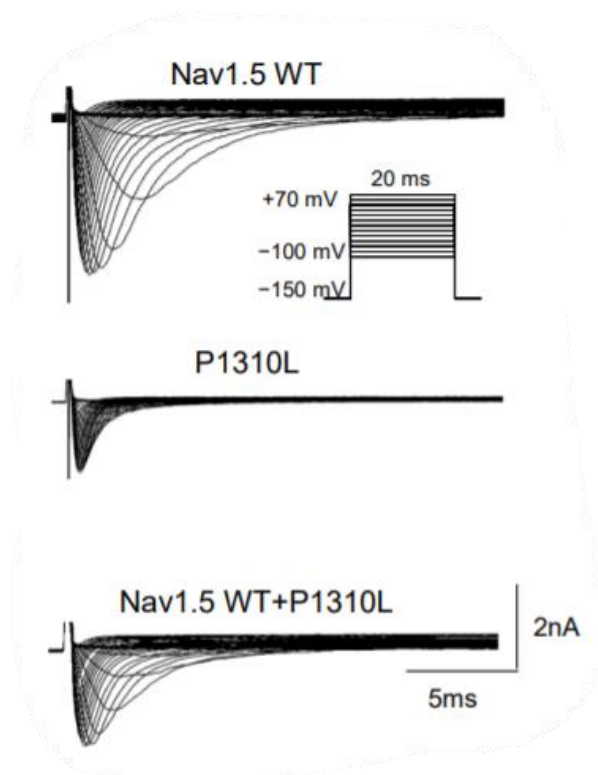


Figura 31: corrente di sodio nelle cellule trasfettate con il cDNA di Nav1.5 WT, P1310L e Nav1.5 + P1310L [11].

Le correnti di sodio WT iniziano ad attivarsi a -60 mV, con un picco a -45 mV e diminuiscono in ampiezza a potenziali più depolarizzati, poiché avviene una riduzione della driving force.

Come mostrato in figura 32 il picco della densità di corrente era significativamente ridotto nei canali P1310L (marker bianchi), più di tre volte, rispetto alle cellule WT [11].

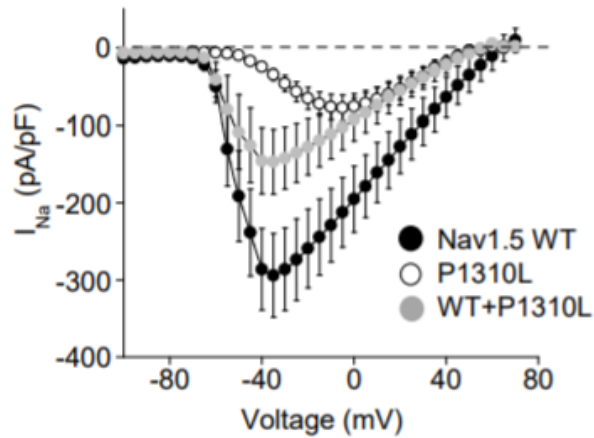


Figura 32: densità media della corrente di Nav1.5 WT, P1310L e Nav1.5 + P1310L in funzione del potenziale di membrana [11].

In seguito, è stato verificato se le modifiche dell'attivazione e dell'inattivazione della voltaggio-dipendenza dovute alla mutazione P1310L, potevano contribuire alla ridotta attività dei canali di P1310L e potevano avere rilevanza patogenetica per la BrS. Come mostrato nella Figura 33 il potenziale di attivazione per i canali P1310L è stato spostato di +15 mV verso potenziali positivi rispetto alle cellule WT, aumentando il grado della depolarizzazione richiesto per l'attivazione [11].

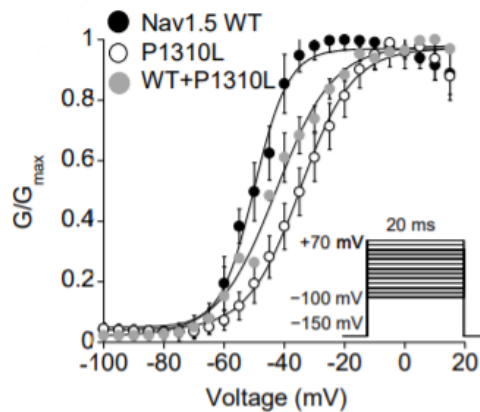


Figura 33: dipendenza dal voltaggio dell'attivazione [11].

Al contrario, la voltaggio-dipendenza dell'inattivazione veloce è stata leggermente spostata di + 7 mV verso valori di voltaggio positivi per le cellule con i canali mutati P1310L, rispetto alle WT (Figura 34) [11].

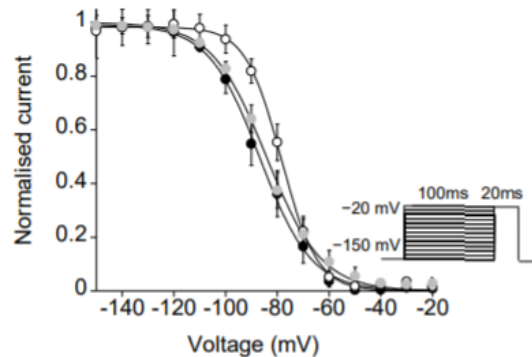


Figura 34: dipendenza dal voltaggio dell'inattivazione rapida [11].

I canali P1310L hanno anche mostrato una ripresa più veloce dall'inattivazione veloce rispetto alle WT (Figura 35) [11].

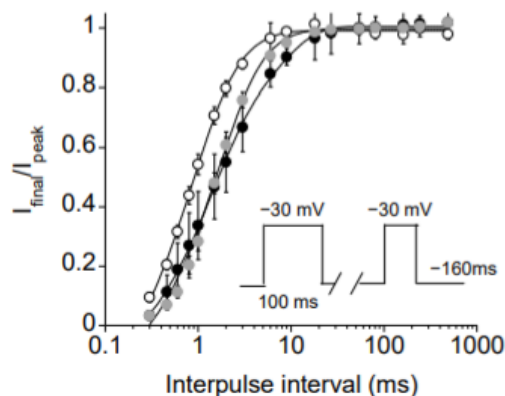


Figura 35: recupero dall'inattivazione rapida.

In seguito, si è studiata l'influenza di P1310L sulle correnti di finestra e sulle correnti sostenute. L'analisi dell'area sottesa nell'intersezione tra le curve dello stato stazionario di attivazione e d'inattivazione ha dimostrato che nel caso P1310L l'ampiezza delle correnti di finestra diminuiva del 40% rispetto alle cellule WT Nav1.5. P1310L ha ridotto anche la densità della corrente sostenuta misurata a -30 mV, come mostrato in figura 36 [11].

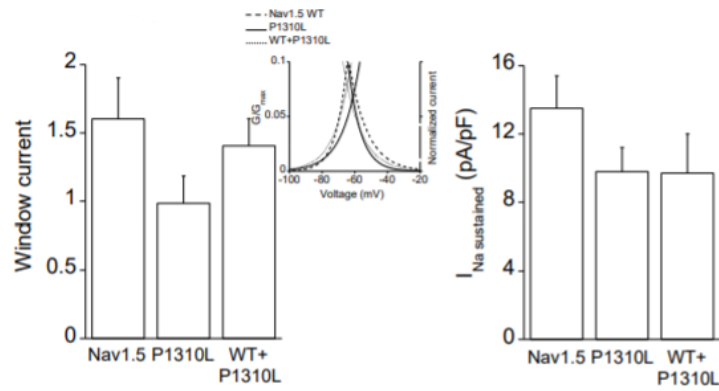


Figura 36: a destra si osserva un grafico a barre che mostra le misure della corrente di finestra per i canali indicati, a sinistra si osserva un grafico a barre che mostra le ampiezze delle correnti sostenute misurate alla fine di un impulso di 100 ms a -30 mV [11].

5.3.3 Caratterizzazione funzionale della mutazione del canale Ins1687GR

La mutazione Ins1687GR causa la completa perdita di funzionalità del canale Nav1.5 dal momento che riduce la densità di corrente del sodio di 25 volte rispetto alle cellule WT (Figura 37) [11].

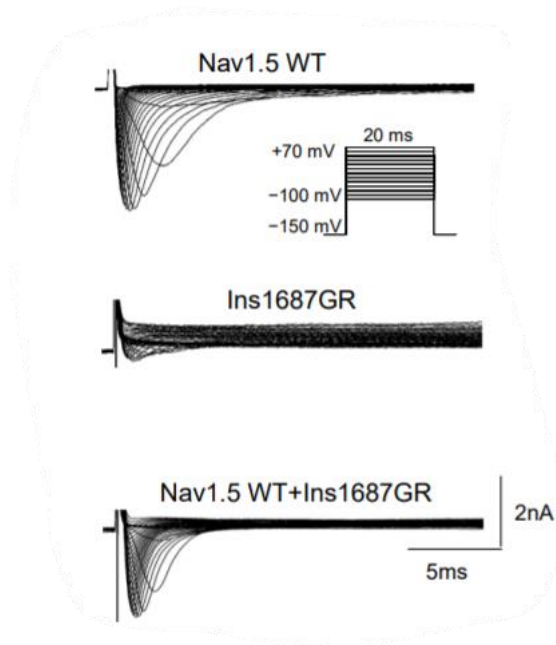


Figura 37: correnti del sodio rispettivamente trasfettate con il cDNA di Nav1.5 WT, Ins1687GR e Nav1.5 + Ins1687GR [11].

Sfortunatamente il basso livello di corrente registrata nei canali mutati Ins168716GR ha ostacolato qualsiasi ulteriore analisi biofisica del solo canale mutante [11].

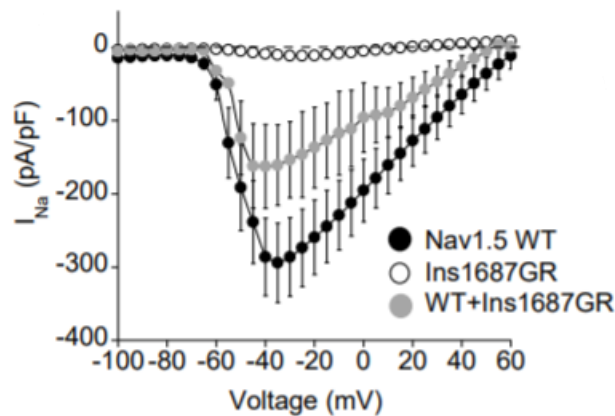


Figura 38: densità media di corrente dei canali di Nav1.5 WT, Ins1687GR e WT + Ins1687GR in funzione del potenziale di membrana [11].

5.4 Michelle M. Monasky et al., “International Journal of Molecular Sciences” (2021)

In questo studio, sono stati forniti dati umani cruciali sulla variante eterozigote p.Val1667Asp nel gene SCN5A e si vuole dimostrarne la segregazione con una forma grave di BrS e morti improvvise multiple. I dati funzionali hanno rivelato una perdita di funzione della proteina interessata dalla variante. Questi risultati forniscono la prima associazione di malattia con questa variante e dimostrano l'utilità dei test genetici per la diagnosi e la stratificazione del rischio in alcuni pazienti. Questo studio dimostra anche l'utilità di raccogliere la storia familiare, che può aiutare nel comprendere la gravità della malattia in determinate situazioni e confermare l'importanza degli studi funzionali per distinguere tra mutazioni patologiche e varianti genetiche innocue [13].

Il potenziale di holding era di -100 mV. Lo stato stazionario d'attivazione è stato studiato con impulsi da -80 a +75 mV (+5 mV di incremento, 25 ms di durata).

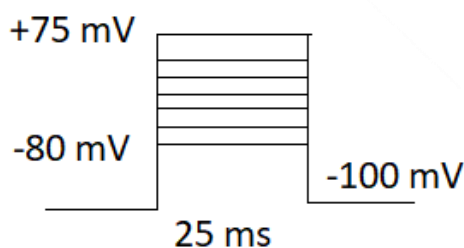


Figura 39: protocollo di attivazione con potenziale di holding a -100 mV e impulsi depolarizzanti da -80 a +75 mV [13].

Il protocollo di inattivazione allo stato stazionario ha avuto un primo step di durata di 500 ms (da -140 a +10 mV, incremento di +10 mV) seguito da un impulso di test di -10 mV (durata 20 ms). Il recupero dall'inattivazione è stato studiato attraverso un protocollo in cui due step da 10 mV (rispettivamente 500 ms e 20 ms di durata) sono stati divisi per un impulso di 100 mV di durata crescente da 0,01 ms a 3 s. La dipendenza dal tempo dell'inizio dell'inattivazione intermedia e lenta è stata misurata utilizzando un protocollo a due impulsi: il primo impulso P1 è passato dal potenziale di mantenimento di -100 mV a -10 mV (durata crescente da 1 a 1000 ms), quindi un passo indietro a -100 mV per 20 ms lascia che i canali si riprendano dalla disattivazione rapida e infine il secondo impulso P2 a -10 mV (durata 20 ms) consente la registrazione della corrente di sodio. Il rapporto P2/P1 risultante è stato normalizzato e tracciato rispetto alla durata P1 [13].

L'inizio del processo di inattivazione rapida è stato studiato interpolando il decadimento delle tracce di corrente di picco suscitate da una depolarizzazione di 25 ms da -100 a +20 mV con una funzione mono esponenziale.

Il canale mutante p.V1667D è stato transitoriamente sovraespresso nelle cellule HEK293 in presenza della subunità $\beta 1$. Le sue proprietà funzionali sono state studiate mediante esperimenti di whole-cell patch-clamp. Al fine di imitare il background genetico dei pazienti, il canale mutato è stato anche co-espresso con Nav1.5 WT. Le figure 40, 41 e 42 riassumono i risultati trovati e li confrontano con quelli ottenuti nella proteina WT [13].



Figura 40: famiglie tipiche di correnti registrate da cellule HEK che esprimono il canale WT, WT/p.V1667D e p.V1667D Nav1.5. L'ampiezza della corrente, misurata in 40 mM di Na^+ extracellulare è stata normalizzata dalla capacità della cellula [13].

Il livello dell'espressione era molto variabile, soprattutto per il canale WT; tuttavia, la presenza della mutazione ha ridotto significativamente l'entità della densità di corrente e ha ritardato la cinetica sia dell'attivazione che dell'inattivazione rapida e l'andamento temporale del recupero dall'inattivazione (Figura 42 (dx)) [13].

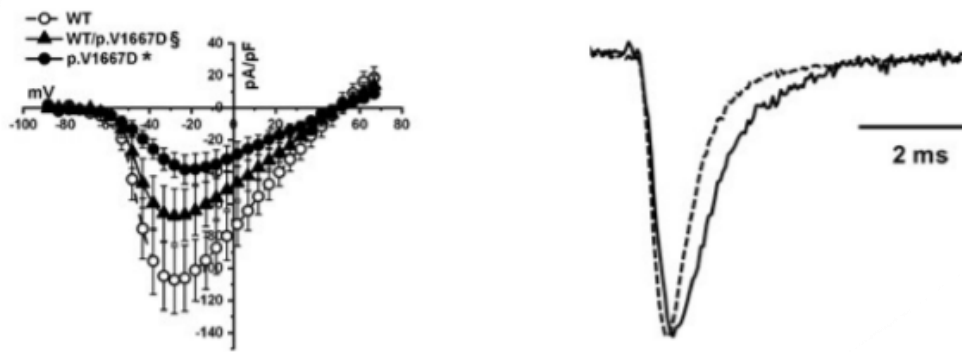


Figura 41: rapporto corrente-tensione medio (sx), confronto della corrente normalizzata WT (linea tratteggiata) o p.V1667D (linea continua) Nav1.5 provocata da una depolarizzazione di -20 mV che mostra la compromissione della cinetica del processo di attivazione o di inattivazione rapida (dx) [13].

La dipendenza dalla tensione dell'attivazione non è stata influenzata, mentre la curva di disponibilità è stata spostata a destra di 5 mV nelle cellule che esprimono solo la forma mutata del canale. Infine, non abbiamo osservato differenze legate alla mutazione nello sviluppo del processo di inattivazione intermedio e lento [13].

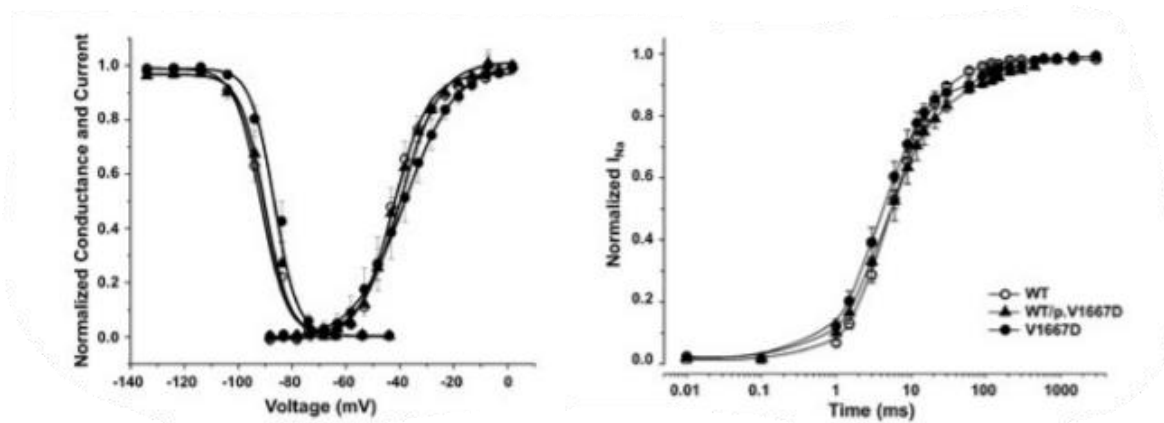


Figura 42: curva dello stato stazionario d'attivazione (sx), recupero dall'inattivazione (dx) [13].

5.4.1 Risultati

Nel presente studio, tre membri della famiglia sono morti improvvisamente e, dei due membri viventi della famiglia portatori della mutazione, il probando ha subito un arresto cardiaco abortito, mentre sua sorella è ancora più giovane dell'età in cui uno qualsiasi dei suoi familiari i membri hanno sperimentato per la prima volta un evento cardiaco. A questo punto, non è possibile escludere la possibilità che lei abbia un arresto cardiaco. Pertanto, sembra che il tasso di mortalità in questa famiglia sia insolitamente alto.

Per quanto riguarda la stratificazione del rischio aritmico, ampi registri non associano una storia familiare di SCD o la presenza di varianti nel gene SCN5A con un aumentato rischio di fibrillazione ventricolare [10]. Tuttavia, nel presente studio, è evidente che i dati raccolti dai familiari possono essere estremamente utili al medico per comprendere la gravità del fenotipo risultante da una variante genetica e nel determinare la gestione clinica. Quando una famiglia con una forte storia di morte improvvisa, come quella qui descritta, viene presentata

alla clinica, offre una grande opportunità per comprendere l'associazione di una particolare variante genetica con la gravità della malattia. In questo caso, il test genetico potrebbe essere utilizzato per suggerire ai familiari che necessitano di un ICD, anche se le attuali linee guida non si basano sui test genetici per la stratificazione del rischio.

La variante p.V1667D ha indotto una perdita di funzione nel canale NaV1.5, che ha mostrato un'entità ridotta della densità di corrente di circa il 40% e una compromissione della cinetica dell'attivazione e del recupero dall'inattivazione imitando il substrato genetico dei pazienti nelle cellule HEK293. Ciò suggerisce fortemente che lo spostamento radicale della classe di aminoacidi da un residuo idrofobico (V) a uno polare, caricato negativamente (D), è la causa del fenotipo dell'uomo nel presente studio. Per essere approfonditi, i dati patch-clamp ottenuti da cellule che esprimono la sola variante p.V1667D, imitando così un ipotetico paziente omozigote, hanno mostrato uno spostamento a destra nella curva di disponibilità, suggerendo in questo caso un numero maggiore di canali pronti per essere innescati dopo uno stimolo, caratteristica più tipica di un guadagno di funzione così come il rallentamento della cinetica di inattivazione. Riportiamo questa osservazione per completezza di informazioni, sottolineando, tuttavia, che tutti i portatori qui descritti sono eterozigoti per la variante SCN5A [13].

Conclusioni

L'obiettivo principale del presente lavoro di Tesi è quello di descrivere ed analizzare studi in cui venivano applicate tecniche di Voltage-Clamp per lo studio dell'elettrofisiologia della I_{Na} in canali mutati associati alla BrS.

In questo elaborato sono stati presi in esame diversi studi in cui negli esperimenti di Voltage-Clamp venivano applicati dei potenziali di holding più negativi rispetto a quello di riposo di un cardiomiocita in uno stato fisiologico (-90 mV).

Questi potenziali hanno accertato, nella maggior parte dei casi, una perdita di funzione del canale di sodio esaminato. In ogni studio, i canali di sodio in cui veniva fatta esprimere la mutazione sono stati confrontati con cellule wild-type (o eterologhe) in cui si è fatta esprimere la proteina canale del sodio non mutata. Si è constatata la perdita di densità di corrente nei canali mutati andando a comparare le curve di attivazione, di inattivazione, e di recupero dall'inattivazione rapida e lenta dei canali wild-type con le curve dei canali che presentavano la mutazione espressa.

In particolare, si sono studiati i diversi protocolli di attivazione e di inattivazione utilizzati per la caratterizzazione in vitro di queste correnti, andando ad evidenziare, per ogni mutazione, quale potenziale di holding è stato utilizzato e che risposta si è ottenuta dalla mutazione in seguito allo specifico potenziale utilizzato.

Gli studi hanno dimostrato che gli esperimenti di Voltage-Clamp svolgono un ruolo chiave nella caratterizzazione e nell'identificazione della corrente di sodio nei canali mutati. Questi ultimi hanno anche evidenziato una eterogeneità nella risposta ad un potenziale di holding uguale per varianti della mutazione del canale del sodio differenti. Non tutte le mutazioni associate al canale del sodio implicato nella BrS (SCN5A) hanno dato come risposta una perdita di funzione del canale.

Gli esperimenti di Voltage-Clamp hanno sottolineato come, andando ad applicare dei potenziali di partenza più negativi di quelli fisiologici di un cardiomiocita (-120 mV/ -150 mV/ -100 mV), si possono caratterizzare le diverse mutazioni associate alla Sindrome di Brugada e si può analizzare quali tra queste danno come risultato un difetto di conduzione dell'impulso elettrico cardiaco.

Ringraziamenti

In conclusione di questo elaborato desidero ringraziare il Professor Severi e la Professoressa Bartolucci che mi hanno accompagnato e supportato durante tutta la stesura della Tesi.

Ringrazio i miei genitori e mia sorella Chiara per essermi stati sempre vicini, soprattutto nei momenti più bui e difficili, ringrazio i miei nonni che sono sempre con me, i compagni di corso conosciuti durante questi tre anni e gli amici di sempre. Un ringraziamento speciale va ad Agnese che è stata con me in ogni istante, mi è stata vicino e mi ha spronato e scosso nei momenti di smarrimento e festeggiato con me nei momenti di gioia.

Bibliografia

- [1] https://it.wikipedia.org/wiki/Cuore_umano
- [2] Frank H. Netter, In: “Atlante di anatomia, fisiopatologia e clinica (Volume 1, Cuore)”
- [3] https://it.wikipedia.org/wiki/Sistema_di_conduzione_del_cuore
- [4] https://it.wikipedia.org/wiki/Canale_del_sodio
- [5] Jean-Baptiste Gourraud et al. *Brugada syndrome: Diagnosis, risk stratification and management*. In: “Archives of Cardiovascular Disease” (2017)
- [6] Ramon Brugada et al. *Brugada Syndrome*. In “Methodist DeBakey cardiovascular journal” (2014)
- [7] Haarika Korlipara et al. *Brugada syndrome*. In: “Acta Cardiologica” (2021)
- [8] Juan Sieira and Pedro Brugada. *The definition of Brugada Syndrome*. In: “European Society of Cardiology” (2017)
- [9] Ka Hou Christien Li et al. *Brugada syndrome: A comprehensive review of pathophysiological mechanisms and risk stratification strategies*. In: “International Journal of Cardiology & Vasculature” (2020)
- [10] Gary Tse et al. *Electrophysiological Mechanisms of Brugada Syndrome: Insights from Pre-clinical and Clinical Studies*. In: “Frontiers in Physiology” (2016)
- [11] Cristina Balla et al. *Functional Characterization of Two Novel Mutations in SCN5A Associated with Brugada Syndrome Identified in Italian Patients*. In: “International Journal of Sciences” (2021)
- [12] Christian Gütter et al. *Characterization of N-terminally mutated cardiac Na⁺ channels associated with long QT syndrome 3 and Brugada Syndrome*. In: “Frontiers in Physiology” (2013)
- [13] Michelle M. Monasky et al. *Novel SCN5A p.Val1667Asp Missense Variant Segregation and Characterization in a Family with Severe Brugada Syndrome and Multiple Sudden Deaths*. In: “International Journal of Molecular Sciences” (2021)
- [14] <http://www.scienze-naturali.com/cuore-umano/1287>
- [15] https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/169154/170222/phd_unimi_R08185.PDF
- [16] Hans Reiner Polder et al., In: “Voltage-Clamp and Patch-Clamp Techniques”
- [17] Bingcai Guan et al., In: “Two-Electrode Voltage Clamp” (2013)
- [18] Simona Casini et al. *Characterization of a novel SCN5A mutation associated with Brugada Syndrome reveals involvement of DIIS4-S5 linker in slow inactivation*. In: “European Society of Cardiology” (2007)

[19]<https://amslaurea.unibo.it/14176/1/Elettrofisiologia%20del%20cuore%20e%20pacemaker.pdf>

[20] Christiaan C. Veerman et al. *The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product Nav1.5 role in physiology and pathophysiology*. In: "HHS Public Access".