



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL COMPONENTE
GENÉTICO DE LA MUERTE
SÚBITA INFANTIL INEXPLICADA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
MONTSERRAT SANTORI GÓMEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO 99/2011 EN MEDICINA MOLECULAR.

FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

JULIO 2015





La Doctora **María Brion Martínez**, directora del Grupo de Xenética de Enfermedades Cardiovasculares e Oftalmolóxicas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela y el Profesor Doctor **Ángel Carracedo Álvarez**, Catedrático de Medicina Legal de la Facultade de Medicina e Odontoloxía de la Universidade de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN

que la presente memoria que lleva por título: *“Estudio del componente genético de la muerte súbita infantil inexplicable”* de la licenciada en Biología por la Universidade de Vigo, Doña **Montserrat Santori Gómez** ha sido realizada bajo su dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para ser presentada ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela a 08 de julio de 2015.

Fdo.: Dra. María Brion Martínez

Fdo.: Prof. Dr. Ángel Carracedo Álvarez

Montserrat Santori Gómez





FINANCIACIÓN



FINANCIACIÓN

Los trabajos aquí presentados han sido financiados con fondos del CIBERER (CB06/07/088), Proyectos de Investigación en Salud (PI10/00851 y PI13/00933) del Instituto de Salud Carlos III, y fondos de la Red de Investigación Cardiovascular (RD012/0042/0037) del Instituto de Salud Carlos III.

El trabajo de Montserrat Santori Gómez ha sido financiado con una Beca Lanzadera del CIBERER, una Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud (FI10/00077) del Instituto de Salud Carlos III (incluyendo ésta la estancia predoctoral de investigación en el Centre de Recerca Cardiovascular del Institut d'Investigació Biomèdica de Girona y la Universitat de Girona) y un contrato con cargo al proyecto Inno-Pharma, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad.





AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Recuerdo la primera vez que vine a Santiago a entrevistarme con Ángel como si fuera ayer, o casi. Recuerdo el viaje en tren, el día de sol, mi cuaderno de preguntas siempre a mano y el desayuno terrible que me sirvieron nada más llegar al Casco Vello (¡qué mala suerte...!). Recuerdo la charla agradable que tuvimos, cómo fui tachando preguntas de mi cuaderno y la primera visita al laboratorio de Medicina Legal durante la cual vi a las que, unas semanas más tarde, serían mis nuevas compañeras de trabajo. Y hoy me parece mentira que haya pasado tanto tiempo y que hayan cambiado tanto las cosas, pero desde el primero hasta el último día de esta etapa sólo puedo estarle agradecida por haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran grupo de personas. Gracias Ángel.

Gracias María por contar conmigo para hacer crecer el grupo de Cardio. Gracias por tu confianza, tu dedicación, tu franqueza y honestidad, por tu apoyo constante y por dar la cara por nosotros en todo momento. Es un privilegio trabajar contigo y con mis compañeros de laboratorio; y creo que, si no lo somos todavía, ¡deberíamos ser la envidia de todos los grupos! Por esta maravillosa relación profesional y también personal que hemos fabricado en Cardio. Por todo ello, gracias infinitas; sólo deseo haber estado a la altura.

Antes de mencionar a mi gente, quiero agradecer profundamente a las familias que han participado en este estudio por su paciencia y su inestimable colaboración. Con que este trabajo haya servido para ayudar a una sola persona, yo me doy por satisfecha. Esta tesis es vuestra.

Mi más sincera gratitud y todo mi cariño son para mis compañeros de laboratorio. ¡Y qué compañeros tengo! Si hay algo de lo que estar orgullosa de verdad es de tener a esta gente al lado todos los días y el buen ambiente que generan. Gracias Rocío por tu amistad, tu perseverancia y tu incansable labor en el trabajo; sin ti esta etapa de tesis no habría sido lo que es, ni dentro ni fuera del laboratorio. Te deseo lo mejor en tu nueva vida de mamá, de la que espero seguir formando parte muchos años. Gracias Cata por la felicidad que transmites cada vez que hablas, aunque estés a miles de kilómetros de distancia y sobre todo, gracias por haber sido una *señorita* estupenda durante mis primeros

años en el laboratorio. Gracias Alex por tu serenidad, tu paciencia y tus explicaciones cuidadas, y ¡cómo no! por las clases de tiro con arco que espero repetir algún día. Sin duda he tenido grandes maestros. Gracias Eva, porque conviertes los días grises en azules con tu alegría y humor; es imposible no sonreír si estás cerca y además ¡ya no sé qué habría sido de mí sin el fantástico baile de los viernes! Gracias Marina por tu optimismo y por haberte convertido en compañera de aventuras también fuera de estas cuatro paredes, gracias por apuntarte a un bombardeo y encajar tan bien en mi vida; ¡gracias por ser mi amiga! Gracias Mariña por tu sonrisa constante, por amenizar los viajes en autobús y por haber tirado de mí para meterme en el mundo de las carreras; en cuanto vuelvas nos apuntamos a una, ¡ve pensando cuál quieres! A vosotras dos os deseo toda la suerte en vuestras respectivas tesis, ¡a comerse el mundo! Gracias Sandra y Ángela porque sois el positivismo personificado, por todo el trabajo que hacéis cada día y por los “¡BUENOS DÍAS!” con mayúsculas y en alto, y esos pequeños momentos en los que compartimos recetas, manualidades y truchitos varios, y que hacen que cada día sea especial venir a trabajar. Gracias a todos porque es un privilegio ser vuestra compañera.

Quisiera dar las gracias también a los compañeros del Instituto de Ciencias Forenses de la Facultad de Medicina por todo lo que me enseñaron y pude aprender de cada uno de ellos. Los comienzos en una ciudad nueva siempre son difíciles, pero con vosotros todo fue mucho más fácil. Aunque ya no os vea tan a menudo, siempre os recuerdo con cariño y os estaré enormemente agradecida.

Un gracias enorme es para toda la gente de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, los que estáis, y los que estuvisteis, por vuestro cariño diario, los cafés y almuerzos en los que acabábamos muertos de risa todos los días y que animaban cualquier día por muy tonto que se presentase. No os mencionaré uno por uno por miedo a olvidarme de alguien –vosotros sabéis quiénes sois– y, aunque sé que os he abandonado bastante de un tiempo a esta parte, espero que sepáis perdonarme por todo.

Gracias a toda la gente de CEGEN, María Torres, Juan y Rosana por vuestra ayuda con el trabajo que se presenta en esta tesis, y a Inés, Shaila y Ana Pastoriza (a la que mando un beso especial) por el que ha quedado en el tintero. Gracias Bea Sobrino, por tu trabajo y dedicación, (y por todas las recetas que nunca me saldrán igual que a ti pero que seguiré intentando hacer pacientemente). Gracias también a Susana y Narenkha por su ayuda con la ultrasecuenciación y, por supuesto, al equipo de bioinformática, Jorge, Xabi y Luis, que sois/habéis sido una pieza fundamental de este trabajo.

Gracias a Ramón Brugada y a todo el grupo GenCardio del Institut d'Investigació Biomèdica de Girona por permitirme disfrutar durante tres calurosísimos meses de verano en esa preciosa ciudad y ofrecerme su laboratorio para desarrollar un proyecto tan bonito. Muchísimas gracias Fabi y Guille por dirigir este trabajo y por acogerme en vuestra casa los últimos días de mi estancia allí. He aprendido muchísimo de vosotros y espero haber estado a la altura de lo que se esperaba de mí. Y gracias sobre todo a Helena

por haberme ayudado mano a mano en el laboratorio y facilitarme tanto las cosas (¡enhorabuena mamá!). Os recuerdo con muchísimo cariño.

Nesta casa non se come ou que? Gracias a mis amigos (lo puedo decir más alto, pero no más claro) del laboratorio por haber cruzado la línea de lo profesional y haber formado esta pandilla estupenda que comparte galipizzas, cañas, chistes, noches de juergas... ¡vidas, al fin y al cabo! Gracias Olalla por lo especial que eres, tenerte como amiga es de lo mejor que me ha pasado nunca (¡minuto 1!) y te deseo toda la felicidad del mundo con Alberto. Gracias Alberto y Ana porque sois dos de las mejores personas que he conocido y da gusto teneros cerca; todo es más bonito con vosotros y la sobrina y media que tengo. Gracias Luis por tu alegría, tu confianza, tus consejos y las horas al teléfono (vaya cuerda tenemos) que acortan la distancia. ¡Disfruta de mi tierra todo lo que puedas! Gracias Manu por tu humor y tu actitud conciliadora cuando más hace falta, ¡qué sería de nosotros sin ti! A ti y a Rocío os deseo lo mejor de lo mejor con la pequeñaja. Gracias Miguel por tu serenidad y tu buena fe; eres todo un ejemplo y sólo falta que aflojes esa agenda apretada que tienes para que podamos verte más. Gracias María Cerezo, por recordarme a la que ha sido mi tierra tantos años, por tu sinceridad y tu amistad incondicional, por los buenos ratos que hemos pasado tantas tardes de fútbol y cañas. ¡Te echo de menos cada día! Gracias porque sois lo más especial que he encontrado en esta ciudad.

Gracias también a las tres personas que salieron por la puerta del laboratorio para entrar por la puerta del apartamento de Montero Ríos y convertirse en las mejores compañeras de piso que una podría tener. Grazie Francesca e Rossana, and thank you Özlem; thanks to all of you for the good moments we spent together in Santiago!

Fuera de Santiago también hay vida y puedo presumir de vivirla rodeada de algunas de las mejores personas que existen en el mundo. No puedo dejar de dar las gracias a Antón, Montse y María Portomeñe, campeones de fútbolín de las siete parroquias (Bembrive, Beade, Matamá, Cabral, Zamáns, Valladares... ¡y Peniche!) por su vitalidad, su empatía y su cariño incondicional. Sois los mejores amigos que toda persona querría tener y espero vivir muchos años más a vuestro lado y el de los que están a punto de llegar. Gracias a Ahiker, Pili, Cebré y Kitos porque vuestra amistad durante todos estos años ha sido la piedra angular de mi vida en Vigo y porque con vosotros los buenos ratos están asegurados, sea aquí o a mil kilómetros. Gracias a Ana y Quintas por haberse convertido en compañeros infatigables de acampada y pesca, porque sois buenísima gente y no puedo ser más afortunada de que hayáis entrado en mi vida. Gracias a Patri, Pita, Varela, Zapa, Adri, Lebo, Ra, Álvaro y Alex (sois fuente de inspiración), David, Mónica, y un largo etcétera; compañeros de churrascada, fútbolín, playeo y demás actividades de ocio, por compartir tan buenos ratos conmigo.

Gracias a Cátia por enseñarme lo que es la valentía, el coraje y la necesidad de arriesgarte en la vida para conseguir tus metas. Eres, sin duda, la amiga a la que más

admiro. Gracias por convertir las fronteras en sellos de pasaporte y transformar cada minuto que vives en una aventura que contar a los demás. ¡Nos vemos en tu próximo destino!

Gracias a Vero, y Esti por ser lo mejor de la época de la Universidad, porque sois buenísimas amigas y espero que siga siendo así por muchos, muchísimos años (¡ánimo, Vero, que ya no falta nada!). Sin vosotras, esos años no habrían tenido sentido. Os deseo sólo éxitos en la vida, porque os los merecéis. ¡Gracias!

Gracias a Kika (y a toda mi familia adoptiva) porque si hay una amistad que ha durado en el tiempo y merece ser contada es la nuestra. Gracias porque fue después de una llamada tuya cuando decidí apostar todo por seguir el camino que he elegido y no me arrepiento de nada. Gracias porque, aun estando separadas, haces que cada vez que hablamos y nos vemos parezca que fue ayer la última vez que estuvimos juntas. ¡Te quiero muchísimo y te echo terriblemente de menos!

Gracias a Carlos por su ayuda constante y por aguantar la vara que le doy cada vez que tengo dudas “del deber cotidiano”, y que él resuelve en cinco minutos sin rechistar. ¡Gracias por seguir siendo un amigo aun en la distancia!

Gracias a mi familia, que aunque están todos lejos, viajan conmigo en autobús cada día y los tengo presentes minuto a minuto. Gracias a Maeli y Olo (un beso enorme hacia las alturas) por su amor y su interés incesante en mi trabajo. Gracias a todos mis tíos y tías, y a mis primos por su curiosidad y su apoyo, y a Tita Mari por su ayuda siempre que la he necesitado. ¡Os quiero hasta el infinito!

Gracias de todo corazón mamá, Paula y Yago, por vuestro apoyo incondicional cada día, por ser la rama que soporta el peso que arrastran los días malos pero también la misma que florece y llena la casa de alegría en los días buenos; porque sois quienes dais sentido a mi vida y sin vuestra ayuda y el interés que mostráis por mi trabajo, nada de esto tendría sentido. Esta tesis es para vosotros. Gracias papá, por haberme inculcado el amor por la ciencia, por haberme enseñado tantas cosas de la vida en tan poco tiempo y por haberte convertido en un ejemplo a seguir, aunque hayas dejado el listón tan alto. Espero que estés orgulloso de mí todos los días, como yo lo estoy de ti. ¡Sois lo mejor de mi vida!

Y por último, gracias a ti, Perico de mis amores; porque apareciste a mitad de camino de esta etapa, pero ha sido para quedarte. Porque estás al pie del cañón todos los días, para lo bueno y para lo malo. Porque tienes un corazón que no te cabe en el pecho y eres la persona más generosa y buena del mundo. Porque ya no sé qué haría sin ti. Gracias por ser quien eres, por tener tu peculiar y divertida visión del trabajo que hago y por hacerme formar parte de una familia que me quiere tanto y a la que yo también quiero como si fuese la mía propia.

Gracias a todos, de verdad. Nunca serán suficientes las palabras.

A mi padre







ÍNDICE DE CONTENIDOS



ÍNDICE DE CONTENIDOS

FINANCIACIÓN	V
AGRADECIMIENTOS	IX
ÍNDICE DE CONTENIDOS	XVII
LISTADO DE FIGURAS	XXIII
LISTADO DE TABLAS	XXVII
ABREVIATURAS	XXXI
INTRODUCCIÓN	1
I. MUERTE SÚBITA CARDÍACA.	3
I.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA.	3
I.1.1. MUERTE SÚBITA CARDÍACA EN ADULTOS.	4
I.1.2. MUERTE SÚBITA INFANTIL INESPERADA O INEXPLICADA	5
I.2. FISIOPATOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.	7
II. ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA.	10
II.1. ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DEL CORAZÓN.	10
II.1.1. ESTRUCTURA DE LA SARCÓMERA.	10

II.1.2. MECANISMO DE EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO:	12
II.1.3. TRASTORNOS ESTRUCTURALES HEREDITARIOS ASOCIADOS.....	13
II.1.3.1. MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.	15
II.1.3.2. MIOCARDIOPATÍA DILATADA.....	18
II.1.3.3. MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DEL VENTRÍCULO DERECHO.	21
II.1.3.4. MIOCARDIOPATÍA NO COMPACTADA (DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO).....	24
II.1.3.5. MIOCARDIOPATÍA RESTRICATIVA.....	25
II.2. ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL CORAZÓN.....	27
II.2.1. CANALES IÓNICOS CARDIACOS.	27
II.2.2. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.....	31
II.2.3. ELECTROCARDIOGRAMA.....	35
II.2.4. TRASTORNOS ARRITMOGÉNICOS HEREDITARIOS ASOCIADOS.	36
II.2.4.1. SÍNDROME DE QT LARGO	39
II.2.4.2. SÍNDROME DE BRUGADA.....	43
II.2.4.3. TAQUICARDIA VENTRICULAR POLIMÓRFICA CATECOLAMINÉRGICA.	46
II.2.4.4. SÍNDROME DE QT CORTO.....	49
III. CORRELACIÓN GENOTIPO/FENOTIPO.....	52
III.1. DETERMINANTES GENÉTICOS DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES MENDELIANAS CON RIESGO DE MUERTE SÚBITA.	52
III.1.1. PENETRANCIA INCOMPLETA Y EXPRESIVIDAD VARIABLE.....	54
III.1.2. SOLAPAMIENTO DE FENOTIPOS.....	57
III.1.3. MODIFICADORES GENÉTICOS Y PLEIOTROPÍA.....	59
III.2. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN MUERTE SÚBITA CARDIACA Y MUERTE SÚBITA INFANTIL INESPERADA O INEXPLICADA.....	61
III.2.1. PAPEL EN LA ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO Y PREVENCIÓN DE LA MUERTE SÚBITA CARDIACA Y LA MUERTE SÚBITA INFANTIL.....	63

III.2.2. CONSEJO GENÉTICO.....	64
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	71
IV. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	73
IV.1. CASOS: CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	73
IV.2. ASPECTOS ÉTICOS.	74
IV.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.	75
V. ESTUDIOS GENÉTICOS: DETECCIÓN DE VARIANTES.	76
V.1. GENOTIPADO DE ALTO RENDIMIENTO: SEQUENOM MASSARRAY [®] SYSTEM.	76
V.1.1. SELECCIÓN DE VARIANTES.....	76
V.1.2. DISEÑO DE REACCIONES MULTIPLEX, GENOTIPADO Y ANÁLISIS DE DATOS.	77
V.2. SECUENCIACIÓN DIRECTA: MÉTODO DE SANGER.	79
V.3. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN: 5500XL SOLID [™] SYSTEM	80
V.3.1. GENERACIÓN DE LIBRERÍAS Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN.....	81
V.3.2. SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO.....	81
V.3.3. ANÁLISIS DE DATOS.	82
V.3.4. PANELES PERSONALIZADOS <i>VERSUS</i> EXOMA COMPLETO.	82
VI. ESTUDIO FUNCIONAL: CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES.	84
VI.1. CREACIÓN DEL MODELO CELULAR EXPERIMENTAL.	84
VI.1.1. LÍNEAS CELULARES.	84
VI.1.2. VECTORES PLASMÍDICOS DE TRANSFECCIÓN.....	85
VI.1.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	87
VI.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA: “ <i>TRAFFICKING DEFECTS</i> ”.....	88

VI.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS..... 89

VI.2.2. WESTERN BLOT 90

VI.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL CANAL DE POTASIO HERG. 90

VI.3.1. PROPIEDADES BIOFÍSICAS..... 90

VI.3.2. WHOLE-CELL PATCH-CLAMP..... 93

RESULTADOS 97

ARTÍCULO 1: PREVALENCE OF HCM AND LONG QT SYNDROME MUTATIONS IN YOUNG SUDDEN CARDIAC DEATH-RELATED CASES.....101

ARTÍCULO 2: SARCOMERIC GENE MUTATIONS IN SUDDEN INFANT DEATH SYNDROME (SIDS).....111

ANEXO AL ARTÍCULO 2: ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS EN GENES ASOCIADOS AL SÍNDROME DE QT LARGO EN UNA COHORTE DE SIDS.117

ARTÍCULO 3: BROAD-BASED MOLECULAR AUTOPSY: A POTENTIAL TOOL TO INVESTIGATE THE INVOLVEMENT OF SUBTLE CARDIAC CONDITIONS IN SUDDEN UNEXPECTED DEATH IN INFANCY AND EARLY CHILDHOOD.119

ARTÍCULO 4: PROSPECTIVE AND RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF BARTH SYNDROME AIDED BY NEXT-GENERATION SEQUENCING.149

ARTÍCULO 5: GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION OF THE EPISTATIC INTERACTIONS BETWEEN A NOVEL RARE VARIANT AND A COMMON POLYMORPHISM IN *KCNH2* LINKED TO SUDDEN UNEXPLAINED INFANT DEATH AND ATRIAL FIBRILLATION IN A FAMILY.....165

DISCUSIÓN 187

CONCLUSIONES 203

BIBLIOGRAFÍA 209



LISTADO DE FIGURAS



LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.	TASAS DE SIDS A NIVEL MUNDIAL	6
FIGURA 2.	MODELO DE TRIPLE RIESGO EN EL SÍNDROME DE MUERTE SÚBITA DEL LACTANTE (SIDS).....	8
FIGURA 3.	ESTRUCTURA DE LA SARCÓMERA.....	11
FIGURA 4.	MECANISMO DE EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO CARDIACO.....	13
FIGURA 5.	MIOCARDIOPATÍAS ESTRUCTURALES.....	26
FIGURA 6.	ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN DE LA CORRIENTE DE Na^+ DE ACUERDO CON LA CONFORMACIÓN DEL CANAL.....	31
FIGURA 7.	FISIOLOGÍA BÁSICA DE LA FUNCIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS DURANTE EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.....	33
FIGURA 8.	ELECTROCARDIOGRAMA NORMAL.....	35
FIGURA 9.	POTENCIALES DE ACCIÓN CARDIACOS Y ELECTROCARDIOGRAMA.....	36
FIGURA 10.	SÍNDROME DE QT LARGO.....	41
FIGURA 11.	SÍNDROME DE BRUGADA.....	43
FIGURA 12.	MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} EN LOS MIOCITOS.....	47
FIGURA 13.	SÍNDROME DE QT CORTO.....	50
FIGURA 14.	PATRONES DE HERENCIA DE LAS ENFERMEDADES MONOGÉNICAS.....	55
FIGURA 15.	PENETRANCIA INCOMPLETA Y EXPRESIVIDAD VARIABLE.....	56
FIGURA 16.	MODIFICADORES GENÉTICOS Y PLEIOTROPÍA.....	62
FIGURA 17.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN LA PLATAFORMA SEQUENOM MASSARRAY SYSTEM.....	79
FIGURA 18.	SISTEMA DE SECUENCIACIÓN DEL 5500 SERIES SOLiD™ SYSTEM.....	83

FIGURA 19. CREACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.	86
FIGURA 20. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA <i>IN VITRO</i>	88
FIGURA 21. CUANTIFICACIÓN PROTEICA CON ÁCIDO BICINCONÍNICO.	89
FIGURA 22. DEFECTOS DE TRAFFICKING DEL CANAL Kv11.1 A LA MEMBRANA.	91
FIGURA 23. TOPOLOGÍA DE LOS CANALES DE K ⁺ HERG (Kv11.1).	92
FIGURA 24. CINÉTICA DE LOS CANALES DE POTASIO HERG (K _v 11.1)	93
FIGURA 25. CONFIGURACIÓN DE WHOLE-CELL PATCH CLAMP.	95





LISTADO DE TABLAS



LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.	17
TABLA 2. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA.	20
TABLA 3. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DEL VENTRÍCULO DERECHO.	23
TABLA 4. POTENCIALES DE EQUILIBRIO IÓNICO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE MAMÍFEROS.	28
TABLA 5. CORRIENTES IÓNICAS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADAS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.	34
TABLA 6. CLASIFICACIÓN ELECTROCARDIOGRÁFICA DE TRES NIVELES.	40
TABLA 7. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DEL SÍNDROME DE QT LARGO.	42
TABLA 8. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DEL SÍNDROME DE BRUGADA.	45
TABLA 9. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA TAQUICARDIA VENTRICULAR POLIMÓRFICA CATECOLAMINÉRGICA.	48
TABLA 10. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DEL SÍNDROME DE QT CORTO.	51





ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

3-HPA:	ácido 3-hidroxipicolínico, 78	CEIC:	Comité Ético de Investigación Clínica, 74
5-HTT:	transportador de la serotonina, 10	CI:	cardiopatía isquémica, 3
ADN:	ácido desoxirribonucleico, 61	CIE:	Clasificación Internacional de Enfermedades, 4
ADNmt:	ADN mitocondrial, 54	CPVT:	taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, 38
ADP:	adenosín difosfato, 13	DCM:	miocardiopatía dilatada, 18
ARN:	ácido ribonucleico, 18	ddNTP:	didesoxinucleótido trifosfato, 80
ARNm:	ARN mensajero, 18	dNTP:	desoxirribonucleótido trifosfato, 78
ARNt-mt:	ARN mitocondrial de transferencia, 54	ECACC:	European Collection of Cell Cultures, 84
ARVC:	miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, 21	ECG:	electrocardiograma, 35
ATP:	adenosín trifosfato, 13	EDTA:	ácido etildiaminotetraacético, 62
AV:	nódulo auriculoventricular, 37	FFPE:	tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina, 192
bp:	par de bases, 77	FPGMX:	Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, 195
BrS:	síndrome de Brugada, 43	FV:	fibrilación ventricular, 43
BTHS:	síndrome de Barth, 197		
CEGEN:	Centro Nacional de Genotipado, 77		

<i>GFP</i> :	proteína verde fluorescente, 85	QTc:	intervalo QT corregido, 49
GWAS:	estudio de asociación de genoma completo, 60	RCM:	miocardiopatía restrictiva, 25
HCM:	miocardiopatía hipertrófica, 15	ROI:	regiones de interés, 84
HEK:	human embryonic kidney, 85	SA:	nódulo sinusal o sinoauricular, 32
HERG:	human Ether-à-go-go-Related Gene, 89	SADS:	sudden arrhythmic death syndrome, 4
indels:	inserciones/deleciones, 82	SIDS:	sudden infant death syndrome; síndrome de muerte súbita del lactante, 5
LQTS:	síndrome de QT largo, 39	SNA:	sistema nervioso autónomo, 37
LVNC:	miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo, 24	SNC:	sistema nervioso central, 9
MALDI-TOF:	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight, 77	SNP:	polimorfismo de nucleótido único, 77
MSC:	muerte súbita cardíaca, 3	SNV:	variante de nucleótido único, 40
NGS:	Next-generation sequencing; secuenciación de nueva generación, 80	SOLiD:	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection, 81
OMS:	Organización Mundial de la Salud, 4	SQTS:	síndrome de QT corto, 49
OXPPOS:	fosforilación oxidativa, 54	SUDI:	sudden unexpected/unexplained death in infancy; muerte súbita inesperada/inexplicada infantil, 5
PA:	potencial de acción cardíaco, 10	SUDDS:	sudden unexpected/unexplained syndrome; síndrome de muerte súbita inesperada/inexplicada, 4
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa, 77	SUNDS:	sudden unexpected nocturnal death syndrome; síndrome de muerte súbita nocturna inesperada, 4
P _i :	fósforo inorgánico, 13	TdP:	torsade de pointes, 38
PM:	potencial de membrana, 29	TV:	taquicardia ventricular, 38
PPP:	pospotenciales precoces, 37	WT:	wild type; fenotipo silvestre, 199
PPT:	pospotenciales tardíos, 37		



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

I. MUERTE SÚBITA CARDIACA.

I.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA.

Desde el punto de vista clínico, la muerte súbita cardiaca (MSC) se define como la muerte natural inesperada de origen cardiaco de un individuo aparentemente sano y sin diagnóstico previo de anomalías cardíacas (aunque éstas puedan estar presentes), que tiene lugar en el margen de una hora desde el inicio de los síntomas cuando la muerte es presenciada, y en las últimas 24 horas de haber sido visto con vida cuando la muerte no es presenciada por testigos^[1]. Existen, sin embargo, muchas definiciones que tienen en cuenta distintos criterios físicos, temporales, etc. La mayoría de las muertes que encajan en esta definición están causadas por arritmias cardíacas, incluyendo las debidas a infarto agudo de miocardio^[2]. La MSC extrahospitalaria es responsable de más del 60% de las muertes por enfermedad cardiovascular, lo que la convierte en la primera causa de muerte a nivel mundial^[3]. En adultos mayores la mayor parte de los casos es debida a cardiopatía isquémica (CI)^[4], mientras que en individuos jóvenes (normalmente definidos como <40 años^[5]), el origen de la MSC suele ser una condición cardíaca hereditaria o congénita que desencadena una arritmia ventricular letal^[6]. Aunque la MSC es una causa de muerte frecuente entre la población de edad avanzada, entre la población más joven es un evento poco común y alarmante, y su evaluación puede identificar la patología subyacente y así poder evitar posteriores eventos relacionados con MSC en los miembros de la familia^[7].

Uno de los aspectos más complicados en la evaluación de la epidemiología de la MSC es la metodología utilizada para la clasificación de los casos en los que no hay presencia de testigos ni vigilancia médica^[8, 9]; por este motivo y dependiendo del tipo de población que se estudie, la incidencia estimada varía enormemente en la literatura.

I.1.1. MUERTE SÚBITA CARDIACA EN ADULTOS.

La MSC es el resultado común de las CI, enfermedades cardiacas “adquiridas”; como la isquemia aguda del miocardio o la miocardiopatía dilatada isquémica, así como de otras miocardiopatías no isquémicas en las que la causa puede ser determinada más o menos fácilmente^[5]. La MSC inexplicada, sin embargo, es un diagnóstico patológico por exclusión que abarca varias etiologías. Uno de los términos más usados para estos casos es el de “síndrome de muerte súbita arrítmica” (SADS, por sus siglas en inglés: *sudden arrhythmic death syndrome*); también la variante de esta definición “síndrome de muerte súbita del adulto”^[10] para especificar los casos no pediátricos. Ambos describen aquellos casos de MSC con hallazgos negativos en autopsia completa y análisis toxicológicos, exclusión de etiologías no cardiacas y el corazón es de apariencia morfológica normal^[6, 10]. En el Sudeste de Asia, donde la MSC es especialmente prevalente, muchos casos de muerte súbita en varones jóvenes han sido atribuidos al “síndrome de muerte súbita inesperada o inexplicada” (SUDDS, por sus siglas en inglés: *sudden unexpected or unexplained death syndrome*) así como al “síndrome de muerte súbita nocturna (SUNDS, por sus siglas en inglés: *sudden unexpected nocturnal death syndrome*), aunque estas muertes han sido relacionadas directamente con el síndrome de Brugada como etiología y el término se ha acabado usando como sinónimo de éste con frecuencia^[11].

Los estudios epidemiológicos de MSC en adultos son difíciles de interpretar debido a que no existe una metodología fiable para reconocer y clasificar los eventos de MSC extrahospitalaria; además de que la mayor parte de las estimaciones realizadas son estudios retrospectivos basados en análisis de certificados de defunción^[5, 9]. La incidencia geográfica de MSC total varía, fundamentalmente, en función de la prevalencia de la CI en diferentes poblaciones^[12]. La estimación del número de defunciones por MSC en Estados Unidos oscila entre 200.000 y 450.000 casos anuales, dependiendo de los criterios de inclusión usados en estudios individuales, aunque la estimación más ampliamente aceptada es de unos 300.000 a 350.000 casos anuales^[9]. En Europa las estimaciones son similares a las de Estados Unidos en general, aunque con variaciones geográficas reportadas^[12]. Estos datos se traducen en una tasa de incidencia de aproximadamente 1 caso por 1.000 habitantes en la población general de adultos mayores de 35 años, tanto en Estados Unidos como en Europa^[9, 13]. Si las estimaciones se enfocan en subgrupos poblacionales concretos, esta tasa puede variar considerablemente llegando a incrementarse, por ejemplo, hasta los 8 casos por 1.000 habitantes en varones de entre 60 y 69 años con historia clínica anterior de enfermedad del corazón^[14].

La incidencia de MSC inexplicada también está muy desestimada con respecto a su frecuencia real debido a los códigos de la Clasificación Internacional de Enfermedades (códigos ICD o CIE, en español) de la Organización Mundial de la Salud (OMS)^[15] y depende, fundamentalmente, de la población estudiada y del criterio de los

investigadores que la estudian^[16]. Así, en Reino Unido por ejemplo, donde la autopsia es obligatoria en los casos de MSC inexplicada, la incidencia en la población general de edad comprendida entre los 4 y los 64 años es de 1,34/100.000 habitantes por año^[16]. Un estudio irlandés reciente reporta una incidencia de 0,76/100.000 habitantes por año en individuos de 14 a 35 años; lo que supone un 27% de las MSC totales en ese país^[17]. En Dinamarca, los datos se ven limitados por una tasa de autopsias realizadas del 75% pero indican una incidencia de, al menos, 0,8/100.000 habitantes por año en población de edad comprendida entre 1 y 35 años, y el 43% de los casos con autopsia permanecen inexplicados^[18]. No sólo parece que la incidencia es mayor en población joven, sino que además parece afectar más específicamente a varones jóvenes en periodos de descanso u horas de sueño^[16].

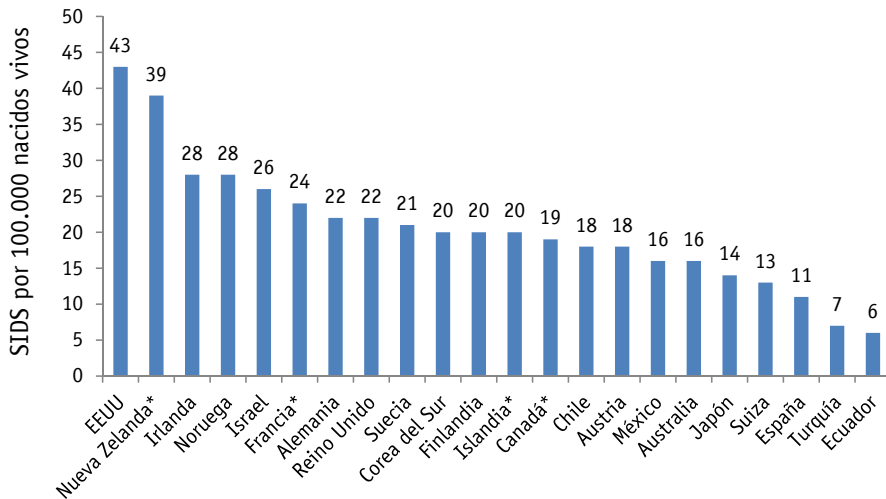
I.1.2. MUERTE SÚBITA INFANTIL INESPERADA O INEXPLICADA

La muerte súbita de un bebé un niño es un evento trágico con un profundo impacto en la familia y la comunidad, pero también en la profesión médica. La experiencia anecdótica sugiere que el trauma psicológico de perder a un hijo es a menudo peor cuando la causa del fallecimiento no puede ser determinada^[19]. Al igual que en adultos, en niños mayores de 1 año de edad se utiliza el término SUDS para referirse a los casos de muerte súbita inexplicada o inesperada, y SADS para el subgrupo de casos con evaluaciones patológica y toxicológica negativas^[5]. En caso de que las víctimas sean niños menores de un año, éstos se engloban en una categoría llamada “muerte súbita infantil inexplicada o inesperada” (SUDI, por sus siglas en inglés: *sudden unexplained or unexpected death in infancy*) pero existe una subcategoría en este grupo denominada “síndrome de muerte súbita del lactante” (SIDS, por sus siglas en inglés: *sudden infant death syndrome*) que cuenta con criterios más estrictos en las investigaciones forense y circunstancial y que, al igual que SADS, supone un diagnóstico patológico por exclusión^[5].

La tasa de mortalidad infantil (menores de un año de edad) refleja el efecto de las condiciones económicas y sociales en la salud de las madres y los recién nacidos, así como la efectividad de los Sistemas de Salud^[20]. En la mayoría de los países europeos, la tasa mortalidad infantil es baja y muestra pocas diferencias entre ellos; con una media de 4 muertes por 1.000 nacidos vivos, por debajo por ejemplo de los 6,15/1.000 de EEUU^[21]. Los países nórdicos (excepto Dinamarca), Luxemburgo, República Checa, Italia y Grecia tienen las tasas más bajas con 3/1.000 nacidos vivos, mientras que Bulgaria y Rumanía cuentan con la tasa más alta (8 y 9 por 1.000 nacidos vivos, respectivamente)^[20]. Dos terceras partes de estas muertes ocurren durante el periodo neonatal (esto es, en las cuatro primeras semanas de vida) y son debidas a defectos de nacimiento, prematuridad y otras condiciones que tienen lugar durante el embarazo. Sin

embargo, para las muertes que ocurren después del primer mes, el rango de causas tiende a ser más amplio y las causas más comunes pasan a ser SIDS, defectos de nacimiento, infecciones y accidentes^[20].

Figura 1. Tasas de SIDS a nivel mundial



Representación de las tasas de SIDS [código ICD-10 (R95)] por cada 100.000 nacidos vivos a nivel mundial. Los datos corresponden al año 2012 o, en su defecto, al último año publicado* (2009-2011) en las webs de los organismos oficiales de estadística de cada país (fecha de acceso, marzo de 2015).

En contraste con niños mayores de un año, los casos de SUDI y SIDS, en lactantes, representan el entre el 70% y el 80% de todas las muertes súbitas infantiles inesperadas. La OMS establece en su lista de códigos una categoría específica para SIDS (ICD-10, R95), por lo que, a priori, puede resultar más fácil hacer estimaciones epidemiológicas que para otras categorías. En España hubo 51 casos de SIDS en 2012 (32 varones y 19 mujeres) según datos del Instituto Nacional de Estadística^[22], lo que representa una incidencia de 0,11/1.000 nacidos vivos (11,2/100.000 habitantes), una tasa mucho más alta de la observada para MSC en adultos, a pesar, incluso, de las diferencias que existan en la metodología utilizada para su evaluación. En la

Figura 1 se ofrece una comparativa de las tasas de SIDS en varios países de Europa y otros continentes. En general, la tendencia es a la baja desde que a principios de los años noventa surgieron las campañas “*Back to sleep*” para concienciar a la gente de la necesidad

de cambiar ciertas prácticas como la colocación del bebé en la cuna en decúbito supino en vez de prono y otras costumbres, a menudo de gran influencia cultural, como la práctica de cama familiar o “colecho”^[23].

I.2. FISIOPATOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.

La fisiopatología de la MSC es compleja y se cree que pueda requerir de la interacción de un evento transitorio y un sustrato subyacente. Este proceso induce inestabilidad eléctrica y arritmias ventriculares letales seguidas por un colapso hemodinámico^[24].

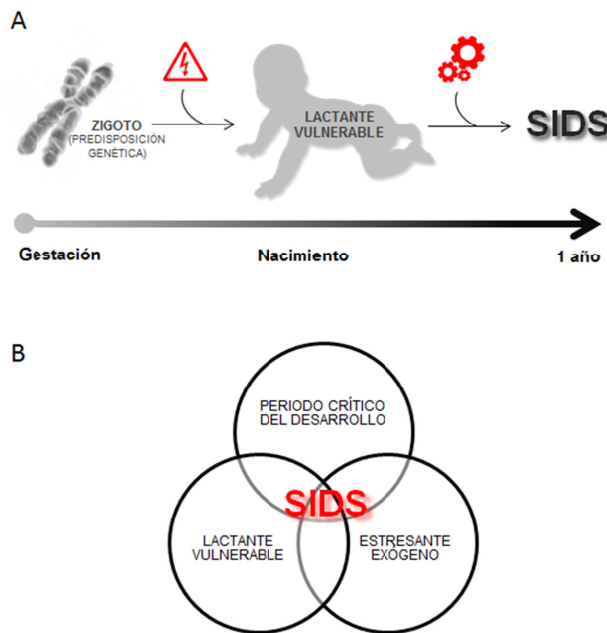
El sustrato más común asociado a la MSC en adultos en países industrializados es la CI, responsable del ≈ 75 -80% de éstas, y afecta principalmente a mayores de 45 años; mientras que en menores de 45 años es más frecuente la existencia de una enfermedad hereditaria^[24, 25]. Las cuatro categorías más comunes entre los jóvenes incluyen: aterosclerosis prematura, miocardiopatías estructurales (miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, etc), enfermedades eléctricas primarias o miocardiopatías arritmogénicas (síndromes de QT largo y QT corto, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica, etc) y aneurisma de la aorta torácica^[25].

En niños, las enfermedades cardíacas con resultado de MSC pueden dividirse a grandes rasgos en enfermedades estructurales (miocardiopatías y anomalías congénitas que suelen ser identificadas en la examinación *post-mortem*) y síndromes arrítmicos que no muestran signos evidentes en la autopsia^[19]. En muchos casos se determina un diagnóstico de SADS o SIDS, lo cual implica que los resultados de la autopsia y la evaluación toxicológica son negativos^[26]. La “autopsia molecular” o estudio genético de estos individuos ha revelado que una gran parte de estas MSC son debidas a síndromes arrítmicos hereditarios^[6]. Nuestro grupo, además, ha reportado la presencia de mutaciones asociadas a miocardiopatías estructurales en casos de SIDS y SADS y el papel de éstas en el desencadenamiento de la muerte súbita se discutirá en esta tesis^[27, 28].

Desde su propuesta en el año 1969, el término SIDS se ha utilizado para describir las muertes de lactantes y niños pequeños cuando las investigaciones posteriores no lograban demostrar una causa de muerte definitiva^[29]. Actualmente se acepta por consenso la definición de SIDS como “la muerte súbita inesperada de un lactante menor de un año de edad, en la que el comienzo del episodio letal ocurre aparentemente durante el sueño, y permanece inexplicada después de una exhaustiva investigación que incluye la realización de una autopsia completa, y la revisión de las circunstancias de la muerte y la historia clínica”^[29]. Además, cada caso debe ser clasificado en alguna de las categorías propuestas para SIDS en función del cumplimiento, o no, de un amplio número de estrictos criterios clínicos, forenses y circunstanciales^[29]. En la última década parece

haberse esclarecido que una de las causas de las altas tasas de SIDS antes de las campañas “*Back to sleep*” pueda haber sido la asfixia mecánica debida a la posición prona del bebé, el hecho de tener la cabeza cubierta por ropa de cama o dormir en superficies no diseñadas para niños; lo cual ha resultado en un alejamiento del diagnóstico de SIDS hacia el de sofocación indeterminada o el de asfixia^[30]. Sin embargo, sería simplista considerar estas muertes como accidentales solamente, ya que la mayoría de bebés que duermen en ambientes similares no mueren^[31].

Figura 2. Modelo de triple riesgo en el síndrome de muerte súbita del lactante (SIDS).



Representación de los modelos de triple riesgo según A) la visión de Courts y Madea (2010) en el que la predisposición genética de un zigoto y la existencia de riesgos durante el desarrollo embrionario de éste dan lugar a un lactante vulnerable. Si el lactante se encuentra con algún desencadenante ambiental durante un momento crítico de su desarrollo, podría convertirse en una víctima de SIDS. B) Visualización según Filiano y Kinney (1994) en la que la combinación de factores de riesgo intrínsecos (genética, riesgos durante el desarrollo) y factores de riesgo extrínsecos durante un periodo crítico del desarrollo podrían desencadenar un evento de SIDS.

Con este reconocimiento, la Hipótesis del Triple Riesgo que propusieron Filiano y Kinney en 1994^[32] y revisada posteriormente por Courts y Madea en 2010^[33] (Figura 2) ha sido validada progresivamente con la identificación de un creciente número de teorías

fisiopatológicas que afectan a diferentes vías metabólicas, principalmente defectos en la neuroregulación del control cardiorrespiratorio^[34]. Según el modelo de Filiano y Kinney, SIDS es el resultado de la ocurrencia de tres situaciones simultáneamente: un lactante con predisposición genética subyacente atraviesa un período crítico en su desarrollo en presencia de un estresante exógeno; tales como los que fueron objetivo de las campañas “*Back to sleep*”^[32, 35]. La revisión de Courts y Madea varía con respecto a la anterior en cuanto a que el triple riesgo no tiene por qué ocurrir simultáneamente, sino que un cigoto con alteraciones genéticas predisponentes que se ve afectado por factores de riesgo prenatales o neonatales (nacimiento prematuro, edad o hábitos de tabaquismo de la madre durante el embarazo, por ejemplo) genera un lactante vulnerable. Si este lactante se encuentra con un desencadenante exógeno antes de cumplir el primer año de vida, puede producirse un evento de SIDS^[33].

No obstante, la teoría de la concurrencia de riesgos extrínsecos e intrínsecos en el desencadenamiento de la muerte súbita en lactantes ya había sido formulada hace más de cuatro décadas por Froggatt *et al.*: “a lo largo de su vida, estos lactantes son, en esencia, individuos sanos; fallecen porque atraviesan una etapa de su desarrollo de vulnerabilidad fisiológica en el que la combinación crucial de determinados factores extrínsecos e intrínsecos se convierte en letal a través de (i) un mecanismo respiratorio, (ii) una arritmia cardíaca o (iii) una reacción hipersensible a antígenos (probablemente, de la proteína de la leche de vaca)”^[36]. La teoría del “triángulo letal” fue propuesta en 1993 por Rognum y Saugstad, y sería el resultado de la interacción de tres factores: (i) una fase vulnerable en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmunológico en los primeros meses de vida, (ii) factores de predisposición, tales como la propia constitución genética del individuo, o la astrogliosis del tronco encefálico, que es un aumento anormal en el número de astrocitos (células que, en condiciones normales, juegan un papel fundamental en el control de la homeostasis y regulación de la función sináptica, entre otras cosas) debida a la destrucción de neuronas cercanas a causa de traumatismo, infección, isquemia, accidente cerebrovascular, respuestas autoinmunes, o enfermedad neurodegenerativa del SNC^[37]; y (iii) un evento desencadenante como la sobreestimulación del sistema inmunológico^[38].

Como se adelantaba más arriba en este epígrafe, las teorías fisiopatológicas postuladas para SIDS se basan en la existencia de anomalías subyacentes en las redes neuronales del tronco encefálico que regulan las respuestas protectoras a la asfixia^[39]; sin embargo, estas teorías aún no han podido ser demostradas científicamente. Además, estudios recientes muestran que no parece haber diferencias significativas en el promedio de los parámetros neurobioquímicos investigados cuando se comparan casos de SIDS hallados en circunstancias consistentes con la ocurrencia de asfixia mecánica, y lactantes fallecidos por muerte súbita en aparente ausencia de circunstancias que puedan generarla^[40].

En lo que sí parece haber consenso es en que SIDS sólo ocurre en lactantes vulnerables con una anomalía intrínseca, y en este caso sí se han identificado numerosos factores genéticos que predisponen a dicha vulnerabilidad. Los más estudiados son las variantes genéticas en los genes de canales iónicos de sodio y potasio asociados a canalopatías, pero también hay documentadas variantes en genes relacionados con el transportador de la serotonina (5-HTT), con el desarrollo embrionario del sistema nervioso autónomo, con las rutas de producción de energía y con las rutas de regulación de la inflamación y la infección^[41]. En esta tesis se profundizará en el estudio de variantes en genes asociados con miocardiopatías estructurales, arritmogénicas y trastornos de la aorta.

II. ARQUITECTURA GENÉTICA DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA.

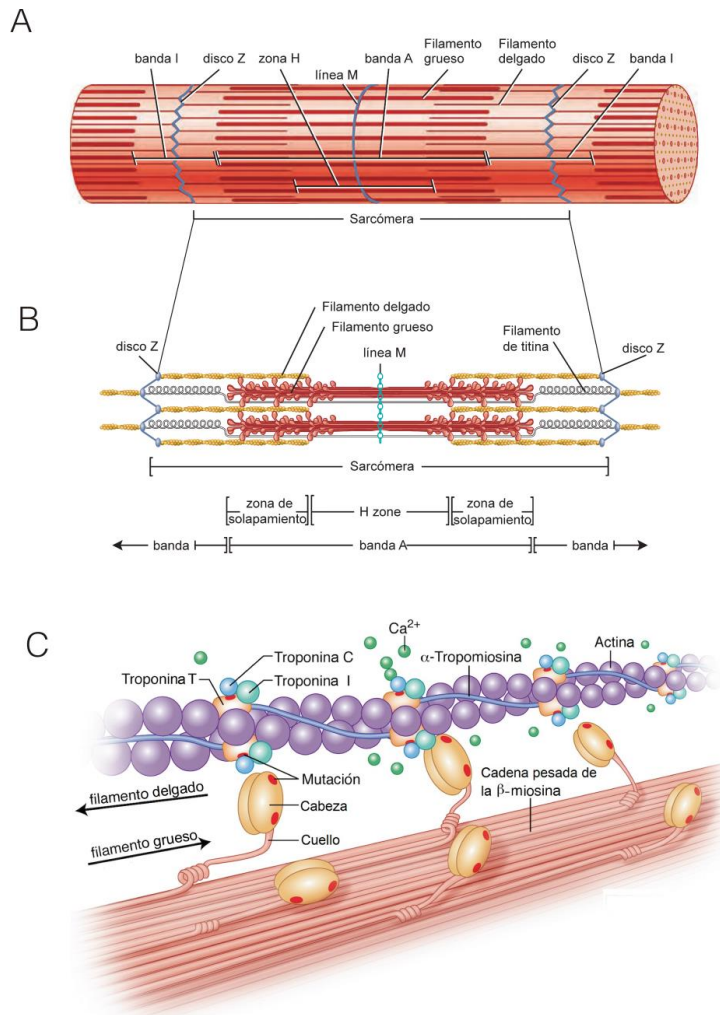
II.1. ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DEL CORAZÓN.

II.1.1. ESTRUCTURA DE LA SARCÓMERA.

El músculo cardíaco es un músculo estriado de contracción involuntaria compuesto por células tubulares uninucleadas llamadas miocardiocitos. Es un sincitio de células conectadas en serie entre sí por unas zonas de la membrana plasmática (o sarcolema) llamadas discos intercalados, que contienen un elenco de proteínas integradas en los distintos tipos de uniones: desmosomas, uniones adherentes y uniones *gap*^[42]. El sarcolema forma prolongaciones internas denominadas túbulos T que están abiertas a la matriz extracelular en sus extremos y forman un entramado con el retículo sarcoplásmico del miocardiocito envolviendo a todas las miofibrillas que hay en su interior. Esta configuración es la que permitirá que el potencial de acción cardíaco (PA) se difunda sin dificultad a través de la célula y también de una célula a otra^[43].

En el interior del miocardiocito, se encuentran grupos paralelos de miofibrillas organizadas longitudinalmente a la célula, y subdivididas transversalmente en unidades contráctiles llamadas sarcómeras^[44] (Figura 3). La sarcómera es una estructura citoesquelética especializada que constituye la unidad motora fundamental del miocardiocito y está compuesta, a su vez, por miofilamentos gruesos y finos. El filamento grueso está formado por unas 300 moléculas de miosina, cada una formada por dos cadenas pesadas de α - o β -miosina y cuatro cadenas ligeras de miosina: dos esenciales y dos reguladoras^[45]. El filamento fino está compuesto por moléculas de actina repetidas, íntimamente asociadas con el complejo regulador de la troponina (troponinas T, I y C), el cual ejerce su función en coordinación con la α -tropomiosina^[46].

Figura 3. Estructura de la sarcómera.



Representación de la sarcómera. A) Conjunto de miofibrillas organizadas en el que se observan las subdivisiones transversales que forman las unidades contráctiles o sarcómeras. B) Representación ampliada de la estructura de la sarcómera que permite ver la composición de los miofilamentos proteicos y su relación entre sí formando las distintas bandas y zonas características de la sarcómera. C) Detalle de la sarcómera que muestra las principales proteínas de los miofilamentos de la sarcómera. Los puntos rojos representan una mutación dada y cómo ésta podría afectar a la interacción de la β -miosina, en este caso, con otras proteínas. Fuente: A y B, adaptaciones de Tortora & Derrickson 2012 (Wiley)^[47]; C, adaptación de <https://hypertrophiccardiomyopathy.com/>.

La proteína C de unión a la miosina cardiaca también contribuye a la regulación de la interacción actina-miosina y a la cinética de los puentes cruzados, que son los generadores de la contracción. La organización normal de los miofilamentos permite delinear una serie de zonas topográficas en la sarcómera: la línea M (del alemán *Mittelscheibe*; “disco central”), bandas I (de *isótropas* para la luz polarizada), que son bandas claras formadas sólo por filamentos finos; bandas A (de *anisótropas* para la luz polarizada), que son bandas oscuras formadas sólo por filamentos gruesos e incluyen una región central denominada zona H (del alemán *heller*; “brillante”) que sólo contiene colas de miosina y, finalmente, los discos Z (del alemán *Zwischenscheibe*; “disco intermedio” en la banda I) a los cuales se unen transversalmente los filamentos finos y que están formados por un entramado de α -actinina, filamina, nebulette, teletonina y miotilina que constituye el límite lateral de la sarcómera^[42, 43, 45].

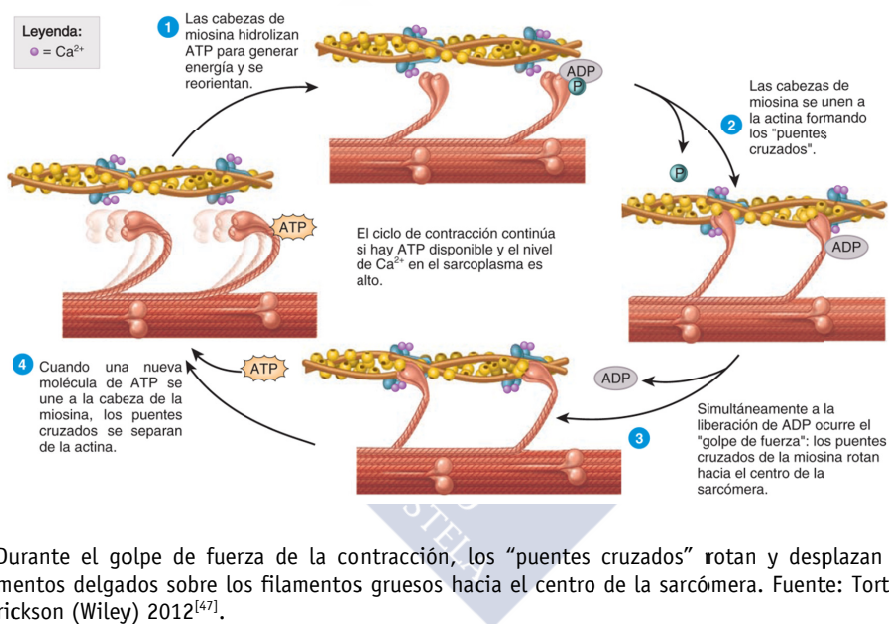
II.1.2. MECANISMO DE EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO:

La longitud en reposo de una sarcómera es de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ ^[43]. En esta situación, los filamentos finos y gruesos están completamente superpuestos y la sarcómera es capaz de generar su máxima fuerza de contracción. La teoría del deslizamiento de filamentos es el principio fundamental que gobierna la contracción del músculo y se basa en que el deslizamiento de la actina sobre la miosina genera tensión muscular. Esta interacción entre la actina y la miosina en la que (1) la cabeza de la miosina se pliega y une a la actina; (2) se contrae; (3) libera a la actina y, (4) comienza un nuevo ciclo, se conoce como el ciclo de la actina-miosina. Los enlaces que se establecen entre la actina y la miosina se conocen como ‘puentes cruzados’, y la contracción de la cabeza de la miosina que requiere energía proveniente de la hidrólisis de ATP, se conoce como ‘golpe de fuerza’^[48]. El término acoplamiento de la excitación y la contracción es el conjunto de procesos biológicos que suceden en cascada comenzando con el PA y terminando con la contracción de las miofibrillas^[43].

Al igual que en el músculo esquelético, cuando un PA atraviesa el sarcolema de un miocardiocito, éste se disemina también al interior de la célula a través de los canales de calcio dependientes de voltaje de los túbulos T. Esto provoca la liberación instantánea de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico hacia el sarcoplasma a través de los receptores de rianodina (este mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio se explica más detalladamente en el epígrafe II.2.4.3 sobre *Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica*). De forma inmediata, estos iones se difunden en las miofibrillas; se unen a la troponina C, induciendo un cambio conformacional alostérico en las troponinas I y T que es transmitido a la α -tropomiosina; lo cual genera una transición de estado “bloqueado” a estado “cerrado”, que deja al descubierto los puntos de unión de la actina a la miosina para que ocurran los puentes cruzados (estado “abierto”)^[46]. Es

entonces cuando la cabeza de la miosina, con ADP y fósforo inorgánico (P_i) adheridos, interactúa con los sitios de unión a la actina. Este paso libera el $ADP + P_i$, lo cual ocurre simultáneamente al golpe de fuerza, resultando en una rotación de la cabeza de miosina que desliza el filamento delgado sobre el grueso, un acortamiento de la sarcómera y la banda I, y su aproximación a los discos Z; es decir, ocurre el fenómeno de contracción muscular^[48]. A continuación, se une ATP a la cabeza de la miosina, la cual se separa de la actina. Al comenzar un nuevo ciclo, la actividad ATPasa de la cabeza de miosina hidrolizará de nuevo ese ATP a $ADP + P_i$ ^[48] (Figura 4).

Figura 4. Mecanismo de Excitación-Contracción del músculo cardíaco.



Durante el golpe de fuerza de la contracción, los "puentes cruzados" rotan y desplazan a los filamentos delgados sobre los filamentos gruesos hacia el centro de la sarcómera. Fuente: Tortora & Derrickson (Wiley) 2012^[47].

II.1.3. TRASTORNOS ESTRUCTURALES HEREDITARIOS ASOCIADOS.

El concepto de enfermedad del músculo cardíaco ha sufrido grandes cambios a lo largo de la historia. Por ejemplo, hacia 1850 la única causa reconocida de enfermedad del músculo cardíaco era la miocarditis crónica^[49], y no fue hasta un siglo más tarde, en 1957, cuando se usó por primera vez el término "miocardiopatía" con alusión a una enfermedad primaria del miocardio^[50]. En los siguientes treinta años, la OMS modificó varias veces la definición de miocardiopatía, que a menudo venían acompañadas de la coletilla "de causa o etiología desconocida", debido a la ausencia de información

disponible sobre los mecanismos básicos que originan estas enfermedades^[51]. En la actualidad, existe un notable consenso en la definición de miocardiopatía por parte de los dos grandes grupos internacionales de expertos en cardiología: la *American Heart Association* y la *European Society of Cardiology*; aunque no así en cuanto a su clasificación.

Las miocardiopatías, por tanto, se definen como un grupo complejo y heterogéneo de trastornos del miocardio asociados a una disfunción mecánica y/o funcional del corazón que son debidas a una variedad de causas, frecuentemente de origen genético que a menudo conllevan un aumento del riesgo de muerte súbita cardiaca o un desgaste progresivo del corazón que desemboca en fallo cardiaco^[51, 52]. La clasificación de las miocardiopatías difiere entre ambas instituciones. La escuela americana establece un punto de corte inicial diferenciando entre las miocardiopatías ‘primarias’, que afectan exclusiva o predominantemente al corazón; y las ‘secundarias’, aquellas en las que la disfunción del miocardio forma parte de un trastorno sistémico. Después, subclasifican las miocardiopatías primarias en cuanto a su etiología genética o no genética. Las de origen genético engloban a un conjunto heterogéneo de enfermedades estructurales, arritmogénicas, mitocondriales y otras miopatías; mientras que las adquiridas son consecuencia de la respuesta del organismo a infecciones (miocarditis) o a situaciones de estrés (miocardiopatías *Tako-Tsubo* o *peripartum*). Las miocardiopatías secundarias forman parte de condiciones sistémicas como procesos inflamatorios crónicos, neuromusculares, cardioraciales, endocrinos, exposición a tóxicos, etc..^[51] Por su parte, la escuela europea propone una clasificación diferente, en la que las miocardiopatías se engloban inicialmente en grupos en función de los fenotipos morfológicos y funcionales que presentan; y después subclasifican cada fenotipo en formas familiares (genéticas) o formas no familiares (adquiridas)^[52]. La escuela europea no incluye las miocardiopatías arritmogénicas (también llamadas ‘canalopatías’) en su clasificación. Se ha estimado que la incidencia de las miocardiopatías pediátricas es aproximadamente de 1,13 - 1,24 casos por cada 100.000 niños^[53, 54] y parece existir un pico significativamente más alto durante el primer año de vida que en edades mayores, del orden de 8,34 frente a 0,7 casos en menores de un año respecto a niños entre 1 y 18 años de edad^[54]. Las formas más comunes de miocardiopatía pediátrica son las mismas que en adulto, aunque; siendo la más frecuente la miocardiopatía dilatada, mientras que la miocardiopatía hipertrófica parece desarrollarse con más frecuencia a partir de la primera década de vida^[53].

Cientos de mutaciones en un amplio número de proteínas contráctiles y del citoesqueleto de la sarcómera han sido asociadas con alguna miocardiopatía estructural. Actualmente se consideran dos mecanismos patogénicos básicos asociados con mutaciones en las proteínas de la sarcómera. El primero es debido a mutaciones *missense* (un solo cambio nucleotídico conlleva a un cambio de aminoácido en la proteína) que conducen al llamado ‘efecto negativo dominante’ del *poison peptide*, es decir, que la proteína mutada no sólo no es destruida en la célula sino que es estable y se integra en la

sarcómera, afectando a su función mecánica normal y a las propiedades electrofisiológicas de los miocardiocitos^[55]. El segundo es debido a mutaciones *nonsense* (un cambio nucleotídico conlleva a un codón de parada prematuro) y mutaciones *frameshift* (inserciones o deleciones de nucleótidos que introducen un codón de parada prematuro) y pueden conducir a un efecto de ‘haploinsuficiencia’, ya que un alelo genera proteínas truncadas que pueden o no interferir con las funciones mecánicas y electrofisiológicas de los miocardiocitos y el otro alelo no es capaz de generar suficientes copias normales para producir el fenotipo silvestre^[56].

A día de hoy existe una vasta cantidad de literatura dedicada a las miocardiopatías en adultos, pero no toda la información es igual de relevante en niños diagnosticados con estas enfermedades y la investigación enfocada a la miocardiopatía pediátrica ha sido más bien escasa a lo largo de los años; de modo que es necesario continuar investigando para comprender mejor la gran heterogeneidad de las causas subyacentes de las miocardiopatías pediátricas^[57]. En los siguientes epígrafes se hablará de forma individual de las principales miocardiopatías estructurales de origen genético que afectan a adultos y niños (Figura 5), sin atender a ningún criterio de clasificación concreto de los expuestos anteriormente; haciendo especial alusión a los mecanismos genéticos y moleculares que las originan y los genes y proteínas implicados en cada una de ellas.

II.1.3.1. MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA.

La miocardiopatía hipertrófica (HCM, por sus siglas en inglés: *hypertrophic cardiomyopathy*) se define por la presencia de un aumento del grosor de la pared del ventrículo izquierdo que no puede ser explicada únicamente por causas anormales de carga; aplicándose esta definición tanto a adultos como a niños, sin asumir *a priori* ninguna etiología o patología del miocardio en concreto^[58]. A nivel histológico se observan hipertrofia y desorganización de los miocardiocitos, y aumento de la fibrosis del miocardio^[59]; lesiones que a menudo provocan disfunción diastólica^[60] lo cual la convierte en una causa importante de muerte súbita cardíaca^[61]. Es una enfermedad generalmente de herencia autosómica dominante, aunque existen patrones de herencia ligada al cromosoma X, herencia autosómica recesiva y herencia mitocondrial^[58]. Su prevalencia era hasta ahora de 1 en 500 individuos en la población general^[62], aunque recientemente se ha reevaluado esta estimación, que parece ser ya de hasta 1 en 250 individuos^[63]; pero se desconoce cuál es su valor en registros pediátricos, aunque algunos estudios poblacionales estiman una incidencia anual de 0,3 – 0,5 por cada 100.000 niños^[53, 54]. Clínicamente, esta enfermedad está caracterizada por presentar penetrancia incompleta y expresividad variable, con un amplio espectro de fenotipos que varían desde individuos completamente asintomáticos toda la vida hasta pacientes que mueren súbita y prematuramente por una arritmia ventricular que a menudo va asociada a un

claro fenotipo de HCM^[64]. Los estudios contemporáneos sugieren que el riesgo global de MSC en pacientes con HCM es bastante bajo: $\leq 1\%$ en la mayoría de los pacientes en general^[65], aunque parece ser mucho mayor en niños y adolescentes^[66].

La HCM se ha descrito con frecuencia como una enfermedad de la sarcómera desde que en 1990 se describió la primera mutación asociada en el gen *MYH7* que codifica la cadena pesada de la β -miosina^[67], seguida por la troponina T, *TNNT2* y la α -tropomiosina, *TPM1*, en 1994^[68], habiéndose detectado hasta la fecha, mutaciones en prácticamente todas las proteínas contráctiles de esta estructura^[69] (Tabla 1). No obstante, la gran mayoría de pacientes (hasta el 70%) con genotipo positivo es portadora de mutaciones en los genes *MYH7* y *MYBPC3*^[70]. En un estudio de 2008, en una cohorte de 84 niños sin anomalías extracardiacas se identificó la presencia de mutaciones sarcoméricas en el 55% de los sujetos^[71]. La prevalencia de estas mutaciones en lactantes es aún desconocida^[57] y su estimación es uno de los objetivos de esta tesis. De manera colectiva, se ha detectado la presencia de mutaciones sarcoméricas hasta en un 60% de pacientes con HCM con historia familiar de la enfermedad y en hasta un 40% de los casos esporádicos^[72]. Además de las proteínas contráctiles, el espectro de genes asociados a HCM se ha extendido también a aquellos que codifican proteínas del citoesqueleto de la sarcómera, incluyendo el disco Z, retículo sarcoplásmico y sarcolema, aunque son mucho menos frecuentes^[64]. Además, entre el 5-10% de los casos en adultos están causados por otros trastornos genéticos, tales como enfermedades metabólicas o neuromusculares hereditarias, anomalías cromosómicas o síndromes genéticos^[73, 74], mientras que en niños la cifra puede aumentar hasta el 30%^[54, 74], lo que en ambos casos hace aumentar enormemente el elenco de genes implicados.

A pesar de las más de 1.400 mutaciones descritas en los últimos 25 años^[75], poco se conoce de los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el fenotipo de HCM. Esto se debe, en parte, a la heterogeneidad clínica de la HCM, y a la variación en la correlación genotipo-fenotipo en los pacientes; la cual se tratará más adelante. Por ejemplo, se ha observado que la mayoría de las mutaciones en *MYH7* son de tipo *missense*, que producen un efecto dominante negativo de la proteína mutada y están asociadas a la aparición temprana de la enfermedad^[72]. Estas proteínas mutadas llamadas “*poison peptides*” pueden incorporarse a la sarcómera y provocar cambios en los principales mecanismos fisiopatológicos establecidos en HCM; esto es: alterar la contracción coordinada de los miofilamentos, aumentar la actividad ATPasa de la miosina y la generación de fuerza de contracción mediante el aumento de la sensibilidad y la afinidad por el Ca^{2+} , o promover la expresión de TGF- β que estimula la proliferación de células no miocíticas que aumentan el estrés de los miocardiocitos mutados^[76]. Por otra parte, en *MYBPC3* son más prevalentes las mutaciones de truncado que generan un efecto de haploinsuficiencia, y están asociadas con una aparición tardía de la enfermedad^[71].

Tabla 1. Bases genéticas y moleculares de la miocardiopatía hipertrófica.

Gen	Locus	Proteína
Proteínas de la sarcómera		
<i>ACTC1</i>	15q14	α -actina cardíaca
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	Proteína C de unión a la miosina cardíaca
<i>MYH6</i>	14q11.2-q12	Cadena pesada de la α -miosina
<i>MYH7</i>	14q11.2-q12	Cadena pesada de la β -miosina
<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	Cadena ligera reguladora de la miosina
<i>MYL3</i>	3p21.2-p21.3	Cadena ligera esencial de la miosina
<i>TNNC1</i>	3p21.1	Troponina C cardíaca
<i>TNNI3</i>	19p13.4	Troponina I cardíaca
<i>TNNT2</i>	1q32	Troponina T cardíaca
<i>TPM1</i>	15q22.1	α -tropomiosina
<i>TTN</i>	2q31	Titina
Proteínas del disco Z		
<i>ACTN2</i>	1q42-q43	α -actinina 2
<i>CSRP3</i>	11p15.1	Proteína LIM muscular
<i>LBD3</i>	10q22.2-q23.3	Dominio 3 de unión a proteína LIM
<i>FLNC</i>	7q32-q35	Filamina C
<i>MYOZ2</i>	4q26-q27	Miocenina 2
<i>TCAP</i>	17q12-q21.1	Teletonina
<i>VCL</i>	10q22.1-q23	Vinculina/metavinculina
Transportadores de calcio		
<i>JPH2</i>	20q12	Junctofilina 2
<i>PLN</i>	6q22.1	Fosfolambán
Otros genes (HCM metabólica)		
<i>FXN</i>	9q13	Frataxina
<i>GLA</i>	Xq22	α -galactosidasa A
<i>LAMP2</i>	Xq24	Proteína 2 de membrana asociada a lisosomas
<i>PRKAG2</i>	7q35-q36.36	Proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK)
<i>RAF1</i>	3p25.2	RAF serín/treonín quinasa

Principales genes y sus proteínas asociados a miocardiopatía hipertrófica familiar en cualquiera de sus formas.

Esto podría llegar a explicarse por la progresiva ineficiencia, con la edad, del sistema de degradación de proteínas y ARN mensajero (ARNm), denominado sistema proteasoma-ubiquitina, que provocaría la acumulación de péptidos anormales en pacientes de mayor edad^[77]. Sin embargo, también se ha identificado un número importante de mutaciones *missense* en *MYBPC3* en pacientes pediátricos, lo cual contrasta con la alta prevalencia de variantes de truncado identificadas en la población adulta con HCM, y sugiere que las variantes *missense* podrían tener consecuencias más severas^[71]. La continua progresión en el hallazgo de nuevos genes y el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos, es crucial para desarrollar terapias contra la HCM. Los estudios más recientes sugieren que las mutaciones en los genes de la sarcómera no sólo alteran el coste energético de la contracción cardíaca, sino que la severidad de dichas alteraciones es específica de cada gen (en lo que concierne a *MYH7* y *MYBPC3*, al menos); lo cual podría explicar las diferencias en la edad de aparición de la enfermedad. Además, han demostrado que el grado de alteración producido por cada mutación es similar entre pacientes sintomáticos y pacientes asintomáticos, sugiriendo que las mutaciones sarcoméricas, de por sí, pueden producir fenotipos de enfermedad a nivel molecular y que el comienzo temprano de un tratamiento metabólico podría ser beneficioso para los portadores de estas mutaciones; en concreto en aquellos genes relacionados con una aparición temprana de la enfermedad^[78]. Por otra parte, la mejora de las técnicas de diagnóstico molecular facilita el hallazgo de nuevos genes relacionados con HCM. El último ha sido el gen de la filamina C (*FLNC*), una proteína del disco Z de la sarcómera que interactúa con otras proteínas sarcoméricas, incluyendo la miozenina-2 y la miotilina, que ya había sido asociado previamente a miopatía miofibrilar^[79]. En este estudio, los portadores de las mutaciones no presentaban síntomas de miopatía, pero sí anomalías sarcoméricas, incluyendo desorganización miofibrilar, agregados sarcoméricos y fibrosis^[79].

II.1.3.2. MIOCARDIOPATÍA DILATADA.

La miocardiopatía dilatada (DCM, por sus siglas en inglés: *dilated cardiomyopathy*) es una enfermedad del músculo cardíaco caracterizada por dilatación ventricular progresiva y función sistólica disminuida^[51]. La DCM puede ser secundaria a patologías subyacentes (incluyendo disfunción valvular, hipertensión o miocarditis) o puede ser un trastorno primario del músculo cardíaco, también denominado idiopático, que implica como única causa posible de la enfermedad, la genética^[80]. El establecimiento de la categoría “idiopática” en el diagnóstico de DCM ha sido el punto de inicio de los estudios en familias, los cuales han puesto en evidencia mediante la evaluación clínica en familiares de primer grado de los pacientes, que entre un 20-35% de casos de DCM idiopática son, he hecho, formas hereditarias de la enfermedad^[80]. Ante la confusión que genera la literatura en cuanto a la nomenclatura aplicada a la clasificación de la DCM, en la que

los términos idiopática, primaria, familiar y genética pueden llegar a usarse indistintamente, se ha llegado al consenso de considerar la DCM familiar como de origen genético en base a la aparente heredabilidad que pueda observarse en una genealogía; pero dicha categorización no puede hacerse de por sí basándose en datos de genética molecular, sino en base a la asignación de fenotipos en el estudio de las familias^[81].

El principal modo de herencia de la DCM familiar en adultos es el autosómico dominante, con penetrancia reducida y expresividad variable^[82, 83], y explica del 30 al 50% de los casos^[84]. Los genes implicados en esta forma de DCM codifican fundamentalmente proteínas de la sarcómera o de los discos Z, que juegan un papel fisiológico importante en la sensibilidad mecánica de la sarcómera; y en menor proporción también proteínas de la envoltura nuclear y algunos canales iónicos, entre otros^[80] (Tabla 2). Existe un solapamiento de genes entre DCM y otras miocardiopatías, especialmente HCM, hasta el punto de que no sólo mutaciones en el mismo gen pueden producir fenotipos distintos, sino que a veces una misma mutación puede manifestarse como HCM en un individuo y como DCM en otro^[80, 85]. La mayoría de las mutaciones asociadas a DCM son *missense*, excepto aquellas encontradas en el gen de la titina (*TTN*)^[86, 87]. Recientemente se ha descrito que un amplio número de variantes de truncado en *TTN* son una de las principales causas de DCM, aunque no todas se consideran patogénicas^[87, 88].

Existen, no obstante, otros modos de herencia como la herencia por línea materna de mutaciones mitocondriales y la herencia autosómica recesiva, aunque es mucho menos frecuente^[82, 83]. La DCM de herencia ligada al cromosoma X está causada en la mayoría de los casos por mutaciones en el gen de la distrofina (*DMD*), asociado a un fenotipo más complejo que va acompañado también de miopatía del músculo esquelético de severidad variable (enfermedades de Duchenne y Becker, respectivamente) o una forma de DCM aislada ligada al X^[89]. Otra forma menos común de herencia ligada al X es el síndrome de Barth, causado por mutaciones en el gen de la tafazzina (*TAZ*)^[90]. La tafazzina es una proteína clave en la síntesis de la cardiolipina, un fosfolípido de la membrana mitocondrial interna, la cual es defectuosa cuando el gen está mutado. Esta condición se diagnostica típicamente en neonatos varones que presentan un fenotipo variable entre HCM, DCM o miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (LVNC)^[60, 90]. Aunque muchos niños no sobreviven al periodo de lactancia debido a la progresiva insuficiencia cardíaca, sepsis o MSC; algunos pueden llegar a la niñez con una vigilancia intensiva de la función cardíaca y una terapia médica y quirúrgica adecuada, que puede llegar a incluir el trasplante de corazón^[91]. La DCM idiopática, de manera global, es la primera causa de trasplante de corazón en niños^[51].

La incidencia de DCM es incierta. Debido a la diversidad en los patrones de herencia, la edad de aparición de la enfermedad, la penetrancia incompleta, y la ausencia de síntomas en muchos casos^[92] (a lo que debe sumarse que la estrategia de diagnóstico y

seguimiento de individuos afectados y familiares ha cambiado con el tiempo), se cree que la cifra de prevalencia estimada hasta ahora de 1 en 2.500 individuos en la población general (con una incidencia anual de 7 casos por cada 100.000 individuos^[93]), podría estar enormemente subestimada y, con los modelos de diagnóstico actuales, se cree que la prevalencia pueda ser en realidad de hasta 1 en 250 individuos^[83, 86] a falta de un estudio epidemiológico poblacional riguroso. La prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad, por lo que en niños es muy poco frecuente; aproximadamente 1-2:100.000^[94].

Tabla 2. Bases genéticas y moleculares de la miocardiopatía dilatada.

Gen	Locus	Proteína
<i>ABCC9</i>	12p12.1	Proteína 9, subfamilia C de transportadores ABC (SUR2)
<i>ACTC1</i>	15q14	α -actina cardiaca
<i>ACTN2</i>	1q42-q43	α -actinina 2
<i>ANKRD1</i>	10q23.31	Dominio 1 de repetición de ankirina
<i>BAG3</i>	10q25.2-q26.2	Atanogén 3 asociado a BCL2
<i>CSRP3</i>	11p15.1	Proteína dominio LIM 3 rico en glicina y cisteína
<i>CTF1</i>	16p11.2	Cardiotrofina 1
<i>DES</i>	2q35	Desmina
<i>DMD</i>	Xp21	Distrofina
<i>DSC2</i>	18q12.1	Desmocolina 2
<i>DSP</i>	6p24	Desmoplaquina
<i>EMD</i>	Xq28	Emerina
<i>EYA4</i>	6q23	Fosfatasa y coactivador transcripcional 4 de EYA
<i>FHL2</i>	2q12.2	<i>Four-and-a-half LIM domains 2</i>
<i>FKTN</i>	9q31.2	Fukutina
<i>LAMA4</i>	6q21	Laminina α 4
<i>LAMP2</i>	Xq24	Proteína de membrana 2 asociada a lisosoma
<i>LDB3</i>	10q22.3-q23.2	Proteína 3 de unión a dominio LIM
<i>LMNA</i>	1q22	Lamina A/C
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	Proteína C de unión a la miosina cardiaca
<i>MYH6</i>	14q11.2-q12	Cadena pesada de la α -miosina
<i>MYH7</i>	14q11.2-q12	Cadena pesada de la β -miosina
<i>NEBL</i>	10p12	<i>Nebulette</i>

Gen	Locus	Proteína
<i>NEXN</i>	1p31.1	Nexilina
<i>PLN</i>	6q22.1	Fosfolambán
<i>PSEN1</i>	14q24.3	Presenilina 1
<i>PSEN2</i>	14q24.3	Presenilina 2
<i>RBM20</i>	10q25.2	Proteína de repetición 20 de unión a ARN
<i>SCN5A</i>	3p21	Nav1.5
<i>SDHA</i>	5p15	Subunidad A del complejo succinato-deshidrogenasa
<i>SGCD</i>	5q33-q34	Sarcoglicano δ
<i>SYNE1</i>	6q25	Nesprina 1
<i>SYNE2</i>	14q23.2	Nesprina 2
<i>TAZ</i>	Xq28	Tafazzina
<i>TCAP</i>	17q12	Teletonina
<i>TMPO</i>	12q22	Timopoyetina
<i>TNNC1</i>	3p21.1	Troponina C cardíaca
<i>TNNI3</i>	19p13.4	Troponina I cardíaca
<i>TNNT2</i>	1q32	Troponina T cardíaca
<i>TPM1</i>	15q22.1	α -tropomiosina
<i>TTN</i>	2q31	Titina
<i>VCL</i>	10q22.2	Vinculina

Listado de los genes mayoritarios y algunos minoritarios asociados a las formas genéticas de miocardiopatía dilatada.

II.1.3.3. MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DEL VENTRÍCULO DERECHO.

La miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC, por sus siglas en inglés: *arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*) es una enfermedad del músculo cardíaco caracterizada, desde el punto de vista patológico, por el reemplazamiento del miocardio del ventrículo derecho por tejido fibroadiposo y, desde el punto de vista clínico, por la inestabilidad eléctrica del ventrículo derecho que puede conducir a taquicardia o fibrilación ventricular y precipitar MSC^[95]. Los síntomas de la enfermedad varían desde palpitaciones, hasta síncope o MSC; siendo responsable de un 20% de éstas; afectando principalmente a atletas y adultos jóvenes^[95]. Aunque la afectación del ventrículo izquierdo se ha considerado como la expresión de una fase avanzada de

ARVC, actualmente se acepta el hecho de que este fenotipo pueda ocurrir desde fases iniciales de la enfermedad^[95, 96]. Inicialmente se consideraba que esta enfermedad era debida a un defecto del desarrollo del miocardio del ventrículo derecho y por ello se la denominó “displasia”; pero el concepto ha evolucionado en las últimas tres décadas hasta la perspectiva actual de miocardiopatía genética^[51, 52].

La incidencia de ARVC está estimada en 1 de cada 5.000 individuos^[51, 52]. Aproximadamente entre un 30%-50% de los casos de ARVC se presentan como formas familiares, con un patrón de herencia autosómica dominante causado por mutaciones en los genes que codifican las proteínas de los desmosomas: desmoplaquina (*DSP*)^[97], placofilina-2 (*PKP2*)^[98], desmogleína-2 (*DSG2*)^[99], desmocolina-2 (*DSC2*)^[100]. Otras formas de herencia autosómica dominante han sido asociadas a genes extradesmosomales, tales como el del receptor de la rianodina (*RYR2*)^[101], que participa en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺, el del factor de crecimiento transformante β3 (*TGFB3*)^[102], que regula la producción de componentes de la matriz extracelular y modula la expresión de los genes que codifican las proteínas de los desmosomas y el de la proteína transmembrana-43 (*TMEM43*)^[103], cuyas mutaciones alteran la regulación de la ruta adipogénica controlada por el gen *PPARA*, lo que explicaría el reemplazamiento del miocardio por tejido adiposo en pacientes de ARVC. Sin embargo, también es posible encontrar patrones de herencia autosómica recesiva causados por mutaciones en el gen de la placoglobina (*JUP*), asociadas a la enfermedad de Naxos, cuyo fenotipo se caracteriza por la presencia de queratosis palmoplantar, cabello lanoso en el primer año de vida, y aunque en general hay ausencia de síntomas cardiacos en ese periodo, pueden presentarse anomalías electrocardiográficas y arritmias ventriculares discontinuas durante la niñez que serán 100% penetrantes al llegar a la adolescencia^[104]; y por mutaciones en el gen de la desmoplaquina (*DSP*), asociadas al síndrome de Carvajal, que se manifiesta con cabello lanoso, queratoderma palmoplantar epidermolítico y miocardiopatía fuertemente asociada con insuficiencia cardíaca en la adolescencia; la cual se creía más vinculada al ventrículo izquierdo, pero investigaciones posteriores revelaron la presencia del típico fenotipo de ARVC en ambos ventrículos^[105, 106] (Tabla 3).

Aunque se desconoce el mecanismo fisiopatológico exacto por el cual las proteínas mutadas causan la enfermedad, se han formulado varias hipótesis sobre la coexistencia de uno o varios posibles mecanismos: (1) la carencia de proteínas (causada por haploinsuficiencia) o la incorporación de proteínas mutantes en los desmosomas cardiacos (efecto negativo dominante) podrían provocar el desenganche de los miocardiocitos en los discos intercalares, poniendo en peligro las adhesiones célula-célula, particularmente bajo condiciones de estrés (por ejemplo, por el deporte) o infecciones; y en consecuencia, existe una progresiva degeneración de los miocitos que acaba derivando en muerte celular con la subsiguiente puesta en marcha de un mecanismo de reparación que reemplaza el miocardio muerto por tejido fibroadiposo^[107].

Las arritmias ventriculares pueden desencadenarse tanto en la fase de muerte miocítica en forma de fibrilación ventricular, como en la fase de cicatrización, en forma de taquicardia ventricular^[108]. (2) La disfunción de las adhesiones célula-célula debido a cambios en los componentes de los desmosomas podría afectar a la cantidad y distribución de otras proteínas del disco intercalado, incluida la conexina-43 que es la principal proteína formadora de uniones *gap* en el miocardio del ventrículo; lo cual reduciría la transmisión eléctrica normal entre células^[106, 109, 110]. (3) Finalmente, la placoglobina puede encontrarse tanto en el sarcolema como en el núcleo celular, y se ha demostrado que la alteración de la desmoplaquina conduce a una translocación de la placoglobina desde el sarcolema hasta el núcleo, suprimiendo la ruta de señalización canónica Wnt/ β -catenina, que a su vez dejaría de inhibir la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos; lo cual se traduce en la promoción de la diferenciación del músculo a tejido adiposo en el miocardio de los pacientes de ARVC^[111].

Tabla 3. Bases genéticas y moleculares de la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho.

Gen	Locus	Proteína
Desmosomas		
<i>JUP</i>	17q21	Placoglobina
<i>DSP</i>	6p24	Desmoplaquina
<i>PKP2</i>	12p11	Placofilina
<i>DSG2</i>	18q12	Desmogleína 2
<i>DSC2</i>	18q12	Desmocolina 2
Extradesmosomales		
<i>RYR2</i>	1q42-q43	Receptor de rianodina 2
<i>TGFB3</i>	14q23-q24	Factor de crecimiento transformante β 3
<i>TMEM43</i>	3p25	Proteína transmembrana 43
<i>DES</i>	2q35	Desmina
<i>TTN</i>	2q31	Titina
<i>LMNA</i>	1q11-q23	Lamina A/C
<i>PLN</i>	6q22.1	Fosfolambán

Listado de los principales genes desmosomales y extradesmosomales y sus proteínas, implicados en el desarrollo de miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho.

II.1.3.4. MIOCARDIOPATÍA NO COMPACTADA (DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO)

En la literatura pueden encontrarse diferentes términos para referirse a esta enfermedad; el más común es el de miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (LVNC, por su siglas en inglés: *left ventricular non-compactation*), pero también el de miocardiopatía no compactada, hipertrabeculación del ventrículo izquierdo, miocardiopatía esponjiforme, miocardio embrionario, miocardio esponjoso, etc.^[112]. La LVNC es una enfermedad de diagnóstico relativamente reciente^[113]. Desde el punto de vista patológico, está caracterizada por trabéculas prominentes y profundas depresiones intertrabeculares que comunican con la cavidad del ventrículo izquierdo, consideradas morfológicamente como reminiscentes del desarrollo embrionario del corazón, debido a un fallo en las últimas etapas de la embriogénesis en la formación del miocardio completamente compacto^[114, 115]. Clínicamente, se caracteriza por la presencia de la tríada insuficiencia cardiaca/arritmias/eventos trombo-embólicos con un alto riesgo de muerte súbita^[51].

Mientras que la *American Heart Association* considera LVNC como una miocardiopatía de origen genético^[51], la *European Society of Cardiology* la considera una miocardiopatía no clasificada, ante la falta de consenso en si ésta puede constituir un rasgo morfológico (congénito o adquirido) compartido por varias miocardiopatías fenotípicamente distintas^[52]. La enfermedad puede aparecer asociada al fenotipo de otras miocardiopatías tales como DCM, determinado por la dilatación del ventrículo izquierdo con función sistólica reducida; HCM, determinado por la ausencia de la disminución de la pared del ventrículo que cabría esperar de acuerdo con el grado de dilatación del ventrículo que puede llegar a observarse en algunos pacientes^[116]; u otras enfermedades congénitas del corazón^[52].

La prevalencia de LVNC no ha podido determinarse con precisión por la falta de estudios poblacionales, y los datos de los que se dispone están basados en estudios retrospectivos de cohortes de pacientes, los cuales varían en función de los distintos criterios de diagnóstico aplicados, de todos los que se han establecido en los últimos 25 años^[112, 117]. Pero las estimaciones más recientes son de 1:2.000 a 1:7.000 individuos^[118]. El gran estudio de miocardiopatías pediátricas llevado a cabo por Nugent y colaboradores en 2003, estima una prevalencia del 9% en pacientes de miocardiopatía pediátrica, lo que la convierte en la tercera causa por detrás de DCM y HCM^[53].

Las causas de LVNC adquirida son escasas, y pueden ser tanto fisiológicas como patológicas^[119, 120]. La mayoría de las formas de LVNC, sumando aisladas y no aisladas, es hereditaria y genéticamente heterogénea^[121]. Actualmente, se han identificado defectos genéticos en el 42% de los pacientes de LVNC (35% de adultos y 78% de niños^[121], mientras que la mitad de los estudios realizados en familias permanecen sin resolver, lo que indica la necesidad de seguir estudiando esta enfermedad para encontrar nuevas

causas genéticas^[122]. La mayoría de los defectos genéticos se heredan como rasgos autosómicos dominantes, a excepción de ciertas formas sindrómicas de LVNC que suelen diagnosticarse durante la infancia^[112]. Una proporción importante de formas aisladas de LVNC en niños y adultos (33%) se ha asociado con mutaciones en los mismos genes de la sarcómera que están implicados en el desarrollo de HCM, DCM y miocardiopatía restrictiva^[112], lo cual podría explicar que compartan algunas de las características patológicas citadas anteriormente. La forma recesiva más frecuente de diagnóstico de LVNC va ligada a mutaciones en el gen *TAZ* en el cromosoma X que causan síndrome de Barth y otras formas de miocardiopatía pediátrica^[123, 124] (ver apartado “Miocardiopatía dilatada”). El solapamiento de defectos sarcoméricos y la ocurrencia de HCM y DCM en familias con pacientes de LVNC indican que, por lo menos, algunas formas de la enfermedad son parte de un espectro más amplio de miocardiopatías^[112].

II.1.3.5. MIOCARDIOPATÍA RESTRICTIVA

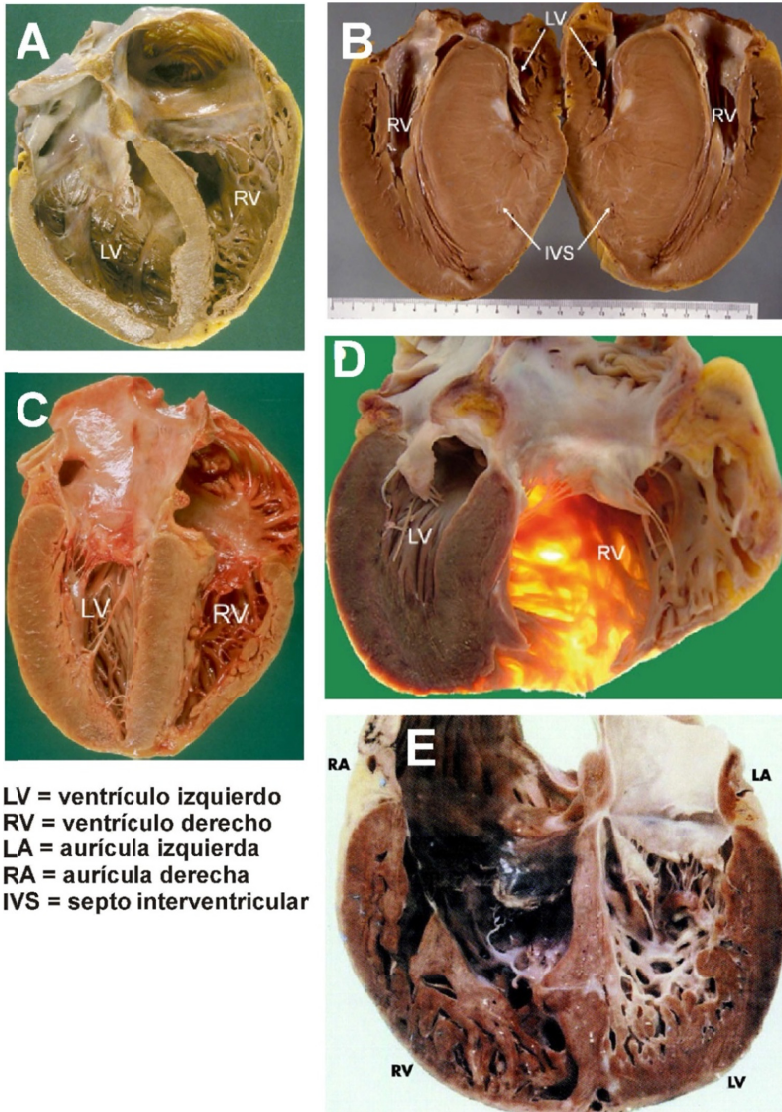
La miocardiopatía restrictiva idiopática (RCM, por sus siglas en inglés: *restrictive cardiomyopathy*) es una enfermedad rara caracterizada por fisiología ventricular restrictiva (rigidez) en presencia de volúmenes diastólicos normales o reducidos (uni- o biventriculares), volúmenes sistólicos normales o reducidos, función sistólica normal o casi normal y grosor normal de la pared del ventrículo^[52]. Clínicamente se caracteriza por síntomas de insuficiencia cardíaca progresiva en ambos lados del corazón; presenta una prognosis mala, con una esperanza de vida media corta (y un alto riesgo de muerte súbita) especialmente si se origina en la niñez, y los pacientes suelen requerir un trasplante de corazón^[125].

Aproximadamente el 50% de los casos están causados por un trastorno clínico específico, que en los países desarrollados suele ser amiloidosis, mientras que el resto de casos son formas primarias o idiopáticas, hereditarias o no^[126].

La prevalencia de la enfermedad se desconoce, pero es muy rara; se estima que suponga el 2-5% de los casos de miocardiopatía pediátrica^[127]. Un 30% de los niños con RCM tiene historia familiar de miocardiopatía y mala prognosis (más del 50% mueren en dos años)^[127]. Los estudios genéticos han identificado mutaciones en genes de la sarcómera, citoesqueleto y proteínas de la envoltura nuclear; típicamente asociadas con DCM^[126, 128]. Las formas familiares de RCM son miocardiopatías autosómicas dominantes con penetrancia incompleta^[129], normalmente originadas en ausencia de anomalías genéticas específicas susceptibles de causar HCM, aunque se ha asociado a mutaciones en el gen de la troponina I cardíaca (*TNNI3*)^[128]. Algunos pacientes que sobreviven a la quinta década de vida desarrollan miopátías progresivas^[127], aunque se

han reportado también casos de familias con múltiples afectos sin miopatía de músculo esquelético^[130].

Figura 5. Miocardiopatías estructurales



En la figura se muestra las cinco clases principales de miocardiopatía estructural que pueden afectar a niños. A) Miocardiopatía dilatada: el ventrículo izquierdo está extremadamente dilatado sin que haya hipertrofia evidente de la pared. B) Miocardiopatía hipertrófica: evidencia de hipertrofia

severa del ventrículo izquierdo, predominante al nivel del septo interventricular, con reducción evidente de la cavidad ventricular. C) Miocardiopatía restrictiva: individuo con amiloidosis cardiaca. Se observa un engrosamiento difuso de las paredes ventriculares con coloración rosada, en ausencia de dilatación de la cámara ventricular. D) Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho: se observa dilatación severa del ventrículo derecho, cuya pared está extremadamente delgada y de apariencia amarillenta, lo cual es compatible con el reemplazamiento del miocardio por tejido adiposo. E) Miocardiopatía no compactada: el ventrículo izquierdo contiene numerosas trabéculas y recovecos, además de una pronunciada fibroelastosis del endocardio (aumento del tejido conectivo y fibras elásticas). A, B, C y D, vista posterior del plano frontal. E (y también B), vista anterior del plano frontal. Fuentes: A, B, C y D, Merlo *et al.*, en *Clinical Echocardiography and Other Imaging Techniques in Cardiomyopathies*, Pinamonti & Sinagra 2014 (Springer)^[131]; E, Jenni *et al.*, 2007^[132].

II.2. ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL CORAZÓN.

El corazón está dotado de un sistema especial que (1) genera impulsos eléctricos rítmicos que causan la contracción rítmica del músculo cardiaco y (2) conduce estos impulsos rápidamente a través del corazón. Cuando este sistema funciona normalmente, las aurículas se contraen menos de dos décimas de segundo antes que los ventrículos, lo que permite el llenado completo de éstos antes de bombear la sangre hacia los pulmones y la circulación periférica. Otro aspecto importante de este sistema es que permite que todas las porciones de los ventrículos se contraigan casi simultáneamente, lo cual es esencial para generar presión en las cámaras ventriculares de la manera más efectiva. Este sistema conductivo y rítmico es susceptible de ser dañado a causa de las enfermedades del corazón, generalmente originando un ritmo cardiaco raro, o una secuencia de contracción de las cámaras del corazón anómala que afecta a la capacidad de bombeo del corazón hasta el punto de poder causar la muerte^[43].

II.2.1. CANALES IÓNICOS CARDIACOS.

La membrana celular está formada por lípidos y proporciona un entorno hidrofóbico perfecto a través del cual los iones hidrofílicos no pueden pasar directamente. Para atravesar la membrana necesitan unas proteínas especializadas denominadas “canales iónicos” y transportadores. Lo que ocurre es que estos canales iónicos no están permanentemente disponibles, sino que alternan estados abiertos y cerrados. Cuando el canal está abierto, los iones pasan a través de la membrana dependiendo de su respectivo gradiente electroquímico. Si el gradiente para un tipo de ion dado está dirigido hacia dentro, los iones entran en la célula y viceversa. “Electroquímico” significa que dos fuerzas independientes pueden mover iones a través de la membrana: el gradiente eléctrico y el gradiente químico. El gradiente químico causa el movimiento de iones desde el compartimento de mayor concentración al compartimento de menos concentración. El gradiente eléctrico causa el movimiento de iones en dirección opuesta

a su carga. Un compartimento cargado negativamente atraerá cationes cargados positivamente pero repelerá aniones cargados negativamente. En ocasiones, ambos gradientes se oponen entre sí y pueden llegar a igualarse de modo que la fuerza que promueve el movimiento de un ion en una dirección es igual a la fuerza que lo promueve en dirección contraria. En ese punto se dice que se alcanza el equilibrio. Dado que el potencial transmembrana determina el gradiente eléctrico, el potencial de equilibrio se define como el potencial transmembrana al cual el gradiente eléctrico se opone perfectamente al gradiente químico y permite el equilibrio de un ion determinado. Por ejemplo, en un miocardiocito el potencial de equilibrio de los iones K^+ es de alrededor de -98 mV (dentro de la célula es negativo comparado con el medio extracelular), al cual la fuerza del gradiente químico (dirigido hacia fuera) iguala a la fuerza del gradiente eléctrico (hacia dentro)^[133]. El potencial de equilibrio para cada tipo de ion viene dado por la ecuación de Nernst (Tabla 4):

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_e}{[ion]_i}$$

donde,

- E_{ion} = potencial de equilibrio del ion dado (en voltios, V);
- R = constante de los gases ideales = 8,314 J/K·mol, ó 1,987 cal/K·mol;
- T = temperatura absoluta (en kelvins, K);
- F = constante de Faraday = 2,306 x 10⁴ cal/V·mol;
- z = valencia (carga) del ion;
- $[ion]_e$ y $[ion]_i$ = concentración del ion fuera y dentro de la célula, respectivamente (en moles, M);
- I es la corriente iónica (en amperios, A).

Tabla 4. Potenciales de equilibrio iónico en músculo esquelético de mamíferos.

Ion	RT/zF	$[ion]_e$ (mM)	$[ion]_i$ (mM)	$[ion]_e/[ion]_i$	E_{ion} (mV)
Na ⁺	26,73	145	12	12	+67
K ⁺	26,73	4	155	0,026	-98
Ca ²⁺	13,37	1,5	0,0001	15.000	+128
Cl ⁻	26,73	123	4,2	29	-90

Concentraciones iónicas de algunos elementos en células del músculo esquelético de mamíferos y sus potenciales de equilibrio. E_K y E_{Cl} son valores negativos, y E_{Na} y E_{Ca} son positivos. E_K establece el límite negativo y E_{Ca} el límite positivo del potencial de membrana que puede alcanzarse en una célula muscular gracias a la apertura de canales para el paso selectivo de iones. Todas las células excitables tienen potenciales en reposo negativos porque en ese estado todas tienen más canales selectivos a potasio y cloro que a sodio o calcio. Fuente: adaptación de Hille 2001 (Sinauer Sunderland)^[134].

En los miocardiocitos, las bombas Na^+/K^+ enriquecen el interior de la célula con K^+ y la empobrecen de Na^+ . También ocurre que estas células en reposo son predominantemente permeables al K^+ y por ello el potencial de membrana (PM) en reposo de -80 mV es cercano al potencial de equilibrio del K^+ . En general, el PM, denominado E_m o V_m depende de la permeabilidad relativa (conductancia, g) a distintas especies de iones. Durante el PA (ver más adelante), el PM deja de ser exclusivamente permeable al K^+ y se vuelve permeable para otras especies de iones, modificando el valor de -80 mV .

La corriente generada por el movimiento de iones a través de los canales iónicos insertados en la membrana celular (que actúa como aislante eléctrico) afecta al PM en función de la resistencia que ésta opone a dicho movimiento (Ley de Ohm):

$$I = \frac{E_m}{R} = E_m g$$

donde,

I es la corriente iónica (en amperios, A);

E_m es el potencial de membrana (en voltios, V);

R es la resistencia de la membrana celular (en ohmios, Ω), y

g es la conductancia de la membrana (en Siemens, S).

La corriente será negativa cuando el PM sea más negativo que el potencial de equilibrio del ion; en cambio, será más positiva cuando el PM sea más positivo que el potencial de equilibrio del ion. La cantidad de corriente iónica variará en función de la diferencia de potencial entre el PM y el potencial de equilibrio del ion, y de la conductancia para ese ion dado. Por tanto, la corriente de un ion sigue la denominada Ley de Ohm modificada por Hodgkin y Huxley:

$$I = (E_m - E_{ion})g_{ion}$$

donde,

I es la corriente iónica (en amperios, A);

E_m es el potencial de membrana (en voltios, V);

E_{ion} es el potencial de equilibrio del ion (en voltios, V) y

g_{ion} es la conductancia de la membrana para ese determinado ion (en Siemens, S).

La mayoría de los canales iónicos expresados en el corazón son dependientes de voltaje. En la mayor parte de los casos, el canal se abre cuando la célula se despolariza (el PM es menos negativo en el interior que en el medio externo). La apertura de los canales

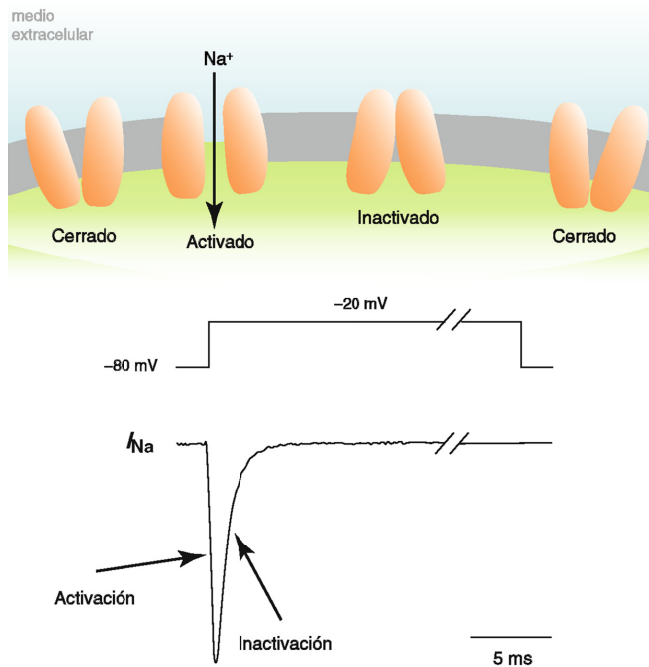
no siempre es instantánea, sino que en ocasiones requiere de hasta varios cientos de milisegundos para lograrlo. Por tanto, la mayoría de los canales iónicos cardiacos son, además, dependientes de tiempo.

Según la Ley de Ohm, cuando se abre un canal iónico, genera una corriente que afecta al PM, que a su vez afectará a la apertura de canales (dependientes de voltaje) pero no inmediatamente (dependientes de tiempo). La actividad eléctrica de la célula debe ser considerada en un espacio tridimensional: voltaje, corriente y tiempo. Si entran en la célula iones positivos (cationes), el movimiento genera una corriente hacia dentro que despolariza la membrana celular. Si dichos cationes salen de la célula, el movimiento genera una corriente hacia fuera que repolariza o hiperpolariza la membrana celular previamente despolarizada.

En general, los canales iónicos cardiacos están gobernados por dos procesos independientes: la activación y la inactivación. En la Figura 6 se muestra el funcionamiento de un canal de Na^+ a modo de ejemplo. Durante la fase del potencial en reposo (-80 mV), la fuerza que impulsa el movimiento de los iones Na^+ está claramente dirigida hacia el interior de la célula (ambos gradientes, químico y eléctrico están dirigidos hacia el interior celular; el E_{Na^+} está alrededor de +70 mV), pero como los canales están cerrados, no se genera corriente. Si el potencial transmembrana llega a valores más positivos (por encima de -60 mV, que es el potencial umbral), los canales de Na^+ se abren (se activan) y se genera corriente de sodio I_{Na} . La activación tarda unas decenas de milisegundos. La activación de los canales de Na^+ crea una corriente hacia dentro que despolariza aún más la membrana y repercute en mayor activación de canales de Na^+ (retroalimentación positiva). Este círculo de retroalimentación es interrumpido cuando los canales de Na^+ se inactivan. Incluso, aunque la membrana se mantenga despolarizada, los canales se cierran espontáneamente. La inactivación es un proceso independiente de la activación. Por ello, en respuesta a la despolarización de la membrana, los canales de Na^+ se activan rápidamente y después se inactivan (menos) rápidamente. Dado que la activación es más rápida que la inactivación, los canales de Na^+ generan una corriente despolarizante (hacia dentro). Si la membrana es repolarizada hasta el potencial en reposo de nuevo, la compuerta de activación se cierra (este proceso se denomina desactivación), mientras que la compuerta de inactivación se reabre (este proceso se llama reactivación o cese de la inactivación): el canal queda listo para abrirse en respuesta a un nuevo estímulo despolarizante^[133].

La Tabla 5 recoge las principales corrientes iónicas, canales y subunidades auxiliares y genes expresados en el corazón humano.

Figura 6. Activación e inactivación de la corriente de Na^+ de acuerdo con la conformación del canal.



Esquema de la corriente de Na^+ (abajo) registrada durante un pulso de voltaje (medio). La activación del canal se corresponde con un aumento del número de canales de Na^+ abiertos durante la despolarización de la membrana (arriba), mientras que la inactivación se corresponde con un aumento del número de canales que han pasado del estado abierto (activado) al estado inactivado. La repolarización permite que los canales inactivados recuperen la conformación cerrada. Fuente: adaptación de Baró et al., en *Electrical diseases of the heart*, Gussak & Antzelevich 2013 (Springer)^[133].

II.2.2. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.

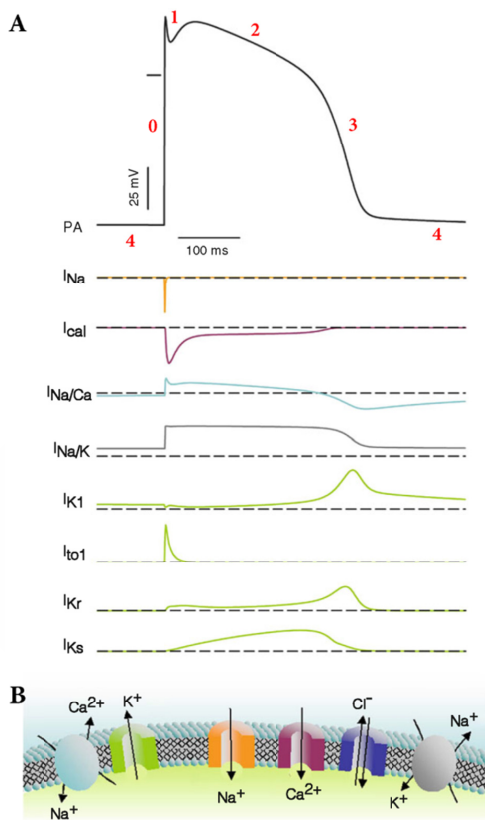
Algunas células cardiacas tienen capacidad de autoexcitación; es decir, que puede despolarizarse sin ninguna influencia externa; un proceso que puede causar descargas rítmicas automáticas y contracción (automatismo del músculo cardíaco). Esto es especialmente cierto en las células del sistema de conducción especializado del corazón,

incluidas las células del nódulo sinusal o sinoauricular (SA). Por esta razón, el SA controla, normalmente, la frecuencia de latido de todo el corazón^[43].

Dada la naturaleza sincicial del músculo cardíaco, la estimulación de cualquier fibra muscular aislada de la aurícula hará que el PA se distribuya por toda la masa muscular auricular. Lo mismo sucede en el ventrículo y, si el haz A-V está intacto, también pasa de aurículas a ventrículos. Esto es lo que se llama el “principio del todo o nada” aplicado al sincitio funcional del corazón. El impulso eléctrico generado por el intercambio iónico en las células autoexcitables del SA produce el PA que se transmite rápidamente a otras células adyacentes (Figura 7). Durante unos milisegundos la membrana celular se vuelve más permeable al Na^+ que al K^+ (se activa un mayor número de canales rápidos de Na^+). En esta situación, el PM es atraído inmediatamente hacia el E_{Na^+} (+70 mV). Es la fase 0, o de despolarización del PA. Inmediatamente después del pico de despolarización causado por la activación de canales Na^+ (I_{Na}), tiene lugar la fase 1 o repolarización parcial de la membrana. Esta leve repolarización viene dada por la inactivación de los canales de Na^+ y la apertura de los canales de K^+ responsables de las corrientes transitorias I_{to} . La despolarización en la fase 0 también activa otros canales iónicos de Ca^{2+} (I_{Ca}) y K^+ (I_{Ks}), que tienen una cinética de activación más lenta que los de Na^+ . Como la fuerza que impulsa el movimiento de iones Ca^{2+} es hacia dentro (el $E_{\text{Ca}^{2+}}$ es +129 mV) el gradiente químico genera más I_{Ca} hacia el interior manteniendo la despolarización y, junto con otras corrientes, genera la fase 2 del PA o “plateau”. Mientras tanto, también se activan corrientes I_{Ks} que dirigen iones K^+ lentamente hacia el exterior (ambos gradientes actúan en esta dirección). Estas corrientes llegan a igualarse en esta fase manteniendo esa “meseta” estable durante unos milisegundos. Entonces, la I_{Ca} se va inactivando progresivamente, mientras comienza la fase 3 en la que se activan más corrientes de K^+ (además de las I_{Ks} que permanecen activas) que inducen a la membrana a repolarizarse hacia el E_{K^+} . Estas corrientes son principalmente las corrientes ultrarrápidas (I_{Kur}), rápidas (I_{Kr}) y las lentas (I_{Ks}) y provocan la repolarización de la célula. En contraste con los miocardiocitos auriculares y ventriculares, los miocardiocitos del SA y el haz A-V muestran una despolarización lenta del potencial en reposo durante la fase 4, debido a que no poseen canales rectificadores de corriente de potasio hacia dentro (I_{K1}), lo que permite que las corrientes hacia dentro (por ejemplo, las corrientes I_{f} del marcapasos) despolaricen el PM^[135] (Tabla 5).

Con el término de la secuenciación del genoma de varias especies, incluyendo el ser humano y el ratón, ha sido posible dilucidar el repertorio completo de genes que codifican canales iónicos. Una célula especializada como lo es el miocardiocito, sólo expresa 1/3 de todo el genoma, aunque esta proporción puede variar con el desarrollo^[133]. El genoma humano contiene 230-250 genes que codifican subunidades α y subunidades β de canales iónicos, aunque como se mencionaba antes, el corazón no expresa toda la colección.

Figura 7. Fisiología básica de la función de los canales iónicos durante el potencial de acción cardíaco.



La figura representa: A) Esquema del potencial de acción cardíaco (PA) y las corrientes iónicas subyacentes que representa el dinamismo del proceso: cuando los canales de Na^+ se activan se genera una subida de voltaje que activa las demás corrientes iónicas. El PA modula, uno por uno, el curso temporal de las diferentes corrientes. B) Representación de los distintos tipos de canales iónicos y transportadores. Las flechas indican la dirección de la corriente en el rango de voltaje del PA. Fuente: adaptación de Baró et al., en *Electrical diseases of the heart*, Gussak & Antzelevich 2013 (Springer)^[133].

El gigantesco avance que supuso el conocimiento del genoma humano abrió las puertas a estudios a gran escala para estudiar la expresión de los canales iónicos en diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas, que sirven para entender las importantes implicaciones que éstos pueden tener en la electrofisiología local (de

distintas zonas del corazón), los mecanismos de las arritmias y las respuestas a fármacos bloqueantes de canales iónicos^[133].

Tabla 5. Corrientes iónicas dependientes de voltaje implicadas en el potencial de acción cardiaco.

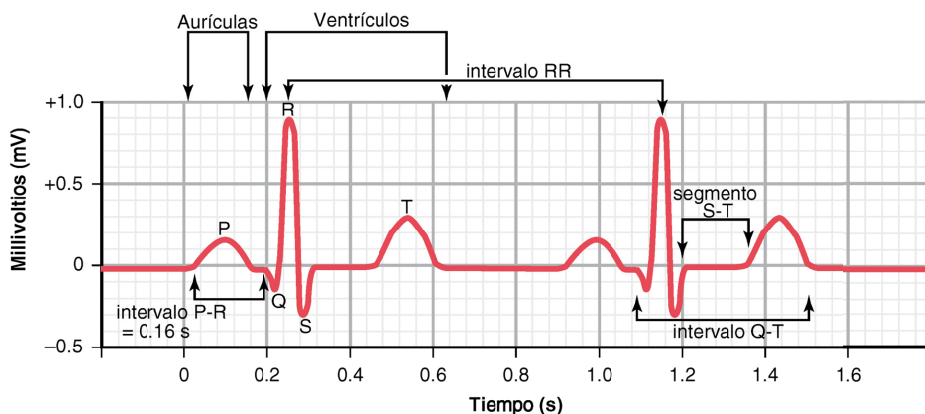
Corriente	Gen	Subunidad α	Gen	Subunidad β / Proteína accesoria
I_{Na}	<i>SCN5A</i>	$Na_v1.5$	<i>SCN1B</i>	$Na_v\beta1$
			<i>SCN2B</i>	$Na_v\beta2$
			<i>SCN3B</i>	$Na_v\beta3$
			<i>SCN4B</i>	$Na_v\beta4$
$I_{to,fast}$	<i>KCND3</i>	$K_v4.3$	<i>KCNE2</i>	MiRP1
			<i>KCNE3</i>	MiRP2
			Varios	KChIPs
			<i>DPP6</i>	DPP6
$I_{to,slow}$	<i>KCNA4</i>	$K_v1.4$	<i>KCNB1</i>	$K_v\beta1$
			<i>KCNB2</i>	$K_v\beta2$
			<i>KCNB3</i>	$K_v\beta3$
			<i>KCNB4</i>	$K_v\beta4$
$I_{Ca,L}$	<i>CACNA1C</i>	$Ca_v1.2$	<i>CACNB2</i>	$Ca_v\beta2$
			<i>CACNA2D1</i>	$Ca_v\alpha2\delta1$
$I_{Ca,T}$	<i>CACNA1G</i>	$Ca_v3.1$		
	<i>CACNA1H</i>	$Ca_v3.2$		
I_{Kur}	<i>KCNA5</i>	$K_v1.5$	<i>KCNAB1</i>	$K_v\beta1$
			<i>KCNAB2</i>	$K_v\beta2$
I_{Kr}	<i>KCNH2</i>	$K_v11.1$	<i>KCNE2</i>	MiRP1
I_{Ks}	<i>KCNQ1</i>	$K_v7.1$	<i>KCNE1</i>	minK
I_{K1}	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1		
I_f	<i>HCN1</i>	HCN1		
	<i>HCN2</i>	HCN2		
	<i>HCN3</i>	HCN3		
	<i>HCN4</i>	HCN4		

Bases genéticas y moleculares de las corrientes iónicas dependientes de voltaje implicadas en el potencial de acción cardiaco. Se indica la subunidad α del canal que transmite la corriente y sus respectivas proteínas accesorias. Fuente: adaptación de Amin et al., *Heart Rhythm* 2010^[135].

II.2.3. ELECTROCARDIOGRAMA.

Cuando el impulso eléctrico atraviesa el corazón, la corriente también se difunde desde el corazón hacia los tejidos adyacentes al corazón y, una pequeña parte, se extiende por toda la superficie del cuerpo. Si se coloca una serie de electrodos sobre la piel, en lados opuestos del corazón, los potenciales generados por la corriente eléctrica pueden ser registrados; dicho registro se conoce como electrocardiograma (ECG). El ECG normal está compuesto por la onda P, el complejo QRS y la onda T. El complejo QRS está formado casi siempre por tres ondas separadas: la onda Q, la onda R y la onda S (Figura 8).

Figura 8. Electrocardiograma normal.

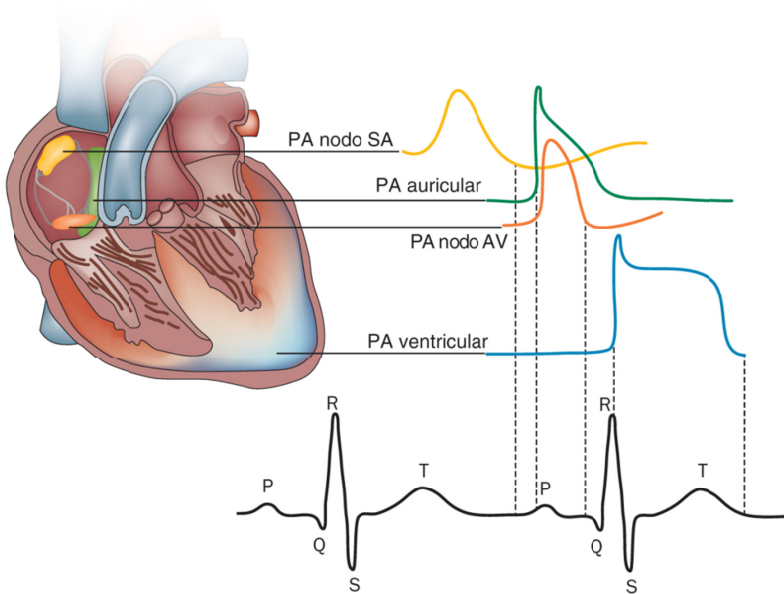


Fuente: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 2010 (Elsevier)^[43].

La onda P está causada por potenciales eléctricos generados con la despolarización de las aurículas, antes de que comience su contracción. El complejo QRS está causado por potenciales generados con la despolarización de los ventrículos, antes de su contracción; es decir, mientras la onda de despolarización se difunde a través de los ventrículos. Por tanto, la onda P y las componentes del complejo QRS son *ondas despolarizantes*. La onda T está causada por potenciales generados mientras los ventrículos se recuperan de la despolarización. En el miocardio ventricular, este proceso ocurre normalmente entre 0,25 y 0,35 segundos después de la despolarización, de modo que la onda T es una *onda repolarizante*^[43]. Así, el ECG está compuesto por ondas despolarizantes y repolarizantes de

distinta morfología y duración^[43] debido a las diferencias entre los PA de las aurículas, ventrículos y nódulos SA y AV; las cuales son atribuidas a una profunda variabilidad en la expresión de los canales iónicos en cada región del corazón (Figura 9)^[136].

Figura 9. Potenciales de acción cardiacos y electrocardiograma.



Representación esquemática del sistema de conducción cardiaco y la correlación entre los potenciales de acción (PA) de los miocardiocitos de distintas regiones del corazón y la superficie del electrocardiograma. Fuente: adaptación de Giudicessi y Ackerman 2012^[137].

II.2.4. TRASTORNOS ARRITMOGÉNICOS HEREDITARIOS ASOCIADOS.

Una arritmia cardiaca se define simplemente con una variación en la frecuencia y/o el ritmo cardiaco normal del corazón que no se justifica fisiológicamente^[138]. Los mecanismos responsables de las arritmias se dividen generalmente en dos categorías principales: la primera, anomalías en la generación del impulso eléctrico (automatismo o actividad desencadenada) y la segunda, anomalías en la conducción del impulso eléctrico (reentrada); y en ocasiones, la responsable es la combinación de ambas.

ANOMALÍAS EN LA GENERACIÓN DEL IMPULSO:

Automatismo: el automatismo es la propiedad de las células cardiacas de generar PA espontáneamente; es decir, en ausencia de una causa externa que la desencadene^[139]. La actividad espontánea (descarga) es el resultado de la despolarización diastólica causada por un flujo neto de entrada de iones (I_f) durante la fase 4 del PA, la cual lleva progresivamente al PM hacia el potencial umbral. El SA es el marcapasos principal del corazón, ya que su frecuencia de descarga es más rápida que la de los marcapasos subsidiarios, y su latido espontáneo representa el ejemplo prototípico de automatismo. El *automatismo normal* de una célula cardiaca puede verse *alterado* por una frecuencia de descarga inapropiada por parte del SA o por la descarga de alguno de los marcapasos subsidiarios que controlan el ritmo auricular o ventricular: nódulo auriculoventricular (AV), sistema de His-Purkinje y algunas células de ambas aurículas^[140]. El ejemplo más claro de automatismo normal alterado es la taquicardia sinusal asociada al ejercicio físico, en la cual la frecuencia de descarga del SA aumenta debido a la actividad simpática del sistema nervioso autónomo (SNA): las catecolaminas aumentan la permeabilidad del sarcolema y favorecen la entrada de Ca^{2+} , también favorecen la potenciación de la I_f , con lo que aumenta la pendiente de la repolarización de la fase 4 del PA^[141, 142]. El *automatismo anormal* ha sido descrito en células no marcapasos de las aurículas y los ventrículos que en condiciones normales no muestran actividad espontánea^[142]. Esto puede ocurrir en situaciones en las que el potencial en reposo (muy negativo) se eleva hasta el potencial umbral (positivo) por la interacción de numerosas corrientes, que en conjunto, conducen a una reducción de la conductancia del potasio. La frecuencia de descarga de un foco automático anormal depende del PM: cuanto más positivo sea el PM, mayor será la frecuencia de descarga. Se postula que el automatismo anormal puede aparecer en los casos de potasio extracelular elevado, pH intracelular bajo y exceso de catecolaminas^[142].

Actividad desencadenada (triggered activity): la actividad desencadenada se define como la iniciación del impulso causado por pospotenciales (oscilaciones del potencial de membrana que se producen durante o inmediatamente después de un PA precedente^[143]). Los pospotenciales únicamente pueden producirse en presencia de un PA previo (el desencadenante). Cuando alcanzan el potencial umbral, se genera un nuevo PA, que genera una nueva respuesta desencadenada, que a su vez puede originar una nueva respuesta, y así perpetuar el mecanismo. Si los pospotenciales ocurren durante las fases 2 y 3 del PA se denominan pospotenciales precoces (PPP), mientras que los pospotenciales tardíos (PPT) ocurren después de la fase 4, de repolarización^[142]. Existe un amplio número de condiciones experimentales que pueden originar PPP, pero todos tienen en común la característica de prolongar la fase de repolarización. Un PPP ocurre cuando, por alguna razón, el equilibrio de las corrientes repolarizantes cambia, de manera que se genera un flujo neto de entrada de cargas; bien como consecuencia de un descenso en el

flujo de salida de corriente de potasio, o bien por un aumento en el flujo de entrada de corrientes de sodio o calcio^[141]. En el ECG, esta prolongación del PA se manifiesta como una prolongación del intervalo QT^[142]. El ejemplo clínico más típico de arritmias inducidas por PPP es la *torsade de pointes* (TdP), una taquicardia ventricular (TV) polimórfica característica que se observa en los pacientes (tanto adultos como niños) con síndrome de QT largo^[141]. Los PPT son oscilaciones del PM que se producen tras haberse completado la repolarización. Estas oscilaciones son producidas por una liberación espontánea de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico que, en definitiva, eleva la concentración de Ca^{2+} intracelular diastólico, activa el intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ y aumenta el flujo de entrada de Na^+ lo cual puede llegar a desencadenar un nuevo PA si alcanzan el umbral de estimulación^[141]. Un ejemplo típico de arritmia causada por PPT es la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT, por sus siglas en inglés: *catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*), que puede ser causada por mutaciones en el receptor de la rianodina tipo 2 (*RYR2*) o en la calscuestrina (*CSQ2*)^[144, 145]. El mecanismo fundamental de estas arritmias es debido a “fugas” de Ca^{2+} a través del receptor de la rianodina, que se agravan durante la estimulación por catecolaminas^[146]. Un fenotipo típico de CPVT es la TV bidireccional que también se puede observar por intoxicación por *Digitalis purpurea* (la digitalina inhibe la bomba Na^+/K que fomenta la liberación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico^[147, 148]).

TRASTORNOS DE LA CONDUCCIÓN DEL IMPULSO:

Reentrada: durante la actividad eléctrica normal, el ciclo cardiaco se inicia en el nódulo sinoauricular y continúa propagándose hasta activar todo el corazón. Cuando todas las fibras se han despolarizado se encuentran en una fase completamente refractaria, el impulso se extingue. Sin embargo, si un grupo aislado de fibras no se ha activado durante la onda inicial de despolarización, estas fibras pueden excitarse antes de que se extinga el impulso, porque aún están a tiempo de despolarizarse. En este contexto, pueden actuar como vínculo para volver a excitar zonas previamente despolarizadas pero que se han recuperado de la despolarización inicial^[143]. Este proceso se denomina reentrada, e indica una propagación repetitiva de la onda de activación que vuelve a su lugar de origen para volver a activar la zona ya activada^[143]. La reentrada puede clasificarse en *anatómica* y *funcional*, aunque ambas formas pueden coexistir en el mismo contexto y comparten mecanismos biofísicos comunes^[149]. La reentrada es el mecanismo arritmico que se observa con mayor frecuencia en las arritmias clínicas. El mecanismo de *reentrada anatómica* se basa en un obstáculo anatómico no excitable rodeado por una vía circular en la que el frente de onda puede “reentrar” y crea circuitos de reentrada fijos y estables. El obstáculo anatómico determina la presencia de dos vías y cuando el frente de onda encuentra el obstáculo, avanza por una de las vías (bloqueo unidireccional) y se propaga hasta el punto del bloqueo, con lo que se inicia el circuito de reentrada^[142]. En la *reentrada*

funcional, el circuito no está determinado por obstáculos anatómicos, sino que lo definen las heterogeneidades dinámicas de las propiedades electrofisiológicas del tejido involucrado. La localización y el tamaño de los circuitos de reentrada funcionales puede variar, pero generalmente son pequeños e inestables. Los circuitos de reentrada funcionales son pueden deberse a distintos mecanismos (ver Gaztañaga et al.,^[142] para una revisión más profunda) y los ejemplos clínicos más típicos son la fibrilación auricular y ventricular, y la TV polimórfica. Como se mencionaba previamente, el miocardio del ventrículo no es homogéneo, y está compuesto por, al menos, tres tipos de células funcional y electrofisiológicamente distintas: las células epicárdicas, células M y células endocárdicas^[150]. Estos tres tipos celulares difieren respecto a las características de las fases 1 y 3 del PA; por ejemplo: las células epicárdicas ventriculares y las M (pero no así las endocárdicas) muestran, generalmente, una prominente fase 1 del PA debida a la presencia de una gran corriente transitoria de salida (I_{to})^[146]. Estas diferencias en la I_{to} también han sido detectadas entre el epicardio ventricular derecho y el epicardio ventricular izquierdo en humanos^[151], y en células M caninas^[152], lo cual podría explicar, por ejemplo, por qué el síndrome de Brugada, una canalopatía con alto riesgo de MSC, es una enfermedad del ventrículo derecho^[146]. Estas heterogeneidades transmuralas que se ponen de manifiesto normalmente en la primera y última fase del PA pueden conducir al desarrollo de una gran variedad de arritmias, incluyendo el síndrome de Brugada, los síndromes de QT largo y QT corto, y la CPVT. Estos trastornos arritmogénicos han demostrado tener una base genética, y la pérdida o ganancia de función que provocan las mutaciones en los genes asociados a estas canalopatías subyace al sustrato arritmogénico y los desencadenantes de dichas enfermedades^[146].

A continuación se describen los principales trastornos arritmogénicos de origen genético implicados en MSC en adultos y niños.

II.2.4.1. SÍNDROME DE QT LARGO

El síndrome de QT largo (LQTS, por sus siglas en inglés: *long QT syndrome*) describe a un grupo de trastornos arritmogénicos caracterizados por la prolongación del intervalo QT debido a un retraso en la repolarización cardiaca, que pueden ser de origen genético o adquirido. El sustrato de repolarización cardiaca anómala predispone al desarrollo de TdP y paro cardíaco^[19] (Tabla 6).

La prevalencia en la población puede ser hasta de 1 en 2.000 personas^[153], aunque no todos los pacientes con LQTS mostrarán prolongación del intervalo QT en un ECG de 12 derivaciones. De hecho, el 40-50% de los pacientes con mutaciones en genes asociados a LQTS tienen un intervalo QT corregido (QTc) en reposo normal^[154]. Este fallo eléctrico de la repolarización retardada casi nunca trae consecuencias; sin embargo, raramente algunos desencadenantes como ciertos tipos de ejercicio físico, emociones,

estímulos auditivos o situaciones de estrés pueden desestabilizar el corazón y culminar en una arritmia o TdP letal^[154]. La mayoría de las veces que esto sucede, el ritmo cardiaco retorna espontáneamente a la normalidad y el evento se queda en un episodio de síncope, pero el 5% de los individuos que permanecen sin tratar o en los cuales no se sospecha de la presencia de LQTS sufren SCD como único síntoma^[154]. Se estima que, aproximadamente el 20% de todas las SCD en jóvenes y el 10% de los casos de SIDS^[155] pueden ser explicados por LQTS.

Tabla 6. Clasificación electrocardiográfica de tres niveles.

Clasificación	1-15 años	Varón adulto	Mujer adulta
Normal	<440 ms	<430 ms	<450 ms
Límite	440-460 ms	430-450 ms	450-470 ms
Prolongado	>460 ms	>450 ms	>470 ms

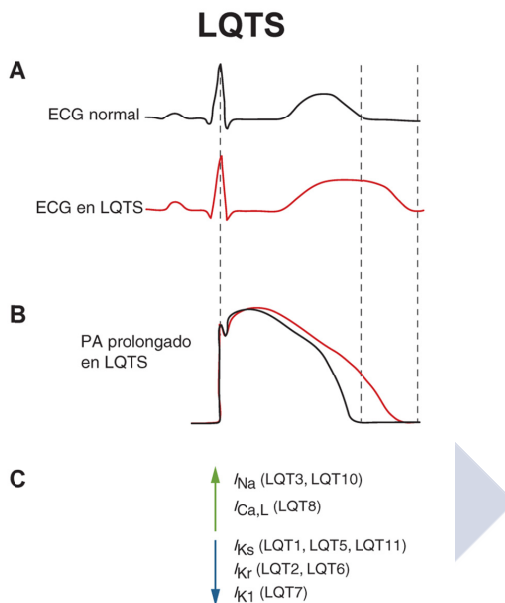
El intervalo QT del ECG se define como el intervalo de tiempo entre el comienzo del complejo QRS y el final de la onda T. La duración del intervalo QT debe ser corregido en función del ritmo cardiaco. Existen numerosas fórmulas para calcularlo, aunque la más frecuentemente utilizada es la fórmula de Bazett ($QTc = QT/RR^{1/2}$). Los datos de la tabla proceden del estudio de Goldenberg et al., 2006^[156], después de analizar a más de 800 individuos, niños y adultos, de ambos sexos.

El LQTS es un trastorno genéticamente heterogéneo que se hereda típicamente con un patrón autosómico dominante previamente conocido como síndrome de Romano-Ward^[157, 158]. También existe una forma hereditaria autosómica recesiva caracterizada por un fenotipo cardiaco más severo y pérdida de la función auditiva, conocido como síndrome de Jervell & Lange-Nielsen^[159]. Aproximadamente un 5-10% de los casos parece tener origen en mutaciones espontáneas en la línea germinal. Hasta la fecha se han descrito cientos de mutaciones en 13 genes de susceptibilidad a LQTS (Tabla 7). Un 75% de los casos de LQTS puede ser esclarecido por la presencia de mutaciones patogénicas que implican pérdida o ganancia de función, en tres genes asociados a LQTS que codifican las subunidades α de los tres principales canales iónicos que orquestan el PA^[160]: *KCNQ1*^[161], *KCNH2*^[162] y *SCN5A*^[163] (Figura 10).

La mayoría de las mutaciones en estos genes son variantes de un solo nucleótido (SNV, por sus siglas en inglés: *single nucleotide variation*) en regiones codificantes, que resultan en una sustitución aminoacídica no sinónima de tipo *missense* (un aminoácido es sustituido por otro distinto), *nonsense* (un aminoácido es sustituido por un codón de parada), alteraciones del sitio de *splicing* (que tienen como resultado la pérdida de un exón o la retención de un intrón), o pequeñas inserciones/deleciones que conducen a

mutaciones *frameshift* (alteran el patrón de lectura y acortan la secuencia prematuramente)^[164]. Aunque recientemente también se han descrito grandes reestructuraciones genéticas que implican deleciones/duplicaciones individuales o múltiples de exones completos^[165].

Figura 10. Síndrome de QT largo.



Mecanismo fisiopatológico del síndrome de QT largo (LQTS) a nivel molecular y celular. A) Representación esquemática de un electrocardiograma ECG normal (negro) y un ECG típico de LQTS (rojo). B) Trazos del potencial de acción cardíaco (PA) normal (negro) y PA prolongado en caso de LQTS (rojo). C) Perturbaciones en las corrientes iónicas cardíacas que contribuyen a la patogénesis de LQTS. Las flechas verdes indican mutaciones que producen ganancia de función y las azules indican mutaciones que producen pérdida de función de la proteína. Entre paréntesis se indica el fenotipo de LQTS asociado a cada canal alterado. Fuente: adaptación de Giudicessi & Ackerman, 2012^[137].

El resto de genes “minoritarios” de susceptibilidad a LQTS explica, de manera colectiva, un 5% de los casos^[154]. Estos genes codifican bien proteínas que interactúan con los canales iónicos cardíacos y regulan las corrientes que éstos originan, o bien proteínas de andamiaje de la membrana, cuya función es situar correctamente a los principales canales iónicos en la membrana plasmática. En 1976, Schwartz y Maron

propusieron por primera vez una hipótesis sobre la implicación del corazón y del SNA en el mecanismo subyacente a SUDI/SIDS^[166, 167]. Dos décadas después, el grupo de Schwartz publicó la primera prueba sobre la asociación de SIDS con LQTS después de un monumental estudio prospectivo de 19 años, al hallar que una importante proporción de los casos de SIDS que registraron en una cohorte de más de 33.000 neonatos a los que realizaban un seguimiento electrocardiográfico durante su primer año de vida, tenía el QTc más largo que los neonatos que murieron por otras causas identificadas^[168]. Poco tiempo después, el mismo grupo estableció la primera prueba de asociación entre LQTS y SIDS a nivel molecular mediante la identificación de mutaciones en los genes *SCN5A*^[169] y *KCNQ1*^[170]. Desde entonces se han hallado mutaciones en estos genes y en los otros genes “minoritarios” en casos de SADS/SUDI/SIDS.

Es importante destacar que no hay *hot spots* (puntos concretos del gen con una alta tasa de mutación) en estos genes, ya que la mayor parte de las familias no emparentadas entre sí posee mutaciones privadas; además, a fecha del año 2012, en cerca del 20-25% de los casos clínicos con diagnóstico definitivo de LQTS no se ha llegado a identificar la causa genética^[154].

Tabla 7. Bases genéticas y moleculares del síndrome de QT largo.

Subtipo	Cromosoma	Gen	Proteína	Alteración funcional	Corriente modificada
LQT1	11p15.5	<i>KCNQ1</i>	K _v 7.1	PdF	I _{Ks}
LQT2	7q35-36	<i>KCNH2</i>	K _v 11.1 (hERG)	PdF	I _{Kr}
LQT3	3p21-24	<i>SCN5A</i>	Na _v 1.5	GdF	I _{Na}
LQT4	4q25-27	<i>ANK2</i>	Ankirina B	PdF	I _{Ks}
LQT5	21q22.1	<i>KCNE1</i>	MinK	PdF	I _{Ks}
LQT6	21q22.1	<i>KCNE2</i>	MiRP1	PdF	I _{Kr}
LQT7	17q23	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	PdF	I _{K1}
LQT8	12p13.3	<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2	GdF	I _{Ca,L}
LQT9	3p25	<i>CAV3</i>	Caveolina 3	GdF	I _{Ca,L}
LQT10	11q23.3	<i>SCN4B</i>	Na _v β4	GdF	I _{Na}
LQT11	7q21-22	<i>AKAP9</i>	Yotiao	PdF	I _{Ks}
LQT12	20q11.2	<i>SNTA1</i>	sintrofina-α 1	GdF	I _{Na}
LQT13	11q24.3	<i>KCNJ5</i>	Kir3.4	PdF	I _{K,ATP}

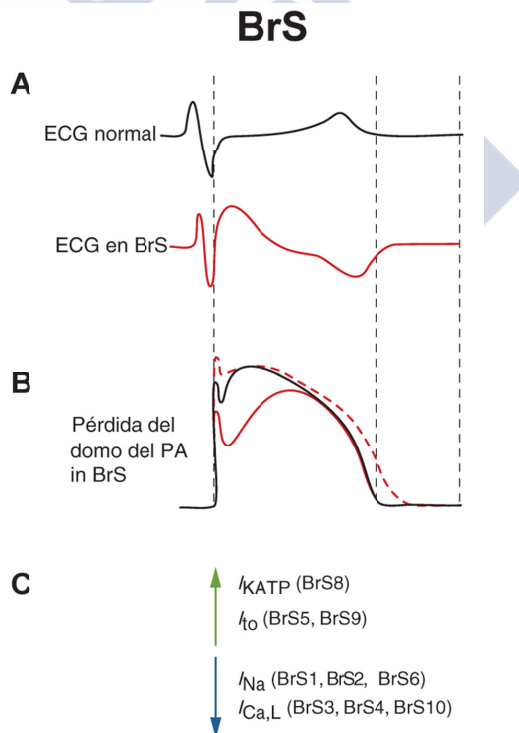
Hasta la fecha, se han identificado cientos de mutaciones en 13 genes de susceptibilidad a síndrome de QT largo. Estas mutaciones alteran la proteína codificada provocando un mecanismo de

pérdida o ganancia de función del canal implicado en una determinada corriente iónica del potencial de acción cardiaco. PdF, pérdida de función; GdF, ganancia de función.

II.2.4.2. SÍNDROME DE BRUGADA.

El síndrome de Brugada (BrS, por sus siglas en inglés: *Brugada syndrome*) es un trastorno arritmogénico hereditario descrito por primera vez en 1992 con un alto aumento del riesgo de MSC debido a episodios de fibrilación ventricular (FV) en ausencia de anomalías estructurales del corazón^[171]. Se caracteriza por un patrón ECG con elevación persistente del segmento ST (≥ 2 mm) en las derivaciones precordiales V₁-V₃, seguida de una onda T negativa. Esta elevación es la que se denomina BrS tipo I y es la única forma de diagnóstico de la enfermedad (Figura 11). Los patrones II y III son de susceptibilidad a BrS, pero no son diagnósticos definitivos por sí solos^[171].

Figura 11. Síndrome de Brugada.



Mecanismo fisiopatológico del síndrome de Brugada. A) Representación esquemática de un electrocardiograma (ECG) normal (negro) y un ECG con patrón tipo I de síndrome de Brugada (BrS,

en rojo). B) Trazos del potencial de acción cardiaco (PA) normal (negro) y PA con pérdida del domo característico de BrS (rojo). C) Perturbaciones en las corrientes iónicas cardiacas que contribuyen a la patogénesis de BrS. Las flechas verdes indican mutaciones que producen ganancia de función y las azules indican mutaciones que producen pérdida de función de la proteína. Entre paréntesis se indica el fenotipo de BrS asociado a cada canal alterado. Fuente: adaptación de Giudicessi & Ackerman, 2012^[137]

Es un trastorno genéticamente heterogéneo que se hereda típicamente mediante un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable^[172]. Las primeras mutaciones asociadas a BrS fueron identificadas en 1998 en el gen *SCN5A*, que codifica la subunidad α del canal de sodio cardiaco^[173] y, aunque éste fue el único gen asociado a la enfermedad durante casi diez años, las mutaciones en él suponen el sólo entre un 18-30% del total de pacientes para los que se ha analizado este gen^[174]. Aunque de forma menos frecuente, también se han reportado mutaciones en otros genes codificantes de canales de calcio (*CACNA1C*, *CACNB2C*, *CAN2D1*), subunidades β de los canales de sodio (*SCN1B*, *SCN3B*), algunos canales de potasio (*KCNE3*, *KCND3*, *KCNE5*) y proteínas que regulan la expresión de los canales de sodio en la membrana celular (*RANGRF*, *GPDIL*) entre otros (Tabla 8)^[175].

Hasta la fecha se han identificado más de 200 mutaciones en *SCN5A* calificadas como causa probable de BrS^[176], entre las que se incluyen mutaciones *missense*, *nonsense*, inserciones/deleciones y mutaciones de *splicing*^[177]. Estudios funcionales de las mutaciones en *SCN5A* en BrS revelan que el mecanismo fisiopatológico viene dado por una pérdida de función del canal de sodio, lo que produce un gradiente de corrientes positivas de salida (por predominio relativo de las corrientes I_{to}) durante la fase 1 del PA. Ello da lugar a la dispersión de la repolarización transmural y epicárdica, base para la producción de arritmias ventriculares mediante un mecanismo de reentrada en fase 2^[177]. La pérdida de función puede ocurrir por la expresión reducida de canales Nav1.5 en el sarcolema, expresión de canales no funcionales o alteración de las propiedades cinéticas del canal^[176]. En casos de SADS/SUDI/SIDS también se han identificado mutaciones en algunos de los genes “minoritarios” de susceptibilidad a BrS.

La prevalencia del BrS se ha estimado en 1 en 2.000 personas, aunque puede estar subestimada por la existencia de formas silentes de la enfermedad^[178]. Los episodios de VF suelen ocurrir en periodos de descanso o durante las horas de sueño y se ha visto que afecta predominantemente a varones con una media de edad de 40 años, aproximadamente^[177]. De hecho, el anteriormente citado SUND (*sudden unexplained nocturnal death*) también conocido como *bangungot* en Filipinas, *pokkuri* en Japón o *lai tai* en Tailandia^[11], que afecta de forma endémica a varones jóvenes en el Sudeste asiático, actualmente es considerado desde el punto fenotípico, genético y funcional, como el mismo trastorno que BrS^[178].

Tabla 8. Bases genéticas y moleculares del síndrome de Brugada.

Gen	Cromosoma	Proteína	Alteración funcional	Corriente modificada
<i>SCN5A</i>	3p21-p24	Na _v 1.5	PdF	I _{Na}
<i>GPD1L</i>	3p22.3	glicerol-3-P-DH-1	PdF	I _{Na}
<i>SCN1B</i>	19q13.1	Na _v β1	PdF	I _{Na}
<i>SCN2B</i>	11q23.3	Na _v β2	PdF	I _{Na}
<i>SCN3B</i>	11q24.1	Na _v β3	PdF	I _{Na}
<i>SCN10A</i>	3p22.2	Na _v 1.8	PdF	I _{Na}
<i>SLMAP</i>	3p21.2-p14.3	proteína asoc. al sarcolema	PdF	I _{Na}
<i>RANGRF</i>	17p13.1	MOG1	PdF	I _{Na}
<i>KCNJ8</i>	12p12.1	K _v 6.1	GdF	I _{KATP}
<i>ABCC9</i>	12p12.1	SUR2	GdF	I _{KATP}
<i>HCN4</i>	15q24.1	HCN4	GdF	I _f
<i>KCNE3</i>	11q13-q14	MiRP2	GdF	I _{to, fast}
<i>KCND3</i>	1p13.2	K _v 4.3	GdF	I _{to}
<i>KCNE5</i>	Xq22.3	KCNE1-like	GdF	I _{to}
<i>CACNA1C</i>	2p13.3	Ca _v 1.2	PdF	I _{Ca, L}
<i>CACNAB2B</i>	10p12.33	Ca _v β2	PdF	I _{Ca, L}
<i>CACNA2D1</i>	7q21-q22	Ca _v α2δ1	PdF	I _{Ca, L}

Las mutaciones en los genes de susceptibilidad a síndrome de Brugada alteran la proteína codificada provocando, directa o indirectamente, un mecanismo de pérdida o ganancia de función de los canales responsables de sendas corrientes iónicas del potencial de acción cardíaco. PdF, pérdida de función; GdF, ganancia de función.

El estudio de familias afectadas por SADS sugiere que esta enfermedad es principalmente responsable de la muerte de adultos jóvenes, y no es tan común en niños^[179]; sin embargo, los primeros casos de BrS en niños, claramente descritos, fueron los de dos hermanos de 2 años y otra niña de 8 años entre finales de los años ochenta y principios de los noventa^[171] y, a día de hoy, debe ser considerada como una entidad importante en la infancia, ya que un diagnóstico erróneo puede traer consecuencias catastróficas. Además, la realización de autopsias moleculares dirigidas sugiere que el BrS puede jugar un papel potencial en el desencadenamiento de SIDS, tal y como

muestran varios trabajos. Un estudio en 292 casos de SIDS en los que secuenciaron las subunidades β de los canales de sodio identificó tres mutaciones *missense* raras que daban como resultado una marcada pérdida de función con reducción de I_{Na} ^[180]. Otro estudio en 228 casos demuestra que tres mutaciones en *GPDIL* alteraban el transporte del canal a la membrana celular y atenuaban significativamente la I_{Na} ^[181]. También se han reportado mutaciones causales en muchos casos individuales de SIDS y algunos supervivientes de un evento SIDS después de la reanimación cardiorrespiratoria^[19]. En 2007, un estudio en 30 niños de 26 familias (< 16 años) afectados por BrS, la fiebre representó el factor precipitante más común de eventos cardíacos arrítmicos, incluyendo síncope y MSC^[182].

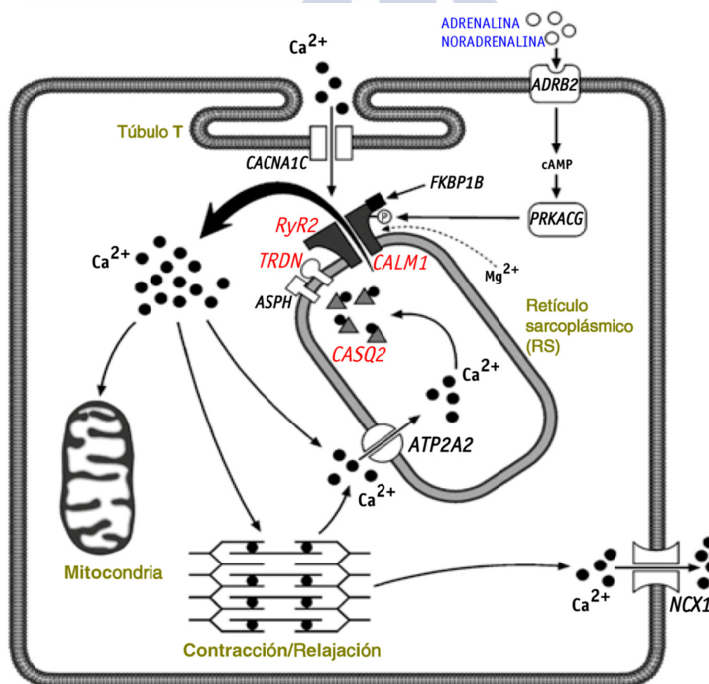
II.2.4.3. TAQUICARDIA VENTRICULAR POLIMÓRFICA CATECOLAMINÉRGICA.

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT, por sus siglas en inglés: *catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia*) es un trastorno arritmogénico hereditario que causa episodios sincopales asociados a estrés físico o emocional que puede desencadenar en MSC^[183]. El primer caso fue descrito en 1975 en una niña de seis años con un fenotipo de TV bidireccional precipitado por estrés emocional y esfuerzo físico, sin evidencia alguna de anomalía estructural del corazón^[184]. Posteriormente, en 1978^[185] y 1995^[186] se reportó una serie de casos pediátricos que presentaban formas esporádicas y familiares de esta arritmia y se introdujo el término “taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica” para referirse a una enfermedad caracterizada por TV polimórfica y/o bidireccional mediada por agonistas adrenérgicos (adrenalina y noradrenalina). El origen etiológico de la enfermedad se ha descrito como una fuga incontrolada de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico de los miocardiocitos durante la diástole^[187].

La CPVT está considerada como un trastorno muy maligno, incluso comparada con otros síndromes arrítmicos, ya que es penetrante en hasta el 80% de los pacientes menores de 40 años^[188] y tiene una tasa de mortalidad del 30-40% en torno a esa misma edad^[189]. A menudo, la MSC se manifiesta como primer y único síntoma de la enfermedad^[188]. La edad de aparición de los primeros síntomas está en torno a los 7-9 años^[186] y, antes de los 40, el 30% de los afectados ya tendrá una historia familiar de MSC^[148]. Por tanto, el paciente típico de CPVT es un adulto joven que se presenta en la consulta con una historia de episodios sincopales desde la infancia, sin anomalías cardíacas estructurales y con un ECG estándar normal, ya que no está caracterizada por poseer marcadores específico que puedan ser detectados en el ECG basal^[189]. El diagnóstico sólo puede llevarse a cabo con monitorización cardíaca durante pruebas de esfuerzo físico o situaciones de estrés emocional^[189]. Su prevalencia está estimada en, aproximadamente, 1:10.000 individuos^[19], aunque esta cifra podría ser una subestimación de la frecuencia real.

Existen dos patrones de herencia de la CPVT: el autosómico dominante está causado por mutaciones en el gen del receptor de la rianodina (*RYR2*) y el autosómico recesivo, que está causado por mutaciones en el gen de la calsecuestrina (*CASQ2*). El origen genético de esta enfermedad se describió por primera vez en 1999, cuando se identificó el *locus* de CPVT en el cromosoma 1q42-q43^[190]. Poco después, en 2001, el mismo grupo y otro más publicaron simultáneamente el descubrimiento de las primeras mutaciones en el gen *RYR2*^[145, 191]. En condiciones normales, el receptor de rianodina, que es un elemento clave en el acoplamiento del mecanismo de excitación-contracción, actúa en la primera parte de la fase 2 del PA liberando Ca^{2+} desde el retículo hacia el interior celular. Las mutaciones en *RYR2* asociadas a CPVT alteran la función de los receptores de rianodina^[187], de manera que durante la diástole, la probabilidad de que se produzca una apertura aberrante de los receptores aumenta, y el flujo de Ca^{2+} desde el retículo continuaría después del período refractario del PA desencadenando PPT y provocando arritmias cardiacas^[192] (Figura 12).

Figura 12. Mecanismo de regulación de la homeostasis del Ca^{2+} en los miocitos.



El Ca^{2+} entra en el miocito a través del canal $\text{Ca}_v1.2$ (*CACNA1C*) durante la fase 2 del potencial de acción. La estimulación por parte del sistema nervioso simpático mediante la liberación de

acetilcolina que, a su vez, libera adrenalina y noradrenalina; activa los receptores β -adrenérgicos (*ADRB2*) y éstos, sucesivamente, activan una proteína quinasa (*PRKACG*) dependiente de AMP cíclico (cAMP) que fosforila (activa) a los receptores de rianodina de tipo 2 (*RYR2*) provocando la liberación de más Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) hacia el citosol. La concentración de este ión aumenta, estimulando la contracción muscular. Este proceso se conoce como liberación de calcio inducida por calcio. Durante la diástole, la mayor parte de la reabsorción de Ca^{2+} hacia el RS se produce a través de la adenosín-trifosfatasa transportadora de Ca^{2+} de dicho orgánulo (*ATP2A2*) y, hacia el exterior de la célula, mediante la bomba de Na^+/Ca^{2+} (*NCX1*). Dentro del RS, la calsecuestrina (*CASQ2*) retiene el Ca^{2+} , de manera que cuando la concentración es baja, ésta inhibe la actividad de *RYR2* y viceversa. En rojo, genes de las proteínas que se han asociado a CPVT, incluyendo la triadina (*TRDN*) y la calmodulina (*CALM1*). *ASPH*, junctina; *FKBP1B*, calstabilina 2. Fuente: adaptación de Kontula et al. 2005^[193].

Después del descubrimiento de las mutaciones en *RYR2* en la forma autosómica dominante de CPVT se identificaron mutaciones en *CASQ2* en la forma autosómica recesiva, la cual supone solamente entre un 1-2% de los casos^[194]. *CASQ2* es el gen de la calsecuestrina 2, proteína crucial en la regulación del Ca^{2+} intracelular ya que constituye el mayor reservorio de este ion en el retículo sarcoplásmico y forma parte del complejo proteico que contiene el receptor de rianodina^[192]. Se ha demostrado que el mecanismo subyacente de la fisiopatología de CPVT asociada a mutaciones en este gen está relacionado con la alteración de la capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} de la calsecuestrina y con defectos en la regulación de la apertura de receptores de rianodina por parte de la calsecuestrina^[192]. Otros genes minoritarios implicados en CPVT son la triadina (*TRDN*)^[195] y la calmodulina (*CALM1*)^[196] (Tabla 9).

Tabla 9. Bases genéticas y moleculares de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica.

Gen	Cromosoma	Proteína	Alteración funcional	Herencia
<i>RYR2</i>	1q43	receptor de rianodina 2	Fuga de Ca^{2+} desde el RS	AD
<i>CASQ2</i>	1p13.1	calsecuestrina	Alteración de la capacidad de almacenamiento de Ca^{2+}	AR
<i>TRDN</i>	6q22.31	triadina	Alteración de la liberación de Ca^{2+} desde el RS	AR
<i>CALM1</i>	14q32.11	calmodulina	Interacción aberrante con <i>RYR2</i> y disminución de la unión de Ca^{2+}	AD

RS, retículo sarcoplásmico; AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva.

En un estudio de autopsia molecular de 134 casos de SIDS, se hallaron dos mutaciones noveles en *RYR2* con ganancia de función significativa demostrada, similar a la observada en casos de CPVT^[197]. Aunque CPVT se manifiesta en condiciones de estrés físico o emocional, se han reportado eventos arrítmicos durante periodos de sueño en individuos con mutaciones en este gen^[198]. En 1976, Schwartz y colaboradores propusieron como uno de los mecanismos subyacentes a SIDS la activación simpática durante la fase REM (de “*rapid eye movement*”) del sueño^[166], y dado que los lactantes pasan una gran proporción de sus horas de sueño en fase REM, esto podría tener implicaciones particularmente pertinentes en la relación entre CPVT y SUDI^[19].

II.2.4.4. SÍNDROME DE QT CORTO

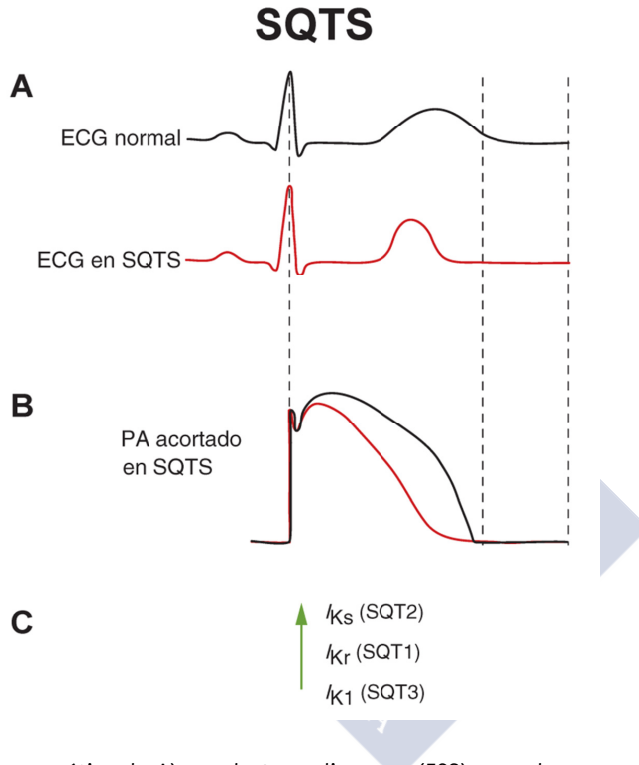
El síndrome de QT corto (SQTS, por sus siglas en inglés: *short QT syndrome*) es un trastorno arritmogénico hereditario muy raro y de diagnóstico complejo que se caracteriza por un intervalo QT corto en el ECG ($\leq 320\text{-}350$ ms), con una presentación clínica heterogénea con síntomas como fibrilación auricular paroxística, síncope y MSC que pueden aparecer a cualquier edad; y a nivel celular, por un acortamiento del PA^[189, 199] (Figura 13). El primer caso se describió en el año 2000 en una familia con tres miembros afectados y un paciente no emparentado con los mismos fenómenos electrocardiográficos^[200] y desde entonces, hasta la fecha se han publicado apenas 100 casos de SQTS^[201], por lo que este síndrome no está todavía bien definido y la información disponible sobre seguimiento de pacientes a largo plazo es escasa, lo cual convierte en todo un reto para los especialistas el diagnóstico certero de la enfermedad y la correcta estratificación del riesgo en pacientes, especialmente aquellos que tienen un intervalo QT límite^[199].

La prevalencia de esta enfermedad no está estimada con precisión, pero lo que sí está claro es que es muy inferior a la de LQTS o BrS. Según un reciente estudio en población general de California -población de gran diversidad étnica y socioeconómica- en la que se analizaron los ECG disponibles de una cohorte de 1,7 millones de pacientes de atención primaria recogidos entre 1995 y 2008, la prevalencia de intervalos QT acortados es de aproximadamente 1 en 37.000 individuos. Dado que no disponían de datos de genotipos, historias familiares o situaciones clínicas actuales, no pudieron establecer el diagnóstico de SQTS en aquellos pacientes con QTc ≤ 300 ms; pero aun así, la incidencia es extremadamente baja^[202] (a modo orientativo, la prevalencia de intervalos QT prolongados por cualquier causa que calcularon en su estudio es de 1 en 17 individuos, mientras que la prevalencia de LQTS está globalmente estimada en 1 en 2500 individuos^[153]).

La primera mutación descrita en SQTS fue la variante p.N588K en el gen *KCNH2*, identificada en dos familias con varios afectados y también varias muertes por MSC,

incluyendo una MSC recuperada en un lactante de 8 meses (portador de la mutación) y su hermano, que falleció con 3 meses de edad y fue clasificado como un caso de SIDS, lo cual podría establecer un vínculo entre ambas entidades.

Figura 13. Síndrome de QT corto.



Representación esquemática de A) un electrocardiograma (ECG) normal en negro y un ECG con patrón de síndrome de QT corto (SQTS) en rojo. B) Trazado del potencial de acción ventricular (PA) normal (en negro) y PA acortado (en rojo) en casos de SQTS. C) Perturbaciones en las corrientes iónicas que contribuyen a la patogénesis de SQTS. Las flechas verdes representan mutaciones que provocan ganancia de función. En la figura no aparecen representadas las corrientes de calcio alteradas por causa de mutaciones que provocan pérdida de función. Fuente: adaptación de Giudicessi & Ackerman, 2012^[137].

Se han reportado otros casos de SQTS en niños: en 2007 se describió un caso de un neonato de 3 semanas con episodios de apnea y un intervalo QT de 210 ms, que falleció durante la monitorización que se le realizaba de sus graves eventos cardiacos y fue catalogado como “SIDS con SQTS en la que la disfunción del SA jugó un papel

importante en la fisiopatología del síndrome^{203]}. Un mes antes se identificaba la primera mutación encontrada directamente en un caso de SIDS; esta vez en el gen *KCNQ1* ^[155]. Hasta la fecha se han descrito mutaciones asociadas a SQTs en seis genes que codifican canales iónicos implicados en la fase de repolarización del PA. Como se adelantaba al inicio del epígrafe, SQTs se caracteriza a nivel celular por un acortamiento del PA. Este acortamiento puede ser debido a mutaciones que confieren ganancia de función a los canales implicados en las corrientes de salida de iones durante la fase de repolarización del PA (por ejemplo, I_{Kr} , I_{Ks} e I_{K1}), o mutaciones que confieren pérdida de función a los canales implicados en las corrientes de entrada de iones durante la repolarización, en particular $I_{Ca,L}$ ^[204] (Tabla 10).

Tabla 10. Bases genéticas y moleculares del síndrome de QT corto.

Subtipo	Cromosoma	Gen	Proteína	Alteración funcional	Corriente modificada
SQT1	7q35-36	<i>KCNH2</i>	$K_v11.1$ (hERG)	GdF	I_{Kr}
SQT2	11p15.5	<i>KCNQ1</i>	$K_v7.1$	GdF	I_{Ks}
SQT3	17q23	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	GdF	I_{K1}
SQT4	12p13.3	<i>CACNA1C</i>	$Ca_v1.2$	PdF	$I_{Ca, L}$
SQT5	10p12.33	<i>CACNAB2B</i>	$Ca_v\beta2$	PdF	$I_{Ca, L}$
SQT6	7q21-q22	<i>CACNA2D1</i>	$Ca_v\alpha2\delta1$	PdF	$I_{Ca, L}$

Las mutaciones en los genes de susceptibilidad a síndrome de QT corto alteran la proteína codificada provocando, directa o indirectamente, un mecanismo de ganancia o pérdida de función de los canales responsables de sendas corrientes iónicas del potencial de acción cardíaco. GdF, ganancia de función; PdF, pérdida de función.

En la serie de pacientes más grande hasta ahora estudiada ($n = 29$) se analizó el genotipo de todos los casos esporádicos y familiares, pero sólo se halló una mutación en el gen *KCNH2* ^[205], lo cual confiere una idea de la gran heterogeneidad genética de la enfermedad y de la necesidad de continuar estudiando en profundidad los casos que aparezcan.

III. CORRELACIÓN GENOTIPO/FENOTIPO.

Uno de los conceptos firmemente mantenidos en genética molecular humana ha sido siempre el de que, si podemos entender en detalle las mutaciones genéticas específicas y su efecto en las proteínas que producen, seremos capaces de entender mejor la correlación entre genotipo y fenotipo. Y una de las promesas que derivan de este concepto es que esa base de conocimiento transformará la genética clínica en un modelo predictivo: conocer los alelos mutantes responsables de una enfermedad permitiría una predicción precisa de la prognosis y una mejor selección de la estrategia terapéutica a seguir en un paciente individual. A medida que se han ido identificando las mutaciones responsables de una serie de enfermedades, también se ha hecho más claro que la correlación entre genotipo y fenotipo no siempre es completa y, en efecto, para muchas enfermedades sólo un pequeño número de mutaciones predice el fenotipo de manera fiable^[206].

III.1. DETERMINANTES GENÉTICOS DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES MENDELIANAS CON RIESGO DE MUERTE SÚBITA.

Tradicionalmente, las enfermedades genéticas han sido categorizadas en monogénicas o poligénicas. En las monogénicas, el fenotipo observado puede ser explicado por variaciones en un único gen (en sucesivos epígrafes se hablará de la posible existencia de genes modificadores), y sus patrones de transmisión se pueden trazar más o menos fácilmente en las familias. Algunos ejemplos de enfermedades cardiovasculares monogénicas son las miocardiopatías estructurales, como HCM, DCM, ARVC; las enfermedades eléctricas primarias, como LQTS, BrS; y algunos trastornos sindrómicos con disfunción cardiovascular, como el síndrome de Marfan o el síndrome de Barth. Por el contrario, las enfermedades poligénicas son el resultado de la interacción de varios genes y además pueden estar moduladas por la influencia del ambiente; por ello reciben también el nombre de enfermedades genéticas complejas^[189]. Un ejemplo sería la cardiopatía isquémica.

Las enfermedades monogénicas se denominan comúnmente “mendelianas” por las características que comparten con los estudios que realizó Gregor Mendel con guisantes. Estas enfermedades son características por sus patrones de transmisión en familias. Los pedigrís familiares proporcionan una herramienta básica para la investigación genética y para la aplicación práctica de la genética en la clínica^[189]. Consisten en diagramas simples que muestran las relaciones de parentesco entre múltiples generaciones de una familia, ilustrando el número de miembros afectados, los patrones de herencia y el sexo de los individuos que transmiten la enfermedad. Los patrones de herencia de las enfermedades cardiovasculares son los que se describen en la Figura 14.

AUTOSÓMICO DOMINANTE:

El alelo silvestre heredado es recesivo frente al alelo mutado, que es el dominante. El término “dominante” se refiere a que con un solo alelo mutado, se puede desencadenar la enfermedad. Los genes afectados se encuentran en los cromosomas autosómicos y, con un solo progenitor afectado, se espera que el 50% de los hijos esté afectado y el otro 50% no. Se espera que haya individuos afectados en cada generación y que la enfermedad sea heredada y transmitida tanto por varones como por mujeres^[207]. Es el principal patrón de herencia observado en las enfermedades cardiovasculares con riesgo de MSC, entre las que se incluyen, por ejemplo, las formas más frecuentes de LQTS, el BrS, la HCM, etc.^[208].

AUTOSÓMICO RECESIVO:

Requiere que los dos alelos heredados sean defectuosos para que el hijo desarrolle la enfermedad. Las claves para reconocer el patrón son que la enfermedad aparece generalmente en la progenie de unos padres (portadores) no afectados y que los individuos de la progenie que se ven afectados pueden ser tanto varones como mujeres, ya que el gen se halla en un cromosoma autosómico. Bajo esta hipótesis, el 25% de los hijos estará afectado y el 50% será portador en heterocigosis y no desarrollará la enfermedad^[207]. Es un patrón menos común en las enfermedades cardiovasculares con riesgo de MSC que el autosómico dominante, pero existen algunas como la forma recesiva de LQTS, el síndrome de Jervell & Lange-Nielsen^[159] causado por la presencia de dos variantes patogénicas en *KCNQ1* o *KCNE1*, o la CPVT tipo 2 causada por variantes patogénicas en homocigosis en *CASQ2* o *TRDN*^[208].

HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X:

Las mutaciones en los genes localizados en el cromosoma X muestran un patrón de herencia ligado al sexo. Dado que los varones portan un solo cromosoma X, tienden a ser más susceptibles a las enfermedades ligadas al X que las mujeres, que tienen dos copias y por tanto, la oportunidad de protegerse de la expresión completa de la enfermedad si son heterocigotas para la mutación en cuestión^[207]. Un ejemplo que ya se ha mencionado anteriormente es el síndrome de Barth causado por mutaciones en el gen *TAZ*, o la distrofia muscular de Duchenne, causada por mutaciones en el gen *DMD*; ambos en el cromosoma X. Otro ejemplo es la enfermedad de Fabry, causada por mutaciones en el gen *GLA* que provocan una deficiencia en la actividad enzimática de la α -galactosidasa originando una disfunción en el metabolismo de los esfingolípidos. Aunque es una enfermedad hereditaria de almacenamiento lisosómico, uno de los síntomas más graves y que causa una alta morbilidad y mortalidad entre pacientes

afectados es la hipertrofia del ventrículo izquierdo, así como la presencia arritmias severas ya desde la infancia o la adolescencia^[208].

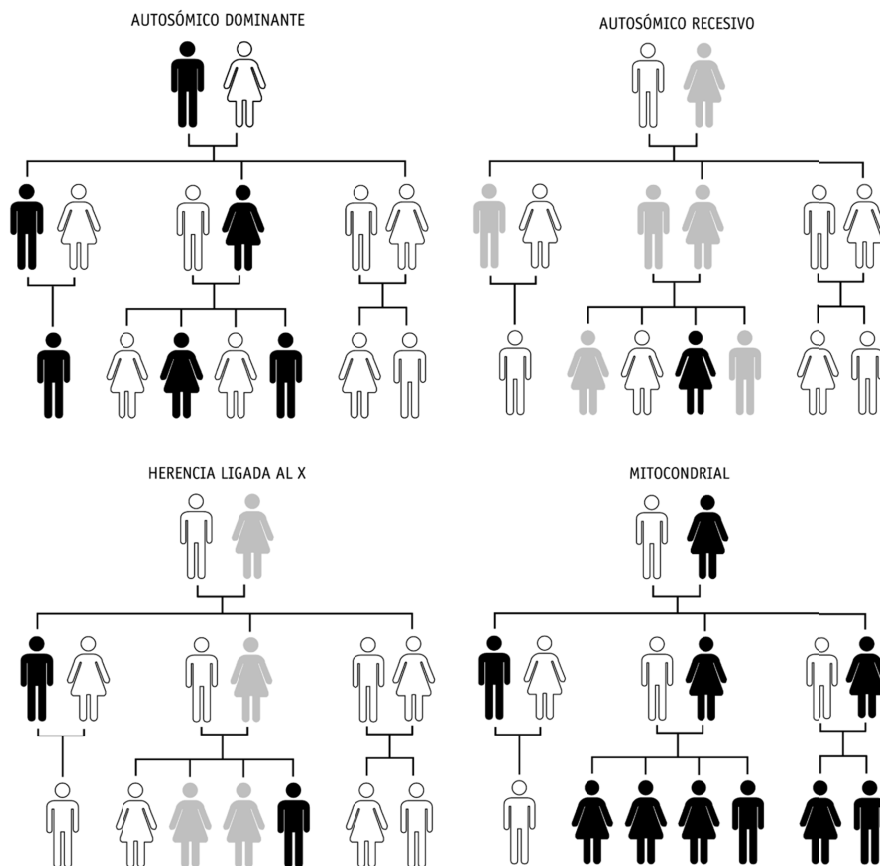
HERENCIA MITOCONDRIAL:

Es un patrón de herencia particular, ya que no responde a las leyes de herencia mendeliana debido a que el ADN mitocondrial no se encuentra en el núcleo celular y se hereda exclusivamente por vía materna^[209]. No obstante, cabe mencionarlo porque la mitocondria representa la principal fuente de energía de la célula gracias a las proteínas que participan en la cadena respiratoria. El genoma mitocondrial codifica 22 ARN mitocondrial de transferencia (ARNt-mt), 2 ARN mitocondrial ribosómico (ARNr-mt) y 13 polipéptidos; todos ellos componentes fundamentales del complejo enzimático del sistema OXPHOS (fosforilación oxidativa). El resto de las proteínas implicadas están codificadas por genes del genoma nuclear^[210]. Mutaciones en estos genes pueden traer consecuencias severas a aquellos órganos fuertemente dependientes de la producción de energía, como el cerebro, el músculo esquelético y el corazón^[211]. La frecuencia con la que aparece afectado el corazón en una enfermedad mitocondrial oscila entre el 17% y el 40% y la incidencia de miocardiopatías mitocondriales en población pediátrica está estimada en, al menos, 1 en 50.000 individuos^[212, 213]. La forma más típica en la que se manifiesta la enfermedad mitocondrial en el corazón suele ser HCM, pudiendo ser el único órgano afectado, incluso^[214]; además de trastornos arritmogénicos, RCM y enfermedades del sistema de conducción^[210, 215]. Sin embargo, son más frecuentes las formas sindrómicas, como el síndrome de MELAS (encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular), causada en un 80% de los casos por la mutación m.3243A>G en el gen *MT-TL1* que codifica el ARNt-mt de la leucina^[208]; con el cual, los pacientes sufren miocardiopatías además de otros síntomas como diabetes mellitus, oftalmoplejia externa progresiva o sordera^[216]. Además de esta mutación, se han reportado más de 250 mutaciones en el ADNmt, muchas asociadas a enfermedades del corazón^[210].

III.1.1. PENETRANCIA INCOMPLETA Y EXPRESIVIDAD VARIABLE.

Uno de los viejos enigmas de la genética humana es que no todos los individuos que porten una o varias mutaciones patológicas acabarán desarrollando la enfermedad en cuestión. Esto es debido a que los términos dominancia y recesividad no son términos absolutos. La proporción de individuos portadores de una mutación patogénica particular o un genotipo determinado y manifiestan señales clínicas de la enfermedad asociada en un periodo de tiempo específico y claramente definido se denomina *penetrancia* de esa enfermedad^[217]. Si la proporción de individuos es del 100%, se dice que la enfermedad o el genotipo de la enfermedad muestran *penetrancia completa*.

Figura 14. Patrones de herencia de las enfermedades monogénicas.



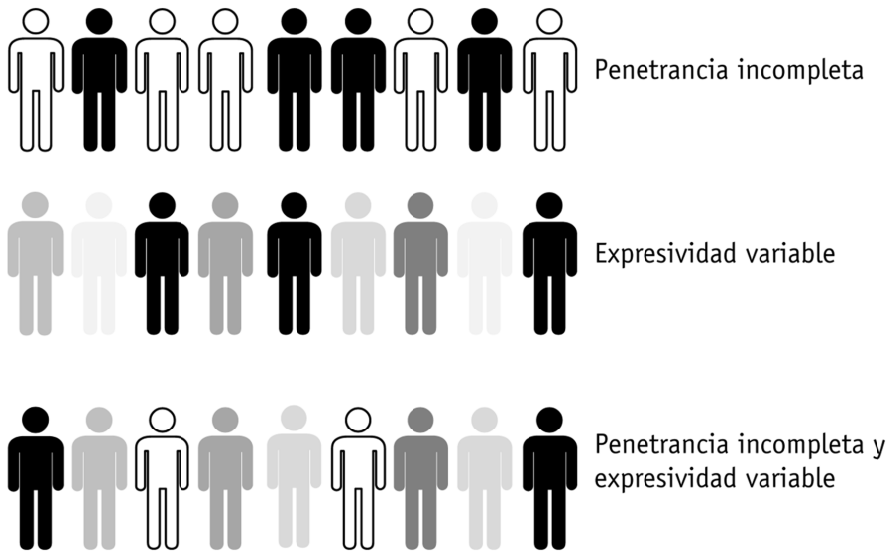
Representación ideal de los patrones de herencia de las enfermedades cardiovasculares monogénicas. En negro, individuos afectados por la enfermedad; gris, individuos no afectados pero portadores del genotipo responsable de la enfermedad; y blanco, individuos sanos.

Si la proporción es inferior al 100%, se dice que muestran *penetrancia incompleta* o *reducida*. La penetrancia incompleta es, probablemente, consecuencia de la combinación de varios factores genéticos y ambientales. Es más evidente en trastornos que siguen una herencia autosómica dominante. En estos casos, la penetrancia incompleta es más bien propia de una mutación subyacente que de un genotipo. Sin embargo, también puede ocurrir en trastornos con herencia autosómica recesiva, donde una única mutación puede provocar diferentes efectos fenotípicos. Independientemente del patrón de herencia, en la mayoría de los casos la penetrancia incompleta es debida a la función de la/s

mutación/es implicadas. Por tanto, en algunos rasgos caracterizados normalmente por un patrón de herencia autosómico dominante, dos alelos no-penetrantes (incompletamente penetrantes) pueden actuar de manera recesiva imitando la forma dominante normal de la enfermedad^[218, 219]. Algo típico en las enfermedades autosómicas dominantes con penetrancia incompleta es que el fenotipo clínico puede no ser evidente en una generación y aun así ser transmitido a subsiguientes generaciones donde puede volver a manifestarse^[217].

La penetrancia incompleta debe diferenciarse de otro concepto; el de *expresividad variable*, que se refiere al grado de variación clínica en el fenotipo que presentan los individuos con un genotipo determinado^[217], es decir, el grado de expresión de un alelo a nivel fenotípico, probablemente causado por otros factores genéticos y ambientales, igual que ocurre con la penetrancia incompleta^[207] (Figura 15).

Figura 15. Penetrancia incompleta y expresividad variable.



Representación de los conceptos de penetrancia incompleta y expresividad variable para un supuesto alelo dominante “C” que determinaría el “color negro”. Todos los individuos son portadores del alelo. En la fila superior, los individuos en negro expresan el alelo, mientras que los blancos no lo expresan (penetrancia incompleta). En la fila intermedia, los individuos en negro expresan completamente el fenotipo, mientras que las distintas tonalidades de gris indican diversos grados de expresión del fenotipo. En la fila de abajo, se muestran ambos fenómenos simultáneamente.

Los fenómenos de penetrancia incompleta y expresividad variable pueden hacer que cualquier análisis genético sea sustancialmente más complicado, incluyendo el estudio de pedigrís humanos y las predicciones en el consejo genético^[207]. Por ejemplo, si un alelo no es completamente penetrante, un individuo puede ser portador del alelo y no mostrar ninguna señal de enfermedad. Si ese es el caso, es difícil otorgarle la consideración de “sano” desde el punto de vista genético a cualquier persona en su pedigrí, ya que el fenotipo puede ser dependiente de la edad o el sexo del individuo para ser completamente penetrante, como ocurre con la HCM^[220]. Por otra parte, el análisis de pedigrís puede identificar a portadores obligados que están en riesgo de generar descendencia afectada por una enfermedad, como ocurre con el LQTS familiar^[221]. Del mismo modo, la expresividad variable puede complicar el consejo genético porque individuos con un bajo nivel de expresión de la enfermedad pueden quedar fuera del diagnóstico clínico y exponerse a un aumento del riesgo de sufrir un episodio de MSC.

Un último concepto importante a la hora de estudiar pedigrís en enfermedades humanas es que se debe tener en mente que no todos los casos de individuos enfermos en una única familia tienen que ser debidos a una causa genética. Los casos no genéticos que se mimetizan con una enfermedad genética se denominan *fenocopias* y esto puede suponer un grave problema, especialmente en trastornos homólogos a ciertos trastornos genéticos que ocurren de forma habitual por influencia del ambiente como podría ser, por ejemplo, la hipertrofia del ventrículo izquierdo asociada a hipertensión no tratada, en una familia con HCM causada por una mutación sarcomérica^[222]; la prolongación del intervalo QT secundaria a otras condiciones patológicas como miocardiopatías estructurales subyacentes, alteraciones electrolíticas o hemorragia subaracnoidea^[223]; o la sarcoidosis cardiaca, una enfermedad de etiología desconocida que puede llegar a confundirse con la ARVC en ausencia de evidencia de sarcoidosis sistémica, en pacientes que experimentan arritmias y MSC^[224].

III.1.2. SOLAPAMIENTO DE FENOTIPOS.

Aparte de los conceptos previamente definidos, existe una complicación añadida en cuanto a la correlación genotipo/fenotipo a la hora de establecer un diagnóstico y reside en la propia naturaleza de algunas enfermedades cuyo diagnóstico certero depende en cierta medida de la precisión de la instrumentación más allá del buen ojo clínico del especialista. Esto ocurre de manera especial con las canalopatías cardíacas, que como se adelantaba anteriormente, son un grupo heterogéneo de enfermedades, clínica y genéticamente. Sus características electrocardiográficas son muy diferentes y altamente específicas, pero algunas de sus expresiones clínicas son, a menudo, similares^[225]; por ejemplo, el síncope inducido por la práctica de ejercicio con una arritmia ventricular subyacente puede cesar espontáneamente o llegar a ser potencialmente letal, y muchas

veces es diagnosticado erróneamente como ataques o epilepsia, y al paciente se le asigna un tratamiento con medicamentos antiepilépticos antes de obtener un diagnóstico apropiado. Los síntomas pueden ocurrir a cualquier edad, y se ha llegado a describir muerte fetal prenatal^[226].

La idea de que distintos fenotipos puedan ser explicados por mutaciones específicas en los genes de los canales iónicos fue cuestionada por primera vez en 1999 en un estudio de individuos que portaban la mutación p.insD1795 en el gen *SCN5A* y que desarrollaban alteraciones en el ECG compatibles tanto LQTS como con BrS, e incluso un mismo individuo podía llegar a desarrollar ambos fenotipos^[227]. Otros estudios reportaron la presencia de síntomas de defectos del sistema de conducción^[228]. Esto llevó a los investigadores a proponer una nueva entidad conocida como el síndrome de solapamiento del *SCN5A* para diagnosticar a aquellos individuos que presentaba signos de LQTS, BrS, conducción lenta, síndrome del nódulo (sinusal) enfermo o fibrilación auricular separada o simultáneamente^[229].

En trastornos estructurales también se da este fenómeno de solapamiento. Aunque HCM, DCM y ARVC están bien reconocidas como entidades clínicas distintas, poco a poco las comunidades científica y médica se están dando cuenta de que existe un considerable solapamiento genético y fenotípico entre ellas. Por ejemplo, en los estadios finales de HCM y DCM existe un solapamiento de fenotipos^[230], así como entre DCM y ARVC, ya que esta última puede manifestarse en forma de dilatación ventricular afectando también al ventrículo izquierdo^[96]. Además, algunas características de LVNC pueden solaparse con las de HCM, DCM y RCM^[231].

Un caso particular de solapamiento de fenotipos es el que atañe a las muertes por SIDS. Este síndrome es un diagnóstico por exclusión de cualquier signo evidente macro o microscópicamente, así como en análisis microbiológicos y toxicológicos, de una causa de muerte definida^[29]. La MSC es una causa frecuente de muerte en adultos jóvenes, así como lo es SIDS en lactantes menores de un año y, a menudo, en ambas situaciones la muerte se presenta como primer y único síntoma. Sin embargo, debe tenerse muy en cuenta que no todas las muertes súbitas infantiles inesperadas o inexplicables -las SUDI-, cumplen los requisitos para ser diagnosticadas como SIDS. En casos de sospecha, o de diagnóstico prematuro de SIDS (cuando el diagnóstico debería ser, *a priori*, SUDI) puede resultar difícil identificar una miocardiopatía estructural primaria o adquirida, como LVNC, hipertrofia por miocarditis o por una mutación genética en un gen de una proteína sarcomérica^[232]; pero la correcta realización de análisis histológicos, inmunohistoquímicos y genéticos puede ayudar al correcto diagnóstico y así proporcionar un mejor consejo genético a las familias, de ser el caso, o tratamiento al paciente si la muerte súbita es recuperada o hay otros miembros de la familia afectados^[233].

III.1.3. MODIFICADORES GENÉTICOS Y PLEIOTROPIA.

En las enfermedades denominadas monogénicas un gen es el responsable fundamental de la patogénesis, con uno o más modificadores genéticos heredados independientemente que influyen en el fenotipo mientras que, en las enfermedades complejas, la primacía de un gen individual no es perceptible y la patogénesis es debida, probablemente, a la interacción de dos o más genes heredados independientemente y a la posible influencia sobre éstos de otros genes modificadores adicionales. La consecuencia de este marco conceptual es que al final, la idea de “enfermedad monogénica” no siempre existe como tal, y en ocasiones el límite entre enfermedad monogénica y enfermedad compleja o poligénica representa un continuo desde la disminución de la influencia de un gen primario influenciado por otros genes, hasta el aumento de influencia compartido por múltiples genes^[234]. El solapamiento de fenotipos en estas enfermedades está directamente relacionado, además de con factores ambientales, con la presencia de mutaciones en genes que tienen efectos pleiotrópicos en varias rutas y, en mayor o menor medida, con el número de alelos afectados en uno o varios genes distintos, ya que se ha demostrado que la presencia de más de un alelo mutado en estos genes se asocia a fenotipos más severos; y es en estas fases más graves de la enfermedad (etapas terminales) donde el solapamiento de fenotipos se hace más evidente.

MODIFICADORES GENÉTICOS:

En las miocardiopatías estructurales y arritmogénicas, existen factores genéticos adicionales que pueden contribuir a la variabilidad clínica de una enfermedad, como el sexo del individuo, la edad, la frecuencia cardíaca y el consumo de medicamentos. La ocurrencia de mutaciones compuestas (encontrar $n > 1$ mutaciones en $n \geq 1$ genes es algo que puede ocurrir en hasta el 9% de los pacientes con LQTS) y la localización y tipo de mutación en la proteína resultante pueden explicar la severidad en algunos casos (ver Marsman *et al.* 2014, para una revisión completa^[235]). Sin embargo, la identificación de esos factores genéticos adicionales, conocidos como *modificadores genéticos*, es de un interés considerable y sin duda ayudará a la estratificación del riesgo. Aunque a día de hoy las enfermedades cardiovasculares con riesgo de MSC se consideran trastornos monogénicos causados por la herencia de una variante de efecto grande, penetrante o casi penetrante, la realidad es que esto es muy poco frecuente en la población general. Además de la gran variabilidad en la expresión de la enfermedad, otras observaciones como la ocurrencia de casos esporádicos o la imposibilidad de detectar nuevos genes asociados a enfermedad mediante análisis de ligamiento, sugieren un modelo de herencia oligogénico para, al menos, algunas de estas enfermedades raras. Ese modelo implicaría la herencia de múltiples variantes, posiblemente con diferentes grados de efecto, en diferentes genes^[235] (Figura 16A).

En el caso de las miocardiopatías arritmogénicas, los modificadores genéticos más evidentes de las manifestaciones electrocardiográficas son los polimorfismos de un único nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés: *single nucleotide polymorphism*) que han sido identificadas en estudios de asociación de genoma completo en la población general (GWAS, por sus siglas en inglés: *genome-wide association study*)^[235]. Por ejemplo, recientemente se han identificado por GWAS varios SNPs en 22 nuevos loci susceptibles de modificar la duración del intervalo QT^[236]. En la búsqueda de modificadores genéticos que confieren riesgo de BrS, en un estudio reciente se han hallado tres SNPs independientes en el *locus* de *SCN5A/SCN10A* y en el *locus* de *HEY2*^[237]. Cabe destacar que en el estudio encontraron que el riesgo de enfermedad aumentaba consistentemente con el número de alelos de riesgo portados en estos *loci*, con una *odds ratio* estimada de 21,5 con más de cuatro alelos de riesgo en comparación con menos de dos, aunque se requiere una validación de estos resultados en series independientes de pacientes de BrS^[237]. Estos resultados sugieren, por tanto, que la arquitectura genética de algunas enfermedades raras podría ser diferente de lo hasta ahora sugerido. Además, las asociaciones en el *locus* *SCN5A/SCN10A* demuestran que los SNPs previamente asociados con la alteración de la conducción cardiaca en estudios GWAS basados en índices ECG también pueden influir en la susceptibilidad a desarrollar una miocardiopatía arritmogénica rara^[235]. Desde el punto de vista mecánico, dado que *HEY2* codifica un represor transcripcional, la alteración de la programación transcripcional durante el desarrollo cardiaco podría contribuir también al BrS^[238]. Esta hipótesis recibe el apoyo de un estudio en ratones que demuestra que *HEY2* regula la expresión génica de los canales iónicos cardiacos y la actividad eléctrica^[237].

Se ha encontrado evidencia también de la posibilidad de que las miocardiopatías estructurales sigan un modelo de herencia oligogénico. En HCM, se ha encontrado correlación entre la presencia de $n > 1$ alelos mutados en los genes *MYH7* y *MYBPC3* (bien fuese en ambos genes, bien en forma de heterocigosis compuesta en un mismo gen, e incluso homocigotos para una misma mutación) y fenotipos más severos de la enfermedad en lo que respecta a la edad de aparición de la hipertrofia, el propio grado de la hipertrofia o la prognosis^[239]. Se han descrito variantes en homocigosis en el gen la troponina C (*TNNC1*) en dos familias grandes con HCM que presentaban una hipertrofia biventricular significativa y una alta incidencia de MSC^[240, 241]. Los estudios sugieren que hasta el 5% de las familias porta dos mutaciones distintas en genes asociados a la enfermedad^[242, 243]. Los pacientes con mutaciones en homocigosis, dobles heterocigotos o mutaciones en heterocigosis compuesta presentan generalmente un fenotipo más severo de hipertrofia y una incidencia más alta de MSC, incluyendo MSC recuperadas en sus familias que los pacientes con mutaciones individuales. De manera colectiva, se les diagnostica a una edad más temprana, coincidiendo con la aparición de la hipertrofia del ventrículo izquierdo durante la infancia^[244].

PLEIOTROPÍA.

A medida que se va elucidando la etiología genética de los trastornos arritmogénicos y estructurales, se va encontrando que el solapamiento existe también a nivel genético. La razón por la que una misma mutación puede resultar en toda una variedad de fenotipos (*pleiotropía*) aún no es del todo comprendida, pero en el caso concreto de los trastornos arritmogénicos -volviendo al ejemplo de las mutaciones en *SCN5A*- y la variedad de fenotipos a que dan lugar, este fenómeno podría tener que ver con los diferentes papeles que juegan los canales de sodio cardíacos bajo diferentes condiciones fisiológicas y en diferentes regiones del corazón^[225]. La expresión genética en distintos tejidos del organismo, la participación en grandes complejos multiproteicos y la implicación en rutas similares probablemente aumenten las manifestaciones clínicas, e inevitablemente conduzcan al solapamiento fenotípico (Figura 16B). También podría tener que ver el hecho de que muchos de los genes asociados a canalopatías (como *RYR2*, *KCNJ2*, *KCNJ5*, *CACNA1C*, *CACNA2B*, *ANK2*, etc.) también intervienen en trastornos neurológicos y neuromusculares^[225]. Se sabe hoy en día que mutaciones en genes de canales iónicos están ligados a enfermedades estructurales del corazón y trastornos neuromusculares y endocrinos, y raras veces resultan en fenotipos clínicos individuales como LQTS o BrS^[225, 245].

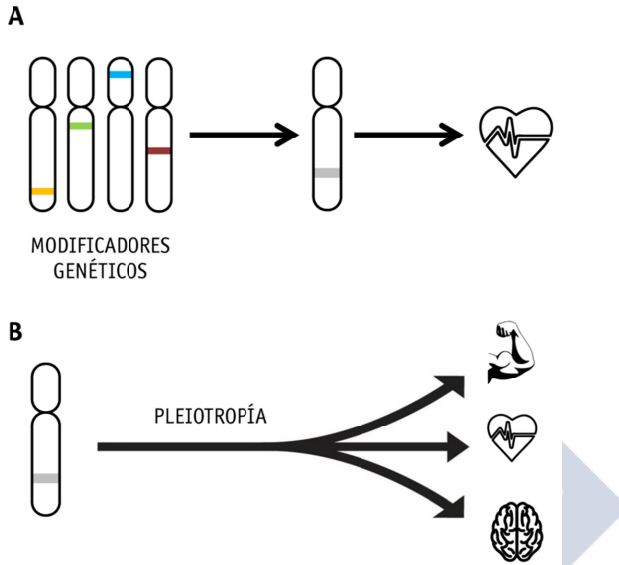
El fenómeno de la pleiotropía también se ha observado extensamente en los trastornos estructurales, en cuanto que, por un lado, mutaciones sarcoméricas que se identificaron inicialmente en pacientes de HCM se han encontrado también en pacientes de DCM, LVNC y RCM; por otro lado, mutaciones en los genes del disco Z identificadas en pacientes de DCM también aparecen en pacientes de HCM^[246]; y por último, mutaciones en los genes de las proteínas del desmosoma que están universalmente asociadas a ARVC también parece que también podrían causar DCM^[247].

III.2. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN MUERTE SÚBITA CARDIACA Y MUERTE SÚBITA INFANTIL INESPERADA O INEXPLICADA.

El diagnóstico de una muerte súbita inesperada o inexplicada en adultos o niños recae en la realización de una autopsia completa y de estudios toxicológicos, microbiológicos, etc. e, incluso, de un examen histopatológico detallado del corazón para excluir causas claras de MSC^[248]. Durante estos exámenes puede identificarse una enfermedad genética cardíaca estructural, como la HCM, que indicaría la necesidad de evaluar a los familiares vivos más cercanos y a conservar una muestra de sangre o tejido apta para la extracción de ADN con el fin de realizar un estudio genético dirigido^[5]. En algunos casos, los hallazgos patológicos pueden resultar equívocos a la hora de determinar una causa de muerte definitiva, como por ejemplo el hallazgo de hipertrofia ventricular pero no desorganización de los miocitos; válvula aórtica bicúspide o anomalías en las arterias

coronarias pero sin presencia de isquemia, etc.^[5]. En estos casos, la recogida de cualquier información clínica *ante-mortem* puede dejar pistas sobre la causa, aunque un ECG normal, por ejemplo, no puede excluir una patología genética subyacente, especialmente cuando se trata de BrS si éste ya ha sido diagnosticado previamente en la familia^[179].

Figura 16. Modificadores genéticos y pleiotropía.



El solapamiento de fenotipos en las enfermedades cardiovasculares está relacionado, generalmente, con el número de alelos afectados en uno o varios genes distintos (A) y con la presencia de mutaciones en genes que tienen efectos pleiotrópicos en varias rutas y pueden afectar incluso a varios órganos diferentes.

La recogida de muestras de ADN para realizar la autopsia molecular puede conducir al diagnóstico de este síndrome en hasta un 35% de los casos^[249]. Este procedimiento podría resultar de gran ayuda en los casos de SUDI, ya que el análisis genético *post-mortem* revela la presencia de mutaciones en genes asociados a canalopatías en el 10-15% de los casos de SIDS^[249]. El consejo internacional de expertos de la *Heart Rhythm Society* y la *European Heart Rhythm Association* para la realización de análisis genéticos en miocardiopatías y canalopatías recomienda la recogida de una muestra biológica, que puede consistir en un tubo de EDTA con 5-10 mL de sangre total, o bien una muestra congelada de tejido fresco de corazón, bazo o hígado, o bien una muestra de sangre en

una tarjeta FTA™, Whatman® para la posterior extracción de ácidos nucleicos con el máximo rendimiento posible con el fin de realizar una autopsia molecular de calidad^[249].

III.2.1. PAPEL EN LA ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO Y PREVENCIÓN DE LA MUERTE SÚBITA CARDIACA Y LA MUERTE SÚBITA INFANTIL.

Cuando se realiza la evaluación cardiológica de los familiares de primer grado de las víctimas de MSC prematura a las que no se les ha practicado autopsia por cualquier motivo, las principales patologías que se les acaba diagnosticando son las miocardiopatías estructurales en general y la hipercolesterolemia familiar^[250, 251]. Cuando esta evaluación se realiza a los familiares de las víctimas de SADS (autopsia y exámenes negativos), en la mitad de las familias se acaba diagnosticando un trastorno arritmogénico como LQTS, BrS o CPVT, principalmente; y de manera ocasional, se hallan formas sutiles, a veces casi imperceptibles, de miocardiopatías estructurales; en particular ARVC^[250, 251]. Si la causa de la muerte permanece sin identificar, el grupo de expertos de la *Heart Rhythm Society*, la *European Heart Rhythm Association* y la *Asia Pacific Heart Rhythm Society*, recomienda la realización de una autopsia molecular a todas las víctimas de SUDS, y a todos los familiares de primer grado cuando la autopsia molecular es positiva para mutaciones patogénicas en genes asociados con aumento del riesgo de MSC^[5, 249].

En los familiares de casos de SUDI y SIDS, generalmente se lleva a cabo una investigación *ad hoc*, aunque existen muy pocos datos acerca de la fructificación que genera. Los expertos recomiendan la realización de la autopsia molecular a todas las víctimas de SUDI, así como la evaluación por patólogos cardiacos expertos que puedan descartar cualquier enfermedad estructural tenue a nivel microscópico, de otro modo inapreciable macroscópicamente. El 10-15% de autopsias moleculares con resultado positivo para canalopatías que se alcanza en SIDS es mucho inferior al porcentaje de casos positivos que se ha descrito en víctimas de SUDS, por lo que existe una alta probabilidad de que la causa de muerte en buena parte de los casos de SIDS y SUDI sea otra enfermedad genética esporádica y, por tanto, se espera que el rendimiento de la evaluación clínica en familiares de primer grado sea significativamente inferior que en adultos^[5, 249]. No obstante, si el resultado de la autopsia molecular es positivo o existen antecedentes de SUDI, SUDS, o enfermedad cardiaca hereditaria, entonces el rendimiento probablemente será mayor y la evaluación de familiares, incluido el análisis genético (recomendado), valdrá más la pena^[5, 249].

Tanto en familias de SUDS como de SUDI, la evaluación de los familiares debería comenzar por aquellos que son portadores obligatorios de mutaciones patogénicas o tienen síntomas adversos tales como síncope cardiaco. Los familiares más jóvenes podrían requerir reevaluaciones periódicas incluso si la evaluación inicial es normal, ya

que ciertas enfermedades pueden presentar los primeros síntomas a edades más avanzadas y otras se vuelven penetrantes con la edad. Todas las evaluaciones se deben repetir en caso de que algún miembro desarrolle síntomas repentinamente o se identifiquen casos sospechosos de MSC en la familia^[5].

III.2.2. CONSEJO GENÉTICO.

El conocimiento sobre las enfermedades cardiovasculares con riesgo de MSC que ha emergido durante las últimas décadas ha tenido un impacto directo tanto en los pacientes de estas enfermedades como en los familiares que están en riesgo directo de padecerlas^[252]. Junto con el avance de las tecnologías genómicas, el resultado ha sido un inmenso aumento de las necesidades de los pacientes, desde información y educación hasta la provisión de redes de apoyo, además de tener que lidiar cada día con los asuntos psicosociales presentes en las familias. Como resultado, el consejero genético cardiaco ha surgido como un miembro clave del equipo multidisciplinar implicado en el seguimiento de estas familias con enfermedades cardíacas^[252].

El consejo genético es un proceso destinado a la asistencia al paciente y a su familia para comprender y adaptarse a las condiciones médicas, psicosociales y familiares que implica el padecimiento de una enfermedad genética^[253].

En la práctica clínica general, el consejo genético ha demostrado que es capaz de promover el bienestar psicológico de los individuos a través de la información y el apoyo emocional. Aún existen pocos datos específicos de los resultados que genera el consejo genético en pacientes (adultos y niños) y familiares con enfermedades genéticas cardíacas, pero los estudios más recientes son alentadores y muestran un alto porcentaje de satisfacción entre los individuos asesorados^[254-256].

Hasta la fecha se han identificado más de 40 enfermedades cardiovasculares con causa genética, incluidas todas las aquí descritas. Aunque las miocardiopatías estructurales y las arritmogénicas sean trastornos muy diferentes, en lo que concierne al consejo genético, el manejo puede ser muy similar^[257]. La mayoría de ellas son de herencia autosómica dominante (los familiares de primer grado tienen un 50% de posibilidades de heredar el alelo mutado), muestran penetrancia incompleta, expresividad variable y todas las complicaciones derivadas de los resultados de los análisis genéticos y su interpretación; y además requieren seguimiento clínico de los familiares en riesgo. El incidente común más notable de las enfermedades genéticas cardíacas es la MSC y cada aspecto de este evento devastador define la naturaleza del papel fundamental que juega el consejero genético: la conducción del estudio genético, particularmente en la predicción del riesgo en familiares, que además de ser importante para el correcto seguimiento de los pacientes y sus familias, ha demostrado ser una herramienta rentable en el diagnóstico y

tratamiento de enfermedades genéticas cardiacas como la HCM para la prevención primaria de MSC^[258].

La opción del análisis genético, por tanto, abarca todas las etapas de la vida, desde el embrión preimplantado o el feto, hasta niños y adultos. El consejo genético pre y post-análisis genético es un componente fundamental del análisis genético^[252]. Aparte de la utilidad que tiene en el diagnóstico en familias, un resultado específico en un gen podría redirigir la terapia y proveer información sobre la prognosis, por ejemplo en LQTS familiar. Hasta un 75% de los casos de LQTS está causado por mutaciones en 3 genes, *KCNQ1* (30-35%), *KCNH2* (25-30%) y *SCN5A* (5-10%)^[164]. Se ha observado una significativa correlación entre el genotipo y el fenotipo desarrollado por mutaciones en estos genes. Por ejemplo, el desencadenante del LQTS tipo 1 (LQT1) está asociado a la práctica de ejercicio, especialmente la natación; el LQTS2 está asociado a desencadenantes auditivos o emocionales, como sustos o momentos críticos del período postparto, y el LQT3 parece ocurrir más en períodos de descanso o durante las horas de sueño^[259]. Por tanto, en base a los resultados de un test genético positivo para uno de estos genes, podría advertirse al paciente y sus familiares del riesgo asociado en cada caso y prevenir futuros eventos mediante el cese o moderación de determinadas actividades físicas o prestando especial atención a la realización de ciertas prácticas, sobre todo entre pacientes jóvenes y niños, que suelen tener una percepción menor del riesgo.

Sin embargo, el análisis genético también tiene limitaciones, ya que la interpretación no siempre es fácil y cada vez es más necesario recurrir a investigaciones en la familia, ensayos funcionales y herramientas bioinformáticas de predicción para determinar la patogenicidad de las variantes halladas^[252]. El consejero genético debe, por tanto, hacer un descargo de responsabilidad ante las limitaciones actuales que existen en cuanto a la comprensión de los resultados del análisis genético que se van a reportar, así como la posibilidad de que estén presentes segundas o terceras mutaciones desconocidas hasta el momento o no sometidas a prueba; y además, debe ser capaz de transmitir esta información a la familia para que puedan tomar las pertinentes decisiones antes del análisis genético^[252].





JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La muerte súbita e inesperada de un niño es un evento trágico en las vidas de las familias y de su entorno más cercano que conlleva un trauma psicológico profundo; generalmente peor cuando la causa de ésta no puede ser explicada. Según las hipótesis más aceptadas actualmente, en los niños menores de un año estos eventos son fruto de la interacción de ciertos factores extrínsecos e intrínsecos; siendo la predisposición genética a determinadas canalopatías cardíacas uno de los principales objetos de investigación de entre los factores intrínsecos identificados. En la población joven, las canalopatías son, junto con las miocardiopatías estructurales hereditarias, las principales responsables de las muertes súbitas de origen cardíaco; y sorprende el hecho de que casi la mitad de los casos no ha recibido un diagnóstico patológico previamente, ni ha presentado síntoma alguno de enfermedad. Normalmente, el examen *post-mortem* acaba revelando la presencia de una anomalía estructural (miocardiopatía hipertrófica, dilatada, arritmogénica...) pero en una proporción significativa de casos, el corazón aparece estructuralmente normal y la autopsia tiene resultado negativo. Esto es particularmente frecuente en la población pediátrica y, especialmente, en los menores de un año, para los que se ha establecido la categoría de “muerte súbita infantil inesperada o inexplicada”, con una subcategoría más estricta desde el punto de vista forense y circunstancial denominada “síndrome de muerte súbita del lactante” para clasificar aquellos casos en los que mediante diagnóstico de exclusión no se puede llegar a determinar una causa probable de muerte. Actualmente, la muerte súbita infantil inesperada o inexplicada constituye la principal causa de muerte de esta subpoblación en países desarrollados.

Las bases genéticas y moleculares de las canalopatías y las miocardiopatías son complejas y, aún hoy en día, no del todo bien conocidas. Este hecho es, quizás, el culpable de que tan sólo una proporción del 10-15% de casos de muerte súbita infantil haya podido ser explicada por la presencia de variantes genéticas asociadas a canalopatías. Sin embargo, el papel que puedan jugar otras patologías, como las miocardiopatías estructurales en sus formas más incipientes (es decir, en ausencia de

fenotipo estructural) ha sido hasta ahora prácticamente inexplorado. Teniendo en cuenta que, en general, las principales miocardiopatías hereditarias tienen tasas de incidencia mucho más altas que las canalopatías en la población adulta, parece plausible que puedan ser responsables de, al menos, una proporción de los casos de muerte súbita infantil, por pequeña que ésta sea; sobre todo cuando estudios recientes destacan la capacidad de algunas variantes genéticas asociadas a estas patologías, para producir alteraciones funcionales en ausencia de fenotipo estructural.

Por ello, en esta tesis nos hemos marcado tres objetivos principales y varios objetivos secundarios, a saber:

1.) Demostrar la existencia de un componente genético de predisposición a muerte súbita cardíaca como factor intrínseco subyacente a la muerte súbita infantil inexplicada.

2.) Determinar si dicho componente genético tiene una relación directa con las bases genéticas y moleculares de las patologías cardiovasculares con riesgo de muerte súbita cardíaca en el adulto.

2.1) Confirmar la implicación de variantes genéticas de predisposición a canalopatías como factor de vulnerabilidad intrínseca a eventos de muerte súbita infantil en una cohorte de casos grande e independiente.

2.2) Estudiar la implicación de las miocardiopatías hereditarias como factor de vulnerabilidad intrínseca en el desencadenamiento de la muerte súbita infantil inexplicada.

3.) Desarrollar un modelo de análisis genético de amplio espectro y coste-efectivo como herramienta de diagnóstico molecular.

3.1) Validar su eficacia como herramienta de “autopsia molecular” en individuos fallecidos con el fin de determinar la causa de su muerte e identificar a posibles familiares en riesgo.

3.2) Validar su eficacia como herramienta de diagnóstico en individuos recuperados de una muerte súbita inesperada con el fin de identificar la patología subyacente a su condición e identificar a posibles familiares en riesgo.



MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS.

IV. MUESTRAS BIOLÓGICAS.

IV.1. CASOS: CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Los criterios de inclusión de muestras para los estudios de muerte súbita infantil fueron:

i) Para casos de SIDS: los establecidos en la convención del *San Diego SIDS Research Project* publicados en 2004 por Krous et al.^[29].

ii) Para casos de SUDI: niños menores de un año de edad, fallecidos o recuperados, con causa de muerte súbita desconocida o con sospecha de una patología subyacente de probable origen genético.

iii) Para casos de SADS: niños mayores de un año de edad, fallecidos o recuperados, con resultado negativo de la autopsia y, por tanto, causa de muerte súbita desconocida.

iv) Familiares de primer y segundo grado, sintomáticos o asintomáticos de cualquier enfermedad asociada a la MSC o con posible asociación a muerte súbita infantil, que hayan firmado el consentimiento informado (ver más adelante).

Además de los casos recogidos por nuestro laboratorio en colaboración con cardiólogos, pediatras y forenses de hospitales, universidades e institutos de medicina legal de varias ciudades de España, contamos con tres grandes colecciones de casos de SIDS de grupos de investigación extranjeros con los que nuestro grupo ha establecido colaboraciones a lo largo de todos estos años. Estas colecciones están formadas por:

a) 140 casos de muerte súbita infantil clasificados como SIDS, cuyas autopsias fueron realizadas en el Instituto de Medicina Forense del Hospital Universitario de Bonn (Bonn, Alemania) a cargo del Doctor Burkhard Madea.

b) 204 casos de de muerte súbita infantil (146 clasificados como SIDS de categoría I y II; y 58 como muertes súbitas no clasificadas) cuyas autopsias fueron realizadas en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Zurich (Zurich, Suiza) a cargo de la Doctora Cordula Haas.

c) 49 casos de muertes súbitas infantiles (39 clasificadas como SIDS de categoría I y II, 3 clasificadas como SADS, y 7 muertes súbitas infantiles sin clasificar) cuyas autopsias se realizaron en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Colonia (Colonia, Alemania) a cargo del Doctor Peter Schneider.

IV.2. ASPECTOS ÉTICOS.

Todos los trabajos presentados en esta tesis doctoral cumplen los principios éticos sobre la investigación médica en humanos recogidos en la Declaración de Helsinki de 1964 desarrollada por la *World Medical Association*.

Asimismo, todos los proyectos han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC), así como los comités de ética locales de las instituciones internacionales colaboradoras.

El tratamiento, comunicación y cesión de la información de los casos incluidos en los respectivos estudios se han llevado a cabo conforme a lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Oficial y a la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativas a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos.

Tanto las muestras recogidas directamente en nuestro laboratorio, como las colecciones cedidas por las instituciones internacionales colaboradoras son conservadas en la colección para la línea de investigación “Investigación en Muerte Súbita Cardiaca” (Nº C.0000537 del Registro Nacional de Biobancos) conforme al Real Decreto 1716/2011 de Biobancos. La responsable de la custodia de las muestras y los datos es la Doctora María Brion Martínez y el lugar de realización de los estudios es el Laboratorio de Xenética de Enfermedades Cardiovasculares e Oftalmológicas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, sito en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

La obtención y posterior utilización de muestras de individuos fallecidos recogidas con anterioridad a la entrada en vigor del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, del Registro Nacional de Biobancos (incluidas todas las colecciones de las entidades colaboradoras de nuestro estudio) han sido aprobadas por el Comité de Ética de Investigación de Galicia después de ser sometidas a un proceso de codificación con código doble reversible. Este requisito es necesario para la transferencia de muestras

biológicas y datos del individuo para su uso por terceros con fines médicos y de investigación biomédica, de acuerdo con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y en las guías y recomendaciones médico-éticas sobre biobancos de España, Suiza y Alemania^[260-262].

Finalmente, la obtención y utilización de muestras biológicas de personas fallecidas (sean menores o no) con posteridad a la entrada en vigor del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, del Registro Nacional de Biobancos, puede realizarse si así lo hubieran dispuesto en vida mediante consentimiento informado (el propio individuo o sus representantes legales, según proceda). Si no hubiera consentimiento informado y el individuo o sus representantes legales no hubieran dejado constancia expresa de su oposición, su utilización será posible previo dictamen favorable del Comité de Ética de Investigación.

IV.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN.

La extracción de ADN de las muestras biológicas se ha llevado a cabo en los respectivos laboratorios de procedencia mediante los siguientes métodos:

- *Muestras de Bonn*: ADN obtenido a partir de tejido de miocardio, hígado, bazo, pulmón o timo, fijado con formaldehído y embebido en bloques de parafina con el kit comercial First-DNA All Tissue KIT (GEN-IAL GmbH, Troisdorf, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- *Muestras de Zurich*: ADN obtenido a partir de tejido de miocardio, hígado, bazo, timo o páncreas, fijado con formaldehído y embebido en bloques de parafina, con el kit comercial QIAGEN QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania).

- *Muestras de Colonia*: ADN extraído de sangre total congelada de autopsia, con el kit NucleoBond AXG 500 (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania).

- *Muestras recogidas en nuestro laboratorio*: ADN extraído de sangre total fresca con el kit comercial Wizard Genomin DNA purification Kit (Promega, Madison, WI, USA); ADN extraído de sangre total de autopsia mediante el método de fenol-cloroformo.

La cuantificación de ADN se ha realizado mediante dos métodos:

- *Espectrofotometría*: con el *NanoDrop® 1000 Spectrophotometer V3.7*. El espectrofotómetro permite seleccionar la longitud de onda y la absorbancia a las que va a ser sometida la muestra. La concentración de la muestra (en ng/ μ l) viene dada por la absorbancia a 260 nm basándose en la Ley de Beer-Lambert de óptica, que propone que la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda depende de la cantidad de especie absorbente con la que se encuentra la luz al atravesar la muestra (aunque no permite distinguir entre ADN, ARN, o ácidos nucleicos degradados de los no

degradados). Además de a esta longitud de onda, el aparato mide a 230 nm y a 280 nm. Con estos valores permite calcular sendas ratios de absorbancia que se utilizan para evaluar la pureza del ADN respecto a la presencia de proteínas o fenol ($260/280 \approx 1,8 - 2$) y respecto a la presencia de contaminantes co-purificados con el ADN ($260/230 \approx 1,8 - 2,2$).

- Fluorimetría: con el kit *Quant-iT™ Assays* y el *Qubit™ fluorometer*. Este aparato utiliza colorantes fluorescentes para medir la concentración de la molécula de interés (ADN, ARN o proteína) comparándolo con una recta patrón. Es más preciso que el espectrofotómetro y el método utilizado para la preparación de muestras que se someterán a ultrasecuenciación.

V. ESTUDIOS GENÉTICOS: DETECCIÓN DE VARIANTES.

Uno de los objetivos primarios -si no el principal- de esta tesis es desenmascarar el trasfondo genético de las muertes súbitas inexplicadas que ocurren en la infancia y, especialmente, en la lactancia. Para ello se han seguido distintas estrategias, a su vez con distintos enfoques, con el fin de determinar si algunos de estos casos pueden ser dilucidados de la misma manera en que se procede en los casos de MSC en adultos; es decir, observar la prevalencia de variantes genéticas asociadas con un aumento de riesgo de sufrir MSC en adultos, en casos pediátricos; así como la distribución de éstas en los mismos genes asociados a MSC en adultos, o de ser el caso, en genes distintos o incluso nuevos.

A continuación se explica brevemente cada uno de los métodos utilizados para la detección de variantes. Se trata de poner en contexto cada una de las técnicas y el porqué de su utilización para la consecución del objetivo marcado. Por tanto, este apartado pretende ser más una extensión de la introducción que un manual técnico propiamente dicho, ya que los detalles de los respectivos protocolos de laboratorio pueden encontrarse en sendos artículos en el bloque *Resultados*.

V.1. GENOTIPADO DE ALTO RENDIMIENTO: SEQUENOM MASSARRAY® SYSTEM.

V.1.1. SELECCIÓN DE VARIANTES.

La estrategia de genotipado permite analizar el genotipo de la muestra de interés para determinadas posiciones del genoma, las cuales deben ser determinadas al inicio del estudio. Dichas posiciones son, en este estudio, variantes genéticas con frecuencia

inferior al 1% en la población general, descritas en la literatura y en las bases de datos como implicadas en el desarrollo de HCM y LQTS, así como algunas variantes polimórficas (SNPs) con frecuencias superiores al 1% en la población general, que pueden ejercer un efecto modificador sobre el fenotipo producido por las otras variantes. En el primer caso, se seleccionaron 680 variantes en 16 genes asociados a HCM (*MYH7*, *MYBPC3*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TNNC1*, *TPM1*, *ACTC*, *TTN*, *MYH6*, *PRKAG2*, *TCAP*, *GLA*, *MYO6* y *MYLK2*). Las bases de datos consultadas fueron:

- Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org>), Institute of Medical Genetics in Cardiff;

- Cardiogenomics, Harvard University (actualmente sin servicio);

- ANGIS/BIOMANAGER, University of Sydney (actualmente sin servicio);

Además de consultar exhaustivamente la bibliografía publicada hasta la fecha del estudio.

Para el diseño de LQTS se seleccionaron 433 variantes en 3 genes (*KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*) de la base de datos Human Gene Mutation Database y de la bibliografía publicada hasta la fecha del estudio.

V.1.2. DISEÑO DE REACCIONES MULTIPLEX, GENOTIPADO Y ANÁLISIS DE DATOS.

El genotipado de SNPs es el conjunto de procesos que se llevan a cabo para determinar el genotipo de un organismo para uno o varios polimorfismos de un único nucleótido, como su propio nombre indica, y poder compararlo con un genotipo de referencia. En este trabajo se ha empleado una técnica de genotipado “de alto rendimiento” (*high-throughput genotyping*) que permite el estudio simultáneo de un elevado número de SNPs y muestras a un precio asequible, y se ha llevado a cabo en la plataforma Sequenom MassARRAY® System del Centro Nacional de Genotipado (CEGEN). Esta plataforma utiliza el sistema de detección por espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight*) que, junto con la química MassARRAY® iPLEX Gold, permite el análisis de SNPs, ya sean cambios de dos alelos o más, e inserciones y deleciones de hasta 40 bp.

El primer paso del proceso de genotipado es siempre la amplificación de la región donde se encuentra el SNP (unos 100 bp) mediante una PCR convencional. La tecnología permite la realización de múltiples reacciones simultáneas^[263] –reacciones

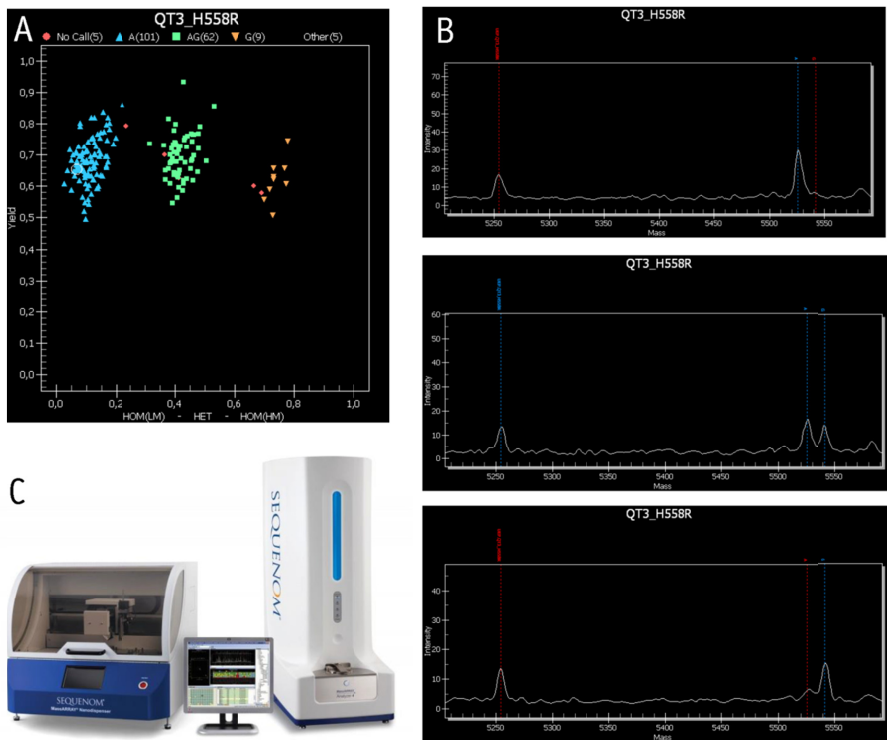
multiplex para entre 1 y 36 SNPs- gracias al diseño de *primers* de PCR compatibles con el software Assay Design v4. Tras la amplificación se lleva a cabo una purificación enzimática con la enzima SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) para eliminar los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) no utilizados en el paso anterior. A continuación tiene lugar la reacción para la discriminación alélica, que en esta plataforma se denomina reacción de extensión SBE (*single base extension*); para la cual se diseña un tercer *primer* para cada variante, que hibrida adyacente a la base polimórfica, y a éste se le añade la base complementaria al SNP en 3'. En este paso, cada *primer* incrementa su longitud en un nucleótido y dado que cada nucleótido tiene una masa molecular específica, la plataforma permite identificar qué nucleótido se ha incorporado mediante espectrometría de masas^[264].

Para la espectrometría de masas se ha de incorporar una resina de intercambio catiónico a los productos de extensión que elimine todas las sales presentes, principalmente Na⁺ y K⁺ porque generan artefactos en los espectros, y se añade agua desionizada. Los productos finales se transfieren a un chip de 384 posiciones que contienen una matriz de ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), mediante el robot RS1000. Los chips se leen en el espectrómetro de masas MALDI-TOF MA4 de Sequenom. Un láser ultravioleta ($\lambda = 337$ nm) irradia cada punto del chip transfiriendo energía que genera una nube de iones que es acelerada a través de un campo eléctrico; posteriormente los iones se dirigen hacia el detector en una zona libre de carga. La relación masa/carga (*m/z ratio*) se calcula a partir del tiempo de vuelo (TOF), obteniéndose un espectro de masas para cada reacción *multiplex*, empleando el software SpectroAcquire. Para cada SNP existen tres posibles picos: uno correspondería al *primer* de extensión en aquellos casos en los que la reacción no haya funcionado; otro si el *primer* se ha extendido para el nucleótido de menor masa molecular y un tercero si lo ha hecho para el nucleótido de mayor masa molecular^[265] (Figura 17). Los espectros se revisan manualmente con el software TyperAnalyzer v4.

El control de calidad se realiza por SNP y por muestra. Se revisan los clústers para cada SNP y se eliminan aquellos con bajo porcentaje de genotipado o que no cumplen el equilibrio de ligamiento. Lo mismo ocurre con las muestras, descartando aquellas que tienen un porcentaje de genotipado bajo o que muestran peor calidad. También se comprueba la consistencia de resultados para muestras repetidas dentro de la misma placa y entre placas. Además, en cada chip se incluye un trío de muestras Coriell (NIGMS *Human Genetic Cell Repository*, *Coriell Institute for Medical Research*, Camden, New Jersey, EEUU) para las que existen datos publicados y con las que se pueden comparar los resultados obtenidos y revisar la correcta transmisión de alelos de padres a hijos para comprobar la eficacia del genotipado.

Todas las variantes de interés son posteriormente confirmadas por secuenciación directa según el método de Sanger.

Figura 17. Espectrometría de masas en la plataforma Sequenom MassARRAY System.



Genotipado de SNPs mediante espectrometría de masas con la tecnología iPLEX Gold de Sequenom. A) Imagen del software TyperAnalyzer mostrando la asignación de genotipos para la variante p.H558R del gen SCN5A (cada punto representa una muestra de ADN distinta). B) Espectros de masas para la misma variante en tres muestras distintas. De arriba abajo, homocigoto para el alelo 1, heterocigoto y homocigoto para el alelo 2; respectivamente. El pico a la izquierda representa el *primer* no consumido en la reacción. C) Plataforma Sequenom MassARRAY System. Fuente: imágenes propias de nuestro estudio y <https://www.sequenom.com/>.

V.2. SECUENCIACIÓN DIRECTA: MÉTODO DE SANGER.

La secuenciación del ADN es el conjunto de procesos destinados a la obtención del orden secuencial de los nucleótidos que componen un fragmento de la cadena de ADN. La capacidad de descifrar las secuencias de los genes de interés se la debemos en gran parte a los avances descritos en 1977 por Allan Maxam y Walter Gilbert^[266], y Frederick Sanger^[267]; unos 25 años después de que Watson y Crick describieran la estructura en doble hélice del ADN^[268].

La secuenciación de Sanger implica el proceso competitivo de síntesis y finalización de fragmentos de ADN de interés usando dNTPs y didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) que, a diferencia de los primeros, carecen de un grupo hidroxilo en su extremo 3' que imposibilita la unión de un nuevo dNTP y por tanto, termina la síntesis^[267]. En nuestro laboratorio empleamos para ello el BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) El proceso de síntesis y finalización crea un conjunto de secuencias de distinto tamaño que puede ser separado por tamaño mediante electroforesis. Cada ddNTP lleva asociado un pigmento fluorescente específico que produce emisiones detectables en respuesta a la excitación del láser incorporado en el secuenciador. Después de una purificación enzimática con SAP (USB Corporation) para eliminar los grupos fosfato, y otra física con el sistema Montage™ SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore) para filtrar los ddNTPs no incorporados y las sales antes de la electroforesis capilar, los productos se introducen en un secuenciador ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) para realizar la electroforesis capilar. El análisis de datos se lleva a cabo con los softwares Sequencing Analysis y SeqScape® v2.5 (Applied Biosystems).

Las cualidades de la secuenciación Sanger incluyen la alta calidad y la exactitud de las lecturas que genera. De hecho, fue la técnica utilizada para crear el genoma inicial en el *Human Genome Project*^[269, 270] y en la actualidad permanece como la técnica estándar para la confirmación de variantes genéticas individuales. Sin embargo, es costosa y requiere el consumo de mucho tiempo si se pretende utilizar para secuenciación a gran escala (genomas o exomas completos), aunque su uso es razonable si el análisis se limita a un conjunto pequeño de genes, tal y como se ha venido empleando en nuestro laboratorio tradicionalmente, en el diagnóstico de HCM y LQTS.

En el contexto de las tecnologías de secuenciación, el método de Sanger está considerado como la primera generación.

V.3. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN: 5500XL SOLID™ SYSTEM

Los avances tecnológicos recientes han aumentado exponencialmente la escala de la secuenciación, permitiendo la evaluación de variantes nucleotídicas a lo largo de todo el genoma rápidamente y a un relativo bajo coste. La secuenciación de nueva generación, ultrasecuenciación o *next-generation sequencing* (NGS) describe un colectivo de técnicas diferentes que generan cantidades masivas de lecturas de secuencias que se alinean a una secuencia de referencia para determinar las posiciones en las que la secuencia de la muestra que se está analizando difiere de la de referencia. Esta tecnología se ha aplicado a un gran número de ciencias *ómicas*, entre ellas la genómica, la transcriptómica, la epigenómica, etc.

Para los estudios presentados en esta tesis, la ultrasecuenciación se ha llevado a cabo en la plataforma 5500xl SOLiD™ System (Life Technologies). Como en la mayoría de plataformas disponibles, la estrategia de ultrasecuenciación en el SOLiD (del inglés, *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) conlleva la preparación de librerías de ADN, la propia secuenciación y el análisis de datos.

V.3.1. GENERACIÓN DE LIBRERÍAS Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN.

La preparación de las librerías comienza con la fragmentación del ADN genómico en un sonicador Covaris™ y la unión de unos adaptadores en los extremos de cada fragmento (*fragment library*) que en promedio tiene unos 150 bp. Estos adaptadores son secuencias universales complementarias a los *primers* que se incorporarán posteriormente para la amplificación y secuenciación de las librerías, respectivamente. Cuando las librerías ya están construidas, son amplificadas mediante una PCR en emulsión^[271]. Ésta consiste en generar la mezcla de una fase acuosa -que contiene todos los reactivos de la PCR, unas microesferas y la dilución de ADN-, con una fase oleosa para formar una emulsión. Las microesferas contienen un *primer* universal con la secuencia complementaria a uno de los adaptadores que se unió al fragmento de ADN. La emulsión genera microgotitas que actúan como microrreactores en cuyo interior tendrá lugar la PCR. En promedio, cada microrreactor contendrá una microesfera, una hebra de ADN y la mezcla de reactivos; y tendrá lugar la PCR, por lo que las microesferas se cubrirán de copias de un único fragmento de ADN. Tras la PCR en emulsión, se capturan las microesferas con fragmentos de ADN (10-15%) y se depositan sobre la superficie de un *flowchip*.

V.3.2. SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO.

La secuenciación en SOLiD se basa en la ligación de sondas a la librería previamente amplificada. Primero, un *primer* se une al adaptador de la librería y, después, una ADN ligasa va incorporando sondas de 8 bp marcadas con un fluorocromo específico en el extremo 5' que viene determinado por las dos primeras bases de la sonda. El conjunto global de sondas contiene todas las combinaciones posibles de bases nucleotídicas en las posiciones 1 a 5 (en total 1.024 sondas) y, literalmente, realiza un “sondeo” sobre la secuencia de la librería, de tal manera que sólo aquella sonda que tenga las 5 primeras bases complementarias a dicha secuencia molde será incorporada al *primer* universal. A continuación, tras la lectura de fluorescencia, se elimina el extremo que contiene las bases 6 a 8, incluyendo el fluorocromo y da comienzo un nuevo ciclo de ligación. Por tanto, la secuencia de las bases se determina de forma saltada, por lo que para completar la secuencia serán necesarios 5 *primers* en total (Figura 18). Una de las ventajas de esta

tecnología es que cada base es interrogada dos veces, lo cual disminuye la tasa de error de la química. El sistema de secuenciación empleado en este trabajo ha sido el *pair-end*, que consiste en secuenciar ambos extremos del fragmento con una longitud final de de 75 + 25 bp.

V.3.3. ANÁLISIS DE DATOS.

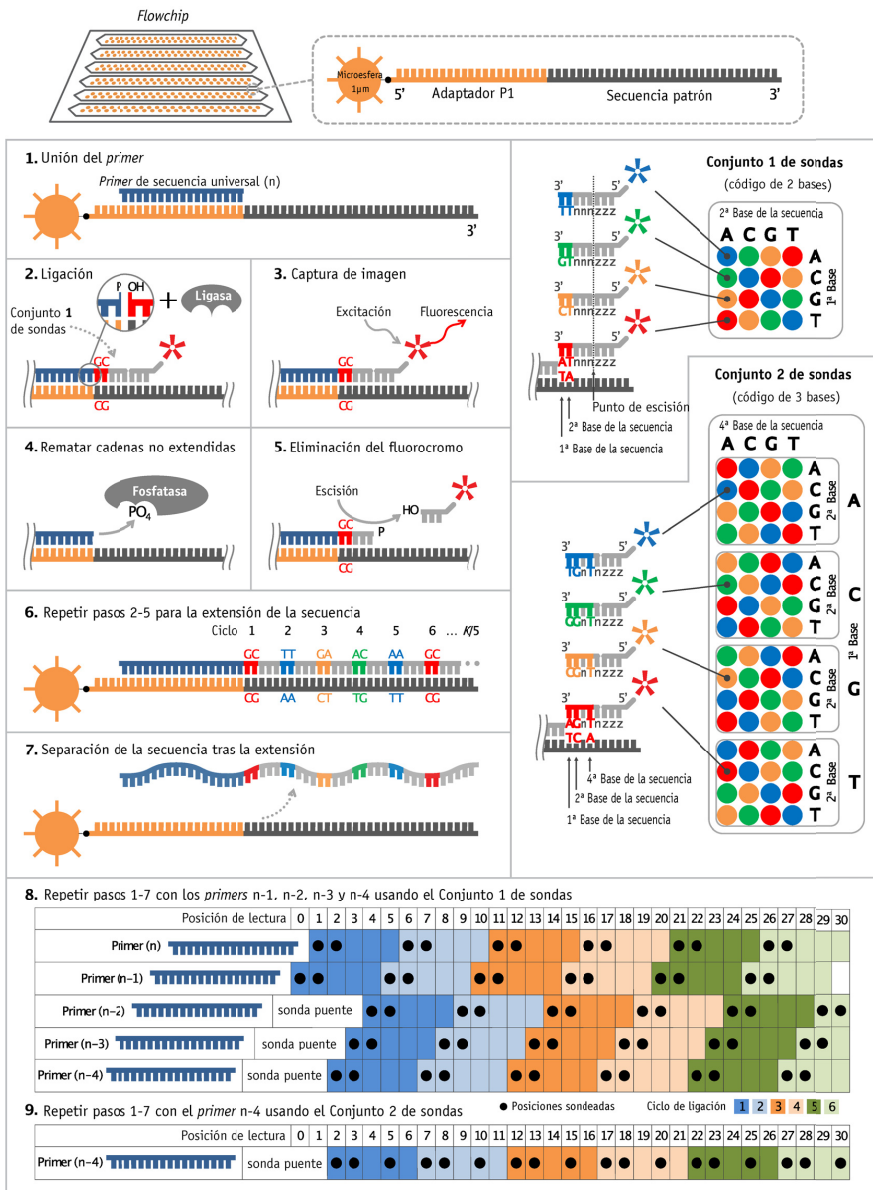
El procesado de datos de NGS es una tarea que requiere varios pasos antes del filtrado y análisis de variantes. El equipo de bioinformática se encarga de llevar a cabo todo el proceso, excepto el propio filtrado de variantes y análisis de datos, de los cuales se encarga el investigador.

En primer lugar, el dato crudo (las lecturas de secuencia) que genera el SOLiD se mapea contra el genoma de referencia UCSC hg19 (<http://genome.ucsc.edu/>) con el programa LifeScope, generando un fichero *.bam*. El mismo protocolo de LifeScope genera también un listado de variantes en formato *.gff3*. En paralelo a este último proceso, se realiza un refinado del fichero *.bam* generado por LifeScope que consiste en: la eliminación de lecturas de secuencia duplicadas con el programa Picard; un realineamiento de las lecturas de secuencia alrededor de las inserciones/delecciones (“indels”) y una recalibración de la calidad de las bases; los dos últimos con el programa GATK. A continuación se lleva a cabo de nuevo la detección de variantes, esta vez con GATK, que genera un fichero *.vcf* y, en paralelo, se obtienen estadísticas de cobertura de las regiones de interés con Picard y BEDTools. El último paso consiste en la anotación de las variantes detectadas por LifeScope y GATK (ficheros *.gff3* y *.vcf*) con el programa ANNOVAR, que recoge de las bases de datos que se le designen los resultados de la búsqueda de toda la información disponible para cada posición cromosómica anotada como variante; entre ellas, RefSeq, Ensembl, dbSNP, 1000Genomes, Exome Variant Server, etc. Este último paso genera sendos ficheros *.csv.tab* para las variantes detectadas por LifeScope y GATK, sobre el cual el usuario realiza los filtrados adecuados para su investigación.

V.3.4. PANELES PERSONALIZADOS *VERSUS* EXOMA COMPLETO.

Las principales ventajas de la NGS incluyen la alta capacidad y la eficacia de la estrategia, que ha posibilitado la aplicación de esta tecnología a grandes grupos de muestras y a una escala masiva^[272]. La NGS puede enfocarse al estudio de paneles de genes concretos, exomas completos o incluso, genomas completos. Los paneles personalizados permiten acotar las regiones del genoma sobre las que se diseñarán las sondas de ligación.

Figura 18. Sistema de secuenciación del 5500 Series SOLiD™ System.



Representación esquemática de la química 5500 Series SOLiD™ System Exact Call Chemistry. La química utilizada en este trabajo es ligeramente diferente; no cuenta con un segundo conjunto de sondas y por tanto, no realiza el paso 9 de la figura, ya que es incompatible con el método de secuenciación pair-end. Fuente: traducción desde <http://www.lifetechnologies.com/>.

Por ejemplo, los dos paneles de genes de 500 kb diseñados para el estudio de la MSC en nuestro laboratorio incluyen 81 y 86 genes asociados a MSC, respectivamente. Las regiones de interés (ROI) que se han determinado las conforman los exones y las zonas de *splicing* a ambos lados de cada exón, de cada uno de dichos genes. La NGS permite secuenciar todas esas ROI simultáneamente, pero para ello es necesario separarlas del resto del genoma “capturándolas”. Este paso tiene lugar tras la fragmentación del ADN genómico y antes de la amplificación. La estrategia de captura adoptada en nuestro laboratorio es por hibridación en solución^[273], con el kit SureSelect Custom Target Enrichment System (Agilent Technologies). Este kit contiene una librería de sondas de ARN biotiniladas de 120 bp complementarias a las ROI del diseño personalizado. Las sondas hibridan con el ADN y después son capturadas mediante el uso de bolas magnéticas con estreptavidina, una proteína de la bacteria *Streptomyces avidinii* que tiene una altísima afinidad por la biotina y forma una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conocen en la naturaleza^[274, 275], de tal manera que las ROI se pueden recuperar atrayendo las bolas magnéticas. Después de un paso de lavado y purificación, y de la digestión del ARN, el ADN capturado ya está listo para ser amplificado y posteriormente secuenciado.

En esta tesis también se presenta un trabajo basado en el estudio del exoma completo de una muestra de ADN genómico. En este caso, las ROI consisten en la totalidad de las regiones codificantes del genoma. La estrategia de captura es la misma que para paneles personalizados, por hibridación en solución^[276], a excepción de que las sondas biotiniladas del kit ya están diseñadas por la empresa que lo comercializa.

VI. ESTUDIO FUNCIONAL: CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES.

VI.1. CREACIÓN DEL MODELO CELULAR EXPERIMENTAL.

VI.1.1. LÍNEAS CELULARES.

Para la creación del modelo celular experimental es necesario disponer tanto de una línea celular eucariota sobre la que expresar las proteínas recombinantes, como de una línea celular procariota (bacterias) sobre la que multiplicar y extraer el vector plasmídico de transfección de las células eucariotas.

Como línea celular eucariota se ha utilizado la *Human Embryonic Kidney 293* (HEK293, *European Collection of Cell Cultures*, ECACC), que consiste en células de riñón de embrión humano transformadas permanentemente con el adenovirus humano tipo 5 (Ad5)^[277]. Se sabe que el Ad5 ha incorporado un fragmento de su genoma de ~4 kb al cromosoma 19 de las células; fragmento que codifica las proteínas E1A/E1B que

interfieren con las rutas de control del ciclo celular y contrarresta la apoptosis^[278]. Esto, sumado al hecho de que las células HEK293 tienen un cariotipo pseudotriploide, hace que no sean un buen modelo para estudiar el propio comportamiento celular, pero son un modelo idóneo para estudiar la expresión de genes incorporados artificialmente a las células mediante el uso de vectores plasmídicos que “piratean” de manera muy efectiva la maquinaria de síntesis proteica de la célula y la obligan a transcribir y traducir dichos genes^[279]. Los principales atributos de estas células por los que se vienen utilizando tanto en electrofisiología para el estudio de canales iónicos aislados incluyen la alta eficiencia de transfección y producción de proteína, fieles traducción y procesamiento de las proteínas, y el reducido tamaño de las células, apropiado para los experimentos de *patch-clamp*^[279].

Como línea celular procariota se ha utilizado la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DH5 α competentes, con un genoma circular propio de ~4,6 Mb que alberga una serie de mutaciones que la convierten en una excelente cepa para procedimientos de clonación en laboratorio^[280]. Esta cepa también contiene plásmidos en su interior, y el término “competente” hace referencia a que han sido sometidas a un tratamiento físico o químico que ha aumentado su capacidad de integrar también plásmidos externos de forma excepcionalmente buena, generando un alto rendimiento de ADN de calidad durante la extracción^[280, 281] (Figura 19A).

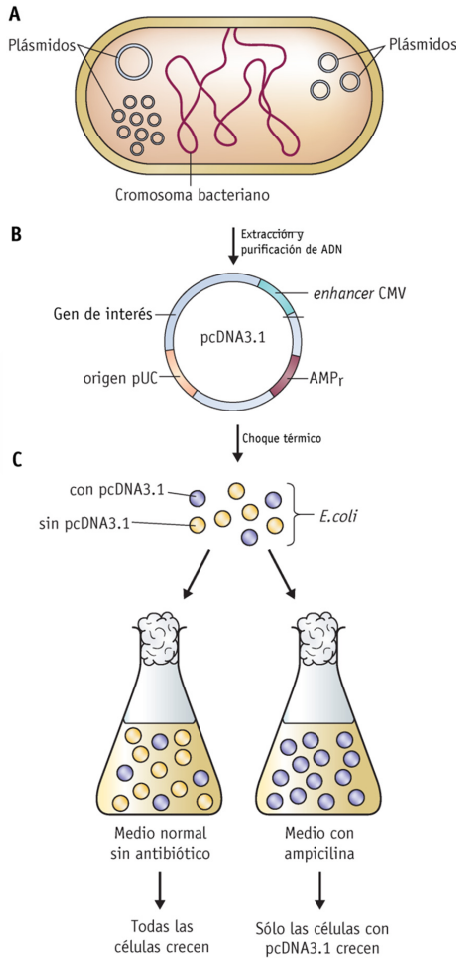
VI.1.2. VECTORES PLASMÍDICOS DE TRANSFECCIÓN.

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN independientes del genoma bacteriano^[281]. La mayoría posee al menos una secuencia de ADN que actúa como punto de origen de la replicación, de manera que pueden multiplicarse dentro de la célula independientemente del genoma bacteriano. Normalmente también albergan uno o más genes que suelen conferirle alguna característica útil a la bacteria hospedadora. Los plásmidos pequeños utilizan la propia maquinaria de replicación de la célula hospedadora para dividirse, mientras que algunos de los más grandes tienen genes que codifican enzimas especiales para la replicación de plásmidos.

En nuestros experimentos se han utilizado plásmidos de tipo pcDNA3.1, un plásmido pequeño que posee el promotor-*enhancer* del citomegalovirus (CMV) para altos niveles de expresión, el origen pUC para selección y mantenimiento en *E. coli* y el gen de resistencia a la ampicilina como marcador de selección (Figura 19B). El método de clonación de este plásmido es mediante enzimas de restricción. Se han utilizado dos plásmidos para clonar sendos genes, *KCNH2* y el gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*) de *Aequorea victoria*^[282].

Cuando el plásmido recombinante es agregado a un medio con bacterias *E. coli* competentes y éstas son sometidas a choque térmico, el plásmido se incorpora al interior de algunas de ellas y se dice que la bacteria ha sido transformada.

Figura 19. Creación de plásmidos y transformación bacteriana.



Las células de *E. coli* contienen plásmidos, que son elementos genéticos de las bacterias independientes del cromosoma bacteriano (A). La clonación de genes en el plásmido pcDNA3.1 se realiza mediante el empleo de enzimas de restricción (B). Las bacterias competentes son transformadas mediante choque térmico y cultivadas en medio con antibiótico; de manera que solamente aquellas que expresen el gen de resistencia a dicho antibiótico sobrevivirán, resultando ser aquellas que han incorporado el plásmido con éxito (C). Fuente: adaptación de Brown's *Gene cloning and DNA analysis: an introduction* (Wiley-Blackwell)^[281].

Para generar copias del plásmido, se cultivan las bacterias en medio LB (siglas de Luria-Bertani) con ampicilina, un medio de cultivo de tipo complejo o indefinido, denominados así porque su composición precisa es desconocida, pero dado que para estos experimentos las bacterias no necesitan un medio definido ni condiciones precisas de cultivo, y que el LB es apto para un amplio espectro de bacterias sin necesidad de suplementos, es el más indicado^[281]. En este medio, a 37°C y en agitación lenta, una célula de *E. coli* se divide una vez cada 20 minutos hasta que el cultivo alcanza una densidad de $2-3 \times 10^9$ células/ml (Figura 19C). A continuación se realiza una extracción y purificación del ADN plasmídico, que ya estará listo para transfectar las células HEK293.

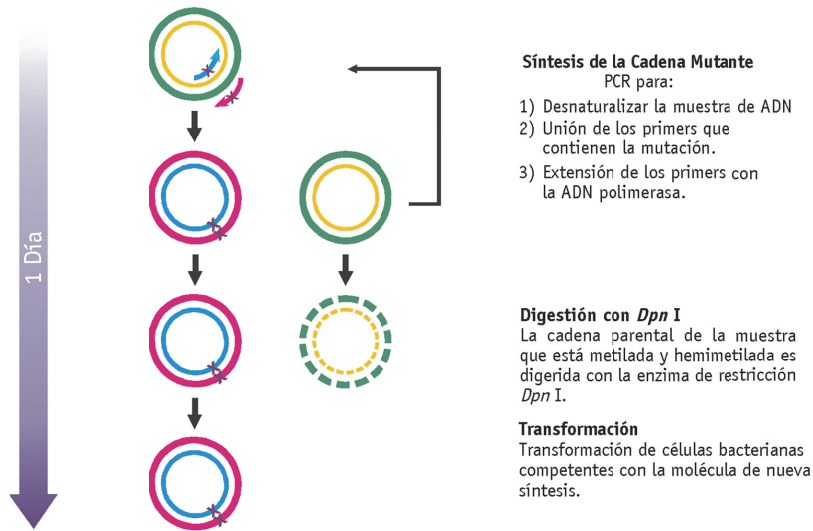
VI.1.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

La mutagénesis dirigida *in vitro* es una técnica de manipulación genética versátil que permite crear una mutación en cualquier punto de una cadena de ADN^[281] con el fin de estudiar la expresión de un gen, la relación estructura/función de una proteína o modificar un vector de expresión (por ejemplo, un plásmido). Existen varias técnicas publicadas, la mayoría de las cuales requieren ADN monocatenario como molécula patrón. En los experimentos presentados en esta tesis se ha utilizado esta técnica con un kit que permite la mutagénesis dirigida de plásmidos bicatenarios para alterar la secuencia genética del gen *KCNH2* clonado en un vector pcDNA3.1 de acuerdo con las variantes nucleotídicas que se pretendían estudiar.

La técnica consiste en sintetizar una pareja de oligonucleótidos complementarios a la secuencia de interés pero conteniendo la variante nucleotídica deseada en lugar de la base de referencia (Figura 20). A pesar de esta discordancia, los oligonucleótidos se alinearán de todas formas a sendas hebras de ADN del plásmido y actuarán como cebadores para sintetizar cadenas complementarias con ayuda de una ADN polimerasa. La síntesis continuará hasta que las nuevas cadenas estén completamente sintetizadas. A continuación, se utiliza una endonucleasa específica para ADN metilado y hemimetilado (el ADN aislado de la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* está metilado y es susceptible, por tanto, de ser digerido) para digerir las hebras de ADN parental y seleccionar sólo las hebras de ADN de nueva síntesis que contienen las mutaciones introducidas^[283].

Después de la transformación bacteriana (epígrafe anterior), la propia maquinaria de replicación de ADN de la bacteria, clonará el ADN plasmídico produciendo numerosas copias de la molécula recombinante que posteriormente serán extraídas y purificadas para transfectar cultivos de células eucariotas. Al introducir el plásmido en las células eucariotas, éstas transcribirán el plásmido a ARNm y posteriormente lo traducirán a proteínas, como si de su propio genoma se tratase.

Figura 20. Mutagénesis dirigida *in vitro*.



En la mutagénesis *in vitro* dirigida por oligonucleótidos, se inserta una mutación puntual mediante una simple PCR que extiende una pareja de *primers* que contienen la mutación. Fuente: traducción de <http://www.genomics.agilent.com>.

VI.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA: “*TRAFFICKING DEFECTS*”.

La regulación de la expresión de los canales iónicos cardiacos ocurre fundamentalmente a nivel transcripcional; sin embargo es un proceso complejo. El proceso de transcripción controla la producción de ARNm, el cual es transportado desde el núcleo hasta el citoplasma para ser traducido a proteínas. Después de un extensivo proceso llevado a cabo por chaperonas especializadas para optimizar el correcto ensamblaje y plegado de las proteínas y promover su transporte a la membrana (*trafficking*), el canal iónico maduro es finalmente insertado en la membrana celular. Las proteínas mal procesadas son degradadas bajo control de la célula. Una vez en la membrana, los canales siguen sujetos a regulación funcional mediante enzimas quinasas y proteasas, que llevan a cabo la fosforilación de los aminoácidos clave que controlan la actividad del canal iónico.

Muchas mutaciones en los genes de los canales iónicos producen corrientes anómalas, lo cual demuestra *de facto* que la proteína alcanza la membrana celular y es funcional. Cuando no se observa función del canal mutante en absoluto, muy probablemente sea debido a mutaciones que producen defectos en el procesado y transporte de la proteína a

la membrana. Estos defectos pueden ser analizados con métodos electrofisiológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos, y han sido especialmente estudiados en los canales de potasio dependientes de voltaje HERG (*KCNH2*)^[284].

VI.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La cuantificación de proteínas para los ensayos bioquímicos de expresión proteica se ha llevado a cabo mediante el método del ácido bicineónico (BCA) descrito por Smith *et al.*^[285] (Figura 21). El BCA, una sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso al unirse a iones Cu^+ en condiciones alcalinas, con una absorbancia máxima a 562 nm. Los iones Cu^+ derivan de la unión de iones Cu^{2+} a las proteínas, y por tanto, la concentración de Cu^+ será proporcional a la concentración inicial de proteína y al tiempo de incubación; y el contenido de ésta en una muestra puede ser determinado mediante espectrofotometría por comparación otros estándares de concentración de proteína conocida. Es un método sencillo, rápido, muy sensible (rango de sensibilidad de 0,5 – 10 μg de proteína) y con gran tolerancia a compuestos que interfieren en la detección en otros métodos^[286].



Figura 21. Cuantificación proteica con ácido bicineónico.

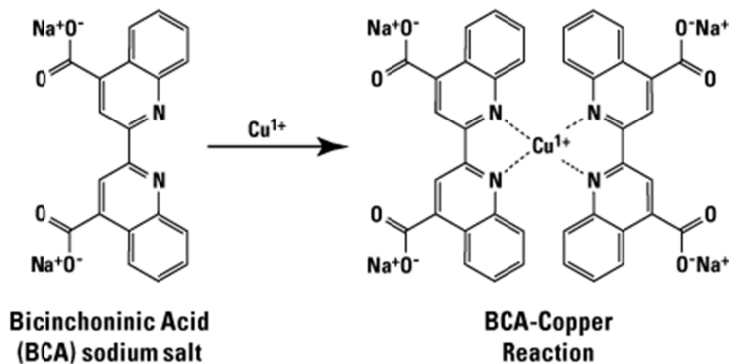


Figura: Reacción del BCA con los iones cuprosos. Dos moléculas de BCA se unen a una molécula de cobre que ha sido reducida en una reacción de Biuret mediada por péptido.

VI.2.2. WESTERN BLOT

El Western blot es una técnica bioquímica muy utilizada en investigación para identificar la presencia y grado de expresión de proteínas. En esta técnica, una mezcla de proteínas es sometida a electroforesis en gel y por tanto, fraccionada en base a la masa molecular de cada tipo de proteína. El resultado es, a continuación, transferido a una membrana de nitrocelulosa produciendo una banda para cada proteína y ésta es incubada con anticuerpos marcados específicos para cada proteína de interés que permitirán la identificación de las proteínas. La técnica fue descrita por primera vez por Towbin y colaboradores en 1979^[287] pero se la conoce con el nombre “Western blot” desde 1981, cuando Burnette^[288] le aplicó la tradicional nomenclatura que se había establecido para las otras técnicas de transferencia: Southern blot para la transferencia de ADN^[289] (que fue la primera descrita y en realidad debe su nombre a su inventor, Edwin M. Southern) y Northern blot para la transferencia de ARN^[290].

En el trabajo presentado en esta tesis se ha empleado el Western blot para los estudios de “*trafficking defects*”, es decir, de fallos en el transporte del canal HERG a la membrana celular (Figura 22). Al examinar la proteína normal en un Western blot, se observan dos bandas distintas. Una de ~155 kDa que corresponde con la forma madura de la proteína, completamente glicosilada y que alcanza y se sitúa en la membrana celular con normalidad. La otra banda, de ~135 kDa representa la molécula de HERG recién sintetizada, que se ha ensamblado en el retículo endoplásmico pero aún no ha sido exportado al aparato de Golgi para someterse al complejo proceso de glicosilación, y por tanto no ha sido transportado a la membrana^[291]. Cuando una mutación afecta al proceso de glicosilación de la proteína, en el Western blot sólo se apreciará la banda ~135 kDa correspondiente a la forma inmadura de la proteína.

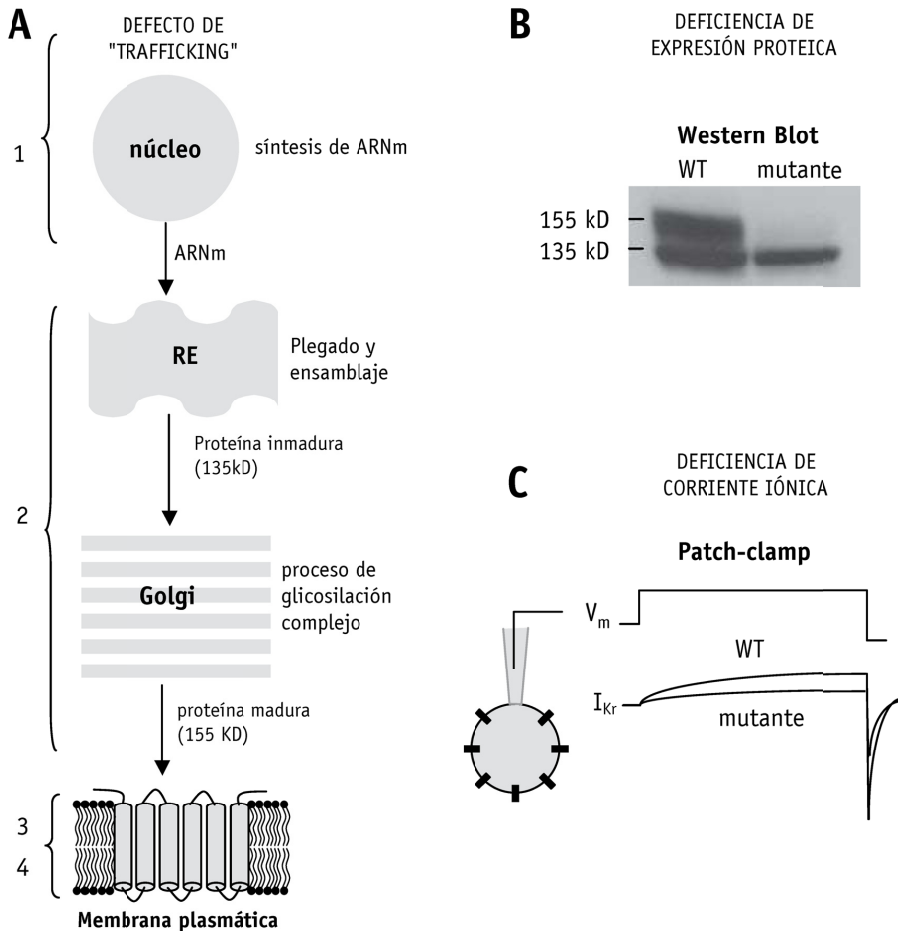
VI.3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL CANAL DE POTASIO HERG.

VI.3.1. PROPIEDADES BIOFÍSICAS.

El gen *KCNH2* codifica la subunidad α formadora del poro de un canal iónico dependiente de voltaje selectivo para iones K^+ : $K_v11.1$ o HERG (*human ether-à-go-go*), que transmite la componente rápida de la corriente rectificadora tardía de K^+ , I_{Kr} ^[291]. Tiene en común con otros canales de potasio dependientes de voltaje que está formado por un homotetrámero de subunidades α , cada una compuesta por seis dominios transmembrana (S1-S6) de los cuales el S5, el S6 y la hélice del poro forman el dominio del poro del canal y los dominios S1 a S4 de cada subunidad forman el dominio sensible

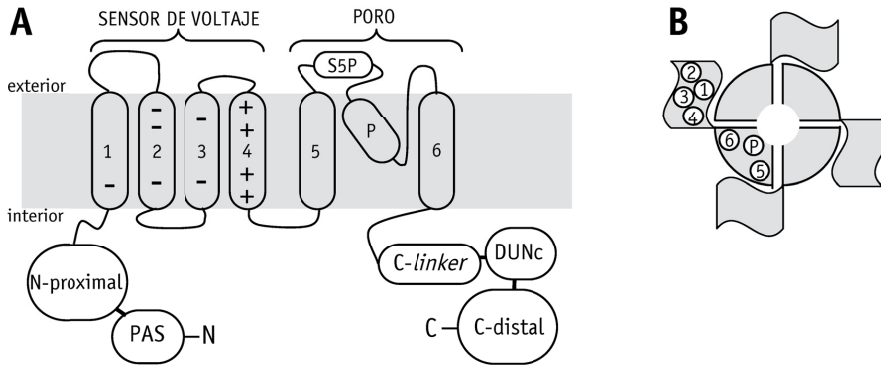
a los cambio de voltaje en la membrana celular que regulan la apertura y cierre del dominio del poro^[292, 293] (Figura 23).

Figura 22. Defectos de trafficking del canal Kv11.1 a la membrana.



Biogénesis del canal Kv11.1 (HERG). A) La funcionalidad del canal depende de la transcripción del ADN a ARN mensajero (ARNm), traducción de éste a proteína y un complejo proceso de modificaciones post-traducción previo al transporte hacia la membrana de la proteína madura. B) Los defectos de "trafficking" pueden detectarse mediante Western blot debido a la ausencia de la proteína completamente glicosilada (155 kD) en caso de mutación y C) los defectos en la permeabilidad del canal o en su cinética pueden detectarse mediante ensayos de *patch-clamp*. Fuente: adaptación de Perrin et al., 2008^[292].

Figura 23. Topología de los canales de K⁺ HERG (Kv11.1).



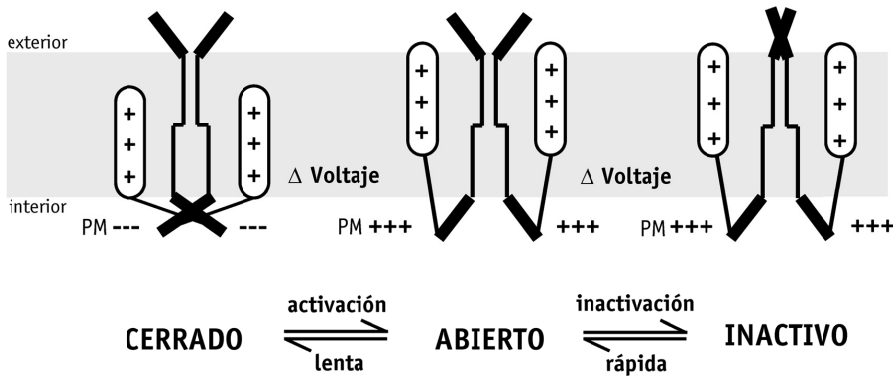
Estructura y función de los canales HERG. A) Topología de una subunidad α en la que se muestran los siguientes dominios: PAS, dominio *Per-Arnt-Sim* que en mamíferos son exclusivos de la familia de canales *ether à-go-go* (aminoácidos 1-137); dominio próximo al N-terminal (138-406), sensor de voltaje (407-545), poro (545-665), *C-linker* (666-742), dominio de unión a un nucleótido cíclico (DUNC; 742-844) y dominio distal C-terminal (845-1159). B) Representación del tetrámero que conforma el canal funcional. Fuente: adaptación de Perrin et al., 2008^[292].

Los canales HERG pueden existir en tres estados: cerrados, abiertos o inactivados (Figura 24). Al igual que otros canales K⁺, contienen múltiples cargas positivas en el dominio S4 y esto actúa como el principal sensor de voltaje para la apertura de los canales. El proceso de inactivación, sin embargo, exhibe varias características inusuales. La más notable es que la cinética de inactivación del canal es mucho más rápida que la de activación, y además, el proceso de inactivación es dependiente de voltaje, aunque no está claro del todo si la dependencia de voltaje es intrínseca a la inactivación o si deriva del acoplamiento a la activación^[291]. Esta combinación única de propiedades es lo que le otorga el importantísimo papel fisiológico a la I_{Kr} durante la repolarización cardíaca, que determina la duración de la fase de meseta del PA en miocardiocitos ventriculares y auriculares^[291].

El mantenimiento de la fase de meseta es crucial para asegurar la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico durante el tiempo suficiente para permitir la contracción del músculo. Cuando comienza la repolarización, los canales HERG se recuperan del estado de inactivación y transmiten más corriente, de modo que aceleran la repolarización y generan un mecanismo de retroalimentación positiva que conduce a una mayor recuperación desde el estado de inactivación. Este círculo de retroalimentación positiva asegura una repolarización relativamente rápida y eficaz. Hacia el final de la repolarización los canales HERG se cierran lentamente, por lo que permanecen abiertos

todavía durante un periodo de tiempo considerable después de que la membrana haya regresado al potencial de reposo (diástole). Como el potencial de reposo es cercano al potencial de equilibrio del K^+ , existe un pequeño flujo de corriente a través del canal al principio del periodo de reposo que, a pesar de ser pequeño, contribuye igualmente a la terminación de la repolarización^[291].

Figura 24. Cinética de los canales de potasio HERG ($K_v11.1$)



Los canales HERG pueden hallarse en uno de sus tres principales estados de conformación: cerrado, abierto (activo) o inactivo. La transición entre estos tres estados es dependiente de voltaje (potencial de membrana, PM). La activación implica la apertura de una compuerta intracelular, mientras que la inactivación implica el cierre de una compuerta extracelular. Sólo habrá flujo neto de corriente durante el periodo en el que ambas compuertas están abiertas. El hecho de que ambas compuertas tengan cinéticas distintas es esencial para que esto ocurra; de lo contrario, si ambas tuviesen cinéticas similares, nunca llegaría a darse esa situación. Fuente: adaptación de Perrin et al., 2008^[292].

La actividad de los canales iónicos puede ser registrada en forma de cambios en el PM que reflejan la respuesta de la membrana a la entrada o salida de iones hacia o desde la célula. Dado que los cambios en el PM son el efecto fisiológico real del concepto de actividad del canal iónico, este parámetro es a menudo un indicador importante del significado fisiológico de la actividad^[294].

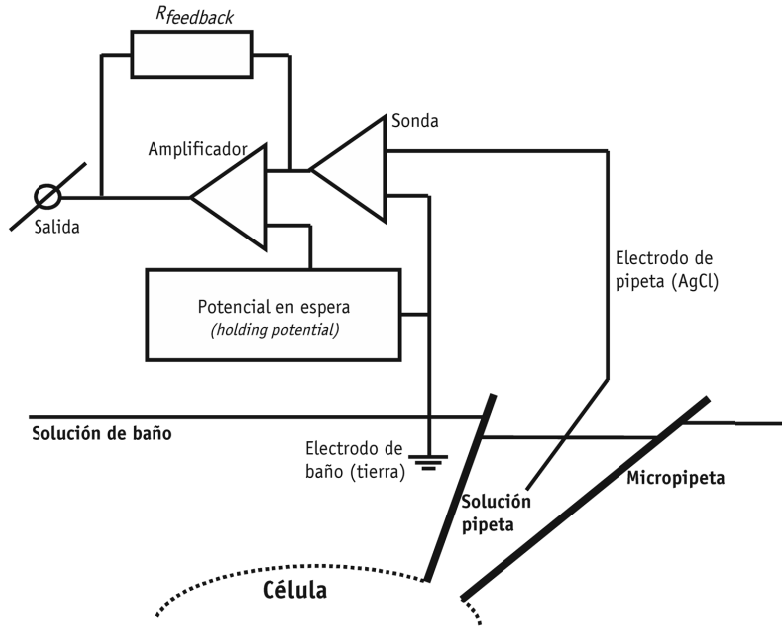
VI.3.2. WHOLE-CELL PATCH-CLAMP.

La medición de los cambios de PM como reflejo de la respuesta de ésta a las corrientes iónicas suele medirse mediante registros intracelulares por medio de electrodos afilados. Sin embargo, para estudiar el comportamiento de un canal iónico determinado no es la

forma preferible, ya que los cambios en el PM repercuten en la función del canal iónico de varias maneras independientes; por ejemplo, el flujo de iones a través de los canales cambia en función de cómo cambie la fuerza impulsora y además, existen muchos tipos de canales que son dependientes de voltaje y la actividad de uno puede verse enmascarada por la de otro/s^[294]. Por tanto, a veces es preferible controlar y registrar los cambios en el PM directamente en la membrana. Este método se conoce como *voltage-clamp*, que en castellano se traduciría como “pinza de voltaje”^[294]. El *voltage-clamp* se lleva a cabo con un sistema electrónico de retroalimentación con los que se registra un PM y se compara con un PM “de espera” (*holding potential*) establecido por el investigador. Cualquier desviación del PM registrado con respecto al PM de espera es corregida inmediatamente por la célula mediante una inyección de corriente compensatoria. Por tanto, esta corriente representa con precisión (aunque con signo opuesto) la corriente iónica de la membrana que se está investigando^[294]. Como la medición del voltaje y la inyección de corriente usan la misma pipeta de soporte y la respuesta de corriente deber ser instantánea, los electrodos utilizados en esta situación son distintos de los afilados; son de baja resistencia y se fijan a una pequeña área de la membrana, por lo que el experimento de *voltage-clamp* pasa a recibir el nombre de *patch-clamp*^[294]. Una de las características que hace del *patch-clamp* una técnica tan potente es la flexibilidad que le proporciona al investigador, permitiéndole estudiar los canales iónicos a distintos niveles: *whole cell* (actividad de todos los canales adheridos a la membrana celular) o *single channel* (actividad individual de un solo canal); así como manipular el medio extracelular o el intracelular durante el registro. En el trabajo presentado en esta tesis se ha empleado la modalidad *whole cell patch-clamp* (Figura 25). En esta configuración, el parche o área de membrana que queda bajo la punta de la pipeta del electrodo cuando ésta se le adhiere, se rompe para que la solución de pipeta y el electrodo entren en contacto directo con el citoplasma. La situación es similar a hacer un registro intracelular (aunque no idéntica), ya que el electrodo de la pipeta está en el lado interno de la membrana y el electrodo de tierra está al otro lado, por lo que el PM puede ser registrado directamente. La punta de la pipeta tiene una abertura lo suficientemente ancha como para permitir el lavado del citoplasma con la solución de pipeta sin que éste afecte a su composición iónica, dado el pequeñísimo tamaño de la célula. Si se desea analizar el canal en condiciones fisiológicas, entonces la solución tendrá una composición iónica similar a la del citoplasma, como era el caso en nuestro estudio.

En los experimentos de *voltage-clamp* (incluidos los de *patch-clamp*) el potencial en espera (*holding potential*) lo controla el investigador, pudiendo modificarlo para establecer desde simples variaciones graduales de tiempo hasta complicadas ondas para estudiar propiedades específicas del canal. Los protocolos utilizados en el estudio presentado en esta tesis están escritos detalladamente en el **ARTÍCULO 5** del epígrafe *Resultados*.

Figura 25. Configuración de whole-cell patch clamp.



Principio de voltage clamp en la configuración de whole-cell patch clamp. El investigador establece un potencial en espera (holding potential), que viene comparado con cada potencial medido. Cada diferencia es compensada directamente por una inyección de corriente. Fuente: adaptación de Molleman 2003 (Wiley)^[294].





RESULTADOS



RESULTADOS

ARTÍCULO 1: PREVALENCE OF HCM AND LONG QT SYNDROME MUTATIONS IN YOUNG SUDDEN CARDIAC DEATH-RELATED CASES.

ARTÍCULO 2: SARCOMERIC GENE MUTATIONS IN SUDDEN INFANT DEATH SYNDROME (SIDS).

ANEXO AL ARTÍCULO 2: ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS EN *KCNQ1*, *KCNH2* Y *SCN5A* ASOCIADAS A SÍNDROME DE QT LARGO EN UNA COHORTE DE SIDS.

ARTÍCULO 3: BROAD-BASED MOLECULAR AUTOPSY: A POTENTIAL TOOL TO INVESTIGATE THE INVOLVEMENT OF SUBTLE CARDIAC CONDITIONS IN SUDDEN UNEXPECTED DEATH IN INFANCY AND EARLY CHILDHOOD.

ARTÍCULO 4: PROSPECTIVE AND RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF BARTH SYNDROME AIDED BY NEXT-GENERATION SEQUENCING.

ARTÍCULO 5: GENOTYPE-PHENOTYPE RELATIONSHIP OF THE EPISTATIC INTERACTIONS BETWEEN A NOVEL RARE VARIANT AND A COMMON POLYMORPHISM IN *KCNH2* LINKED TO SUDDEN UNEXPLAINED INFANT DEATH AND ATRIAL FIBRILLATION IN A FAMILY.



ARTÍCULO 1: PREVALENCE OF HCM AND LONG QT SYNDROME MUTATIONS IN YOUNG SUDDEN CARDIAC DEATH-RELATED CASES.

AUTORES:

Catarina Allegue, Rocio Gil, Alejandro Blanco-Verea, Montserrat Santori, Marisol Rodríguez-Calvo, Luis Concheiro, Ángel Carracedo, María Brion.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN:

International Journal of Legal Medicine 125:565–572. 16 Abril 2011

DOI:

10.1007/s00414-011-0572-7.

RESUMEN:

Cardiomyopathies and channelopathies are major causes of sudden cardiac death. The genetic study of these diseases is difficult because of their heterogenic nature not only in their genetic traits but also in their phenotypic expression. The purpose of the present study is the analysis of a wide spectrum of previously known genetic mutations in key genes related to hypertrophic cardiomyopathy (HCM), long QT syndrome (LQTS), and Brugada syndrome (BrS) development. The samples studied include cases of sudden cardiac death (SCD) in young adults and their relatives in order to identify the real impact of genetic screening of SCD in forensic cases. Genetic screening of described variation in 16 genes implicated in the development of HCM and three more genes implicated in LQTS and BrS was performed by using MassARRAY™ technology. In addition, direct sequencing of the two most prevalent genes implicated in the development of SQT type 1 and 2 was also carried out. Genetic screening allowed us to unmask four possibly pathogenic mutation carriers in the 49 SCD cases considered; carriers of mutation represent 9% (2/23) of the probands with structural anomalies found after autopsy and 7% (1/14) of the probands with structurally normal hearts after in depth autopsy protocol. One mutation was found among 12 of the recovered SCD cases considered. In people with direct family history of sudden cardiac death, but not themselves, 11 additional mutation carriers were found. Three different mutations were found in six of the 19 LQTS patients, representing three families and two different mutations were found among six patients with previous syncope. Genetic analysis in sudden cardiac death cases could help to elucidate the cause of death, but it also can help in the prevention of future deaths in families at risk. The study presented here shows the importance and relevance of genetic screening in patients with signs of cardiac hypertrophy and in family cases with more than one relative affected.



















ARTÍCULO 2: SARCOMERIC GENE MUTATIONS IN SUDDEN INFANT DEATH SYNDROME (SIDS).

AUTORES:

María Brion, Catarina Allegue, Montserrat Santori, Rocío Gil, Alejandro Blanco-Verea, Cordula Haas, Christine Bartsch, Simone Poster, Burkhard Madea, Óscar Campuzano, Ramón Brugada, Ángel Carracedo.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN:

Forensic Science International 219 (2012): 278–281. 22 February 2012

DOI:

10.1016/j.forsciint.2012.01.018

ABSTRACT:

In developed countries, sudden infant death syndrome (SIDS) represents the most prevalent cause of death in children between 1 month and 1 year of age. SIDS is a diagnosis of exclusion, a negative autopsy which requires the absence of structural organ disease. Although investigators have confirmed that a significant percentage of SIDS cases are actually channelopathies, no data have been made available as to whether other sudden cardiac death-associated diseases, such as hypertrophic cardiomyopathy (HCM), could be responsible for some cases of SIDS. The presence of a genetic mutation in the sarcomeric protein usually affects the force of contraction of the myocyte, whose weakness is compensated with progressive hypertrophy and disarray. However, it is unclear whether in the most incipient forms, that is, first years of life, the lack of these phenotypes still confers a risk of arrhythmogenesis. The main goal of the present study is to wonder whether genetic defects in the sarcomeric proteins, previously associated with HCM, could be responsible for SIDS. We have analysed 286 SIDS cases for the most common genes implicated in HCM in adults. A total of 680 mutations localised in 16 genes were analysed by semi-automated matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) using the Sequenom MassARRAY1 System. Ten subjects with completely normal hearts showed mutated alleles at nine of the genetic variants analysed, and one additional novel mutation was detected by conventional sequencing. Therefore, a genetic mutation associated with HCM may cause sudden cardiac death in the absence of an identifiable phenotype.











ANEXO AL ARTÍCULO 2: ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS EN GENES ASOCIADOS AL SÍNDROME DE QT LARGO EN UNA COHORTE DE SIDS.

OBJETIVOS

Determinar la presencia de variantes genéticas de los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*, asociados a síndrome de QT largo, en una cohorte de SIDS.

MATERIAL Y MÉTODOS

CASOS

Se genotiparon 132 muestras de ADN de casos de SIDS recogidos en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Zúrich (Zúrich, Suiza) y 43 muestras de ADN de casos de SIDS recogidos en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Colonia (Colonia, Alemania). Las muestras proceden de tejido congelado o embebido en parafina.

VARIANTES GENÉTICAS

Siguiendo la estrategia descrita por Allegue et al. 2011^[295], realizamos un barrido de 433 variantes genéticas raras y comunes en los tres genes más frecuentemente mutados en el síndrome de QT largo: *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*.

GENOTIPADO

Se utilizó la plataforma de espectrometría de masas de Sequenom MassARRAY™ (Sequenom, San Diego, CA, USA) que se basa en la discriminación alélica mediante una reacción de extensión de una única base con la tecnología IPlex Gold®, que permite realizar reacciones *multiplex* de hasta 40 variantes genéticas para, a continuación, detectar e identificar los productos de extensión en base a su masa molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El éxito de genotipado fue del 95,36% en las muestras de Zúrich y del 93,29% en las muestras de Colonia. No identificamos ninguna variante patogénica o probablemente patogénica en ningún caso. Identificamos un total de cinco variantes clasificadas como polimorfismos distribuidas en varios casos; todos ellos en el gen *SCN5A*. Estas variantes son consideradas como no patogénicas por sí mismas, aunque alguna de ellas ha sido descrita como modificador genético (P2006A[296], S1103Y[297]). Teniendo en cuenta que se estima que entre un 10 y un 15% de los casos de SIDS son debidos a canalopatías cardíacas, sorprende no haber identificado ninguna variante patogénica. No obstante, sólo hemos analizado variantes previamente descritas (la mayor parte de ellas privadas), lo cual podría explicar la ausencia de variantes patogénicas en la cohorte estudiada.



ARTÍCULO 3: BROAD-BASED MOLECULAR AUTOPSY: A POTENTIAL TOOL TO INVESTIGATE THE INVOLVEMENT OF SUBTLE CARDIAC CONDITIONS IN SUDDEN UNEXPECTED DEATH IN INFANCY AND EARLY CHILDHOOD.

AUTORES

Montserrat Santori, Alejandro Blanco-Verea, Rocío Gil, Judith Cortis, Katrin Becker, Peter M. Schneider, Angel Carracedo, María Brion.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition. *In press (2015)*.

DOI:

10.1136/archdischild-2015-308200.

ABSTRACT

Objectives: Sudden unexplained death in childhood is a tragic and traumatic event, often worsened when the cause of death cannot be determined. This work is aimed to investigate the presence of putative pathogenic genetic variants in a broad spectrum of cardiomyopathy, channelopathy and aortic disease associated genes that may have increased these children's vulnerability to sudden cardiac death. Design: We performed the molecular autopsy of 41 cases of sudden unexplained death in infants and children through massive parallel sequencing of up to 86 sudden cardiac death-related genes. Multiple *in silico* analysis were conducted together with a thorough review of the literature in order to prioritise the putative pathogenic variants. Results: A total of 63 variants in 35 cases were validated. A significant number of these variants were located within cardiomyopathy genes; despite a larger proportion of channelopathy gene variants would have been expected. Subtle microscopic features of heart tissue may indicate the presence of an early-onset cardiomyopathy as a predisposing condition to sudden unexpected death in some individuals. Conclusions: Next-generation sequencing technologies reveal the existence of a wide spectrum of rare and novel genetic variants in sarcomere genes, comparing to that of cardiac ion channels, in sudden unexplained death in infants and children. Our findings encourage further investigation of the role of early-onset inherited cardiomyopathies and other diseases involving myocardial dysfunction in these deaths. Early detection of variants in these individuals could help to unmask subtle forms of disease within their relatives, who would eventually benefit from a better genetic counselling.



























































ARTÍCULO 4: PROSPECTIVE AND RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF BARTH SYNDROME AIDED BY NEXT-GENERATION SEQUENCING.

AUTORES

María Brión, María José de Castro López, Montserrat Santori, Alejandro Pérez Muñuzuri, Bernardo López Abel, Ana María Baña Souto, María Isabel Martínez Soto, María Luz Couce.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Enviado a American Journal of Clinical Pathology.

DOI

No disponible.

ABSTRACT

Objectives: To establish the genetic diagnosis of a newborn with fetal and neonate dilated cardiomyopathy using next-generation sequencing technologies. **Methods:** We have conducted the clinical evaluation of the proband and the molecular characterization of his disease by means of whole-exome sequencing. We also performed the clinical evaluation and subsequent genetic screening of 5 relatives, two males affected with features of left ventricular non-compaction cardiomyopathy, two females suspect of being carriers, and one pregnant female at risk of being a carrier and transmitting the disease. **Results:** The discovery of a novel variant in the *TAZ* gene by whole-exome sequencing and further confirmatory clinical analyses, led to an early diagnosis of Barth syndrome in the proband; and genetic screening in his relatives revealed full variant co-segregation with other affected males and several female carriers within the family. **Conclusions:** The investigation for BTHS must be considered in male babies and young boys presenting with dilated cardiomyopathy and left-ventricular non-compaction. Next-generation sequencing technologies provide an accurate and rapid diagnosis tool, prospectively and retrospectively.



PROSPECTIVE AND RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF BARTH SYNDROME AIDED BY NEXT GENERATION SEQUENCING.

María Brión, PhD^{1*}✉; María José de Castro López, MD^{2*}; Montserrat Santori, MSc¹; Alejandro Pérez Muñuzuri, MD³; Bernardo López Abel, MD⁴; Ana María Baña Souto, MD³; María Isabel Martínez Soto, MD⁴; María Luz Couce, MD³.

¹Grupo de Xenética de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago; Red de Investigación Cardiovascular; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica; SERGAS; Santiago de Compostela, Spain. ²Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela; Santiago de Compostela, Galicia, Spain. ³Neonatal Unit, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Galicia, Spain. ⁴Pediatric Cardiac Unit, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

Objectives: To establish the genetic diagnosis of a newborn with fetal and neonate dilated cardiomyopathy using next-generation sequencing technologies. **Methods:** We have conducted the clinical evaluation of the proband and the molecular characterization of his disease by means of whole-exome sequencing. We also performed the clinical evaluation and subsequent genetic screening of 5 relatives, two males affected with features of left ventricular non-compaction cardiomyopathy, two females suspect of being carriers, and one pregnant female at risk of being a carrier and transmitting the disease. **Results:** The discovery of a novel variant in the *TAZ* gene by whole-exome sequencing and further confirmatory clinical analyses, led to an early diagnosis of Barth syndrome in the proband; and genetic screening in his relatives revealed full variant co-segregation with other affected males and several female carriers within the family. **Conclusions:** The investigation for BTHS must be considered in male babies and young boys presenting with dilated cardiomyopathy and left-ventricular non-compaction. Next-generation sequencing technologies provide an accurate and rapid diagnosis tool, prospectively and retrospectively.

KEYWORDS: Barth syndrome, next-generation sequencing, dilated cardiomyopathy, neutropenia, left ventricular non compaction, early diagnosis.

* Equal contributors. ✉ Corresponding author.

INTRODUCTION

Barth syndrome (BTHS; OMIM #302060) is widely considered a rare disorder estimated to be present in 1 of every 300,000-400,000 births in the United States, according to data of the Barth Syndrome Foundation (<http://www.barthsyndrome.org/>). The cardinal features of this multiorgan disorder include several forms of cardiomyopathy, neutropenia (chronic, cyclic, or intermittent), poor development of locomotor and visceral musculature, stunting, exercise intolerance, abnormal cardiolipin, and 3-methylglutaconic aciduria in a variable combination^[307]. Furthermore, it has recently been described as an unrecognized cause of miscarriage and stillbirth^[308]. In 2012, 151 living BTHS patients were reported worldwide,

since the estimated prevalence of the disease is very low^[309]. However, it is probably under-diagnosed, as data from the Pediatric Cardiomyopathy Registry of the United States suggest that 3-5% of all boys with cardiomyopathy may have BTHS^[94]. This ratio is probably higher in the dilated and non-compacted forms. The primary gene defects beneath BTHS are mutations in the *TAZ* gene which is located in Xq28 and comprises 11 exons^[310]. The *TAZ* gene encodes a protein involved in the translation of cardiolipin, the tafazzin, a component of the mitochondrial membrane which has been shown to play an essential role in cardiac development and function^[311-313]. To date, approximately 160 different mutations have been identified in this gene including missense, nonsense, splicing and frameshift mutations (Human *TAZ* Gene Variants Database, <http://www.barthssyndrome.org/>; accessed March 31st, 2015); however, no genotype/phenotype correlation has so far been established and there may be a wide clinical variation between males within a family^[314-317]. Herein we report the case of a newborn with severe foetal dilated cardiomyopathy (DCM) that was immediately referred to the Genome Medicine Unit for genetic testing. Whole-exome sequencing of the proband together with confirmatory laboratory tests, and pedigree analysis that aided to accurately phenotype the family, led to a diagnosis of BTHS in the proband and two male relatives with milder signs of the disease caused by a novel mutation of the *TAZ* gene, and to establish five female relatives as mutation carriers, two of them determined by genetic screening and the other three as obligate carriers by pedigree analysis.

MATERIAL AND METHODS

ETHICAL CONSIDERATIONS

This study was developed according to the recommendations of the Helsinki Declaration and approved by the local Ethical Committee of the Galician Health Service. We obtained written informed consent from the parents of the proband (who is currently 2 years old) and the rest of the participants in accordance with the Institutional Review Board.

STUDY SUBJECTS AND CLINICAL CHARACTERISTICS

Figure 1 shows the pedigree of the family analysed. The proband (individual IV.4) is the first-born to non-consanguineous parents after 38 weeks of gestation by vacuum delivery. Routine prenatal ultrasound examination at 33 weeks showed foetal DCM. At birth, the proband manifested hypotonia, cyanosis, and bradycardia requiring endotracheal intubation. The Apgar test result was 5/7/7; and his weight was 2.8 kg (10-25th percentile). Therefore, he was transferred to the Neonatal Intensive Care Unit where echocardiography confirmed DCM and reduced systolic function, with a shortening fraction of 16%; interventricular septal end-diastolic dimension (IVSd) of, 3.6 mm; end-diastolic dimension of the left ventricle (LVEDD) of 28.3 mm; and left ventricular end-diastolic posterior wall dimension (LVPWd) of 4 mm. Inotropic, vasodilator, and diuretic therapies were immediately started, subsequently obtaining hemodynamic stabilization, followed by a slow improvement of the cardiac function. The case was immediately referred to the Genome Medicine Unit for genetic

counselling, review of the family history and plotting of the pedigree; and risk assessment of relatives who may be susceptible of a genetic disorder. On following echocardiograms, as dilatation diminished, a spongiform and trabeculated pattern of the left ventricle was observed (Image 1). Laboratory tests were carried out after the genetic testing for definitive confirmation of the genetic diagnosis obtained with the variant prioritization process. The proband was successfully extubated on the 15th day of life, requiring maintenance treatment with digoxin, captopril, propranolol and furosemide. As a consequence of the good response to therapy, the infant was discharged from hospital on the second month of life. Currently, the proband is two years old and weights 10 kg (20th percentile). He still exhibits severe intermittent neutropenia for which he requires granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration; and DCM with moderate systolic dysfunction (shortening fraction 25%); and is now maintained on Captopril and Carvedilol therapy. The second patient (individual III.5) is a 38-year-old male who had been hospitalized during the neonatal period in France requiring intensive care. The diagnosis made at discharge from the hospital was myocarditis probably caused by a coxsackie virus infection as an elevation of antibody levels against coxsackie B4 was observed. He received steroid treatment during the acute phase and was on Digoxin for many years, and is currently maintained on a beta-blocker therapy. Echocardiography studies showed non-compaction of both ventricles with normal systolic function. Results from several laboratory tests performed during the two years prior to the present study showed neutropenia. The third patient (individual III.7) is a 28-year-old male, and individual III.5's younger brother. He was a healthy newborn with no medical complications until the second year of life when he was hospitalized due to a myocarditis. However, no microbiological cause was found. At present, he remains asymptomatic. Echocardiography studies showed hypertrophied and spongiform trabeculated pattern of both ventricles, as seen in left ventricular non compaction cardiomyopathy (LVNC), without impairment of cardiac function. Individual III.16 is the proband's mother, a healthy woman with no relevant personal medical history except for miscarriage at 9 weeks during her first pregnancy. Individual III.2 is a woman diagnosed with Wolff-Parkinson-White syndrome (WPW) and affected with DCM, otherwise associated with WPW. Her son died of DCM (no specimen was available for the study of the deceased individual). Individual III.19 is a healthy woman who voluntarily entered the carrier genetic screening after undergoing genetic counseling because she was pregnant at that moment.

MOLECULAR STUDIES

TARGETED EXOME CAPTURE AND NEXT GENERATION SEQUENCING

Genomic DNA was extracted from leukocytes isolated from peripheral blood samples using standard procedures of the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). 3 µg of genomic DNA from the proband were used for Exome enrichment (51.2 Mb of genomic sequence) using the SureSelect^{XT} Human All Exon version 4 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) following the manufacturer's protocol. The exome library

was then sequenced on a 5500 SOLiD™ System (Life Technologies Foster City, CA, USA), together with five additional samples, as pair-end sequencing reads (75 plus 25 bp). Colour space reads were mapped to the [GRCh37/hg19] reference genome using the LifeScope software version 2.5.1 (Life Technologies). Finally, variants were identified using the GATK version 2.1 (Genome Analysis Toolkit, Broad Institute, Boston, MA, USA) along with the Picard tools version 1.77 or the LifeScope version 2.5.1 (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and annotated with the ANNOVAR version 2012Mar08. Exome variants detected in the proband were filtered using several pre-established criteria^[318]. Non-coding and non-splicing variants or those present in the dbSNPv130, synonymous substitutions, variants with a frequency above 1 in 2000 in the European population of the Exome Variant Server Database (ESV) from the NHLBI Exome Sequencing Project or with less than 20% of mutated allele reads, and regions with coverage below 40x were excluded. Finally, attention was focused on the filtered variants located in genes previously related to cardiomyopathies. The prioritization diagram applied in order to identify a possible pathogenic mutation, and the number of variants remaining after each step of the filtering process, are detailed in Table 1.

VARIANT CONFIRMATION

Confirmation of the selected variant and genetic screening of the remaining family members was performed through capillary sequencing in both sense and antisense directions. Primers for amplification and sequencing were designed using the Primer3 program (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) based on the isoform [NM_000116] and provided by Metabion (Metabion International AG, Martinsried, Germany) with the following sequences: 5'-ACCCTCTCCATCCCGTCAC-3' and 5'-GTCTAAAAGCCACGTTTGAGC-3'; sense and antisense, respectively. Sequencing was performed using the BigDye Terminator chemistry version 3.1 (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and the resulting products were purified with the ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), and filtration. Finally, they were analyzed using an ABI 3730 genetic analyzer and the sequence analysis software SeqScape™ version 2.5 (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

RESULTS

Whole-exome sequencing of the proband of the family generated 11.61 Gb of mappable sequence data. The 85.56% of the total reads produced were mapped to the reference human coding exome with a mean coverage of 166.09x. From all of the results, LifeScope identified an average of 51,798 genetic variants while the GATK version 2.1 registered an average of 82,251 genetic variants. Table 1 summarizes the whole-exome sequencing variant filtering process carried out in our laboratory. After the prioritization process and under the assumption of a possible X-linked inheritance model, both the GATK and the LifeScope recognized a novel missense variant in exon 10 of the *TAZ* gene (Figure 2). The transversion c. 800C>A [NM_000116] is a heterozygous nonsynonymous mutation that affects an evolutionarily conserved position inducing a substitution of threonine by lysine

(p.Thr267Lys), which is predicted to have a functional impact by multiple *in silico* prediction programs (Table 2). This variant was not present in over 12,000 chromosomes in the ESV, (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>; accessed March 31st, 2015), the Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; accessed March 31st, 2015), or any other database of the Locus Specific Database list (http://grenada.lumc.nl/LSDB_list/lstdbs; accessed March 31st, 2015), including the one maintained by the Barth Syndrome Foundation. No other real mutations were found in genes closely related to the development of cardiomyopathies.

Sanger sequencing confirmed the proband as a carrier of the potential pathogenic variant identified by next generation sequencing. After the genetic testing, relevant results arose from the laboratory tests, revealing the presence of cyclic neutropenia with no elevation of the 3-methylglutaconic acid or the 3-methylglutaric acid in the urine. Thus, a clinical diagnosis of BTHS started to be considered. Sequencing of exon 10 of the *TAZ* gene in 5 family members suspect of having the same disease (males) or being healthy carriers (females) showed the presence of the mutation in 4 of them; two men with the diagnosis of non-compaction cardiomyopathy showed the mutation in hemizygosis and two women were carriers of the mutation in heterozygosis (Figures 1 and 2). Pedigree analysis further established three healthy women of generation II as obligate carriers.

DISCUSSION

Dilated cardiomyopathy is a severe myocardial disease that can manifest both as a primary disorder and a symptom of an underlying pathology^[80]. Due to progressive heart failure, many children do not overcome the infancy and those who survive require an intensive medical surveillance and therapy, often including heart transplantation^[94]. The proband had fetal onset of DCM, a sign of BTHS that was first demonstrated by Cardonick et al.^[319]. Initially, he showed severe left ventricular dilatation and systolic dysfunction and only when some improvement was achieved, he also showed signs of LVNC. Barth syndrome usually has features of DCM, in half of the cases it manifests with prominent trabeculation as seen in LVNC, and less frequently reported, as hypertrophic cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis^[320]. Time of onset is also variable, from the beginning of the foetal period (including miscarriage and stillbirth^[308]) to asymptomatic adults^[309]. Environmental and genetic modifiers may be responsible for this variability^[234, 244]. There are still many unanswered questions regarding this point^[321, 322]. The family of our study showed several variable phenotypes, including severe DCM, neutropenia, hypotonia, features of LVNC and myocarditis, and probably, although not definitely, miscarriage. With the identification of a genetic variant within the *TAZ* gene that had not been previously described, plus all the pathological signs showed by the proband and affected individuals, and the results of the laboratory analyses, the diagnosis of BTHS was finally established. Mutations in the *TAZ* gene are, currently, the only genetic defect associated to this syndrome^[310]. We have identified a novel variant in this gene, c.800C>A, which affects a highly conserved residue, p.Thr267Lys

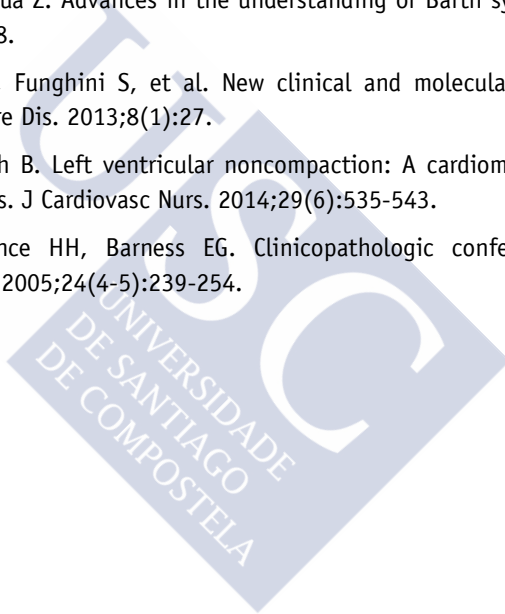
that appears to be present in at least 20 vertebrates from zebrafish to humans. This putative pathogenic variant fully co-segregated with affected relatives and female obligate carriers, following an X-linked inheritance pattern. Individuals III.5 and III.7 showed signs of non-compaction cardiomyopathy affecting both ventricles and myocarditis, which, together with DCM are the most common presenting features of cardiomyopathy in BTHS^[316]. The son of individual III.2 died of DCM, which is most likely associated to the *TAZ* variant regardless of the WPW diagnosis of his mother, according to the X-linked inheritance pattern observed within the family. The proband's mother, individual III.16, had a miscarriage at 9 weeks during her first pregnancy; although the sex of the miscarried foetus is unknown, this event might be directly related to the mutation in *TAZ* and BTHS if it was a male, as it has been previously stated^[308]. Another female, individual II.9, lost a son due to DCM and cardiogenic shock at age 13 years. However, we are unaware of their genetic conditions as it was not possible to subject any of them to genetic screening, although the phenotype matches the X-linked inheritance pattern of the *TAZ* mutation. Barth Syndrome is probably one of the few cardiomyopathies that can be pre-natally recognized with imaging^[323]. Unfortunately, there is often a significant delay in diagnosing patients with cardiomyopathy and BTHS. Data from the Barth Syndrome Foundation Registry shows a mean lag time of 3.3 years between first presentation and diagnosis of BTHS^[314]. Early diagnosis is essential as the mortality rate decreases from 70% to 10% when the patient is identified as soon as the symptomatology manifests^[324]. A female relative, individual III.19, was referred for genetic counselling due to her pregnancy and subsequently entered the study, but she was finally found to be non-carrier of the mutation, and consequently dismissed from further cardiac follow-up. Genetic testing in the proband and screening in relatives may help to determine the risk of BTHS in the proband and immediate family, and reduce the early mortality rates of this disorder. In this regard, next-generation sequencing appears as a helpful and cost and time effective tool for the diagnosis of certain Mendelian diseases such as BTHS, since the whole genetic profile from an individual can be obtained in a short time, in an affordable manner, with a small DNA specimen. However, such amounts of information might eventually be confusing as hundreds of variants of uncertain significance can be detected in each individual. The need for an accurate phenotyping of the individual and relatives at potential risk is a key for the process of filtering and variant prioritization, and the achievement of an accurate genetic diagnosis too. Genetic testing of the proband by a candidate-gene approach performed with conventional direct sequencing, however, would have been much more expensive and time consuming, considering that there are over 30 genes associated to DCM (first sign of the disease shown by the proband), and *TAZ* is not considered one of the main contributors to the total number of patients of DCM^[80], which would have enormously delayed the genetic diagnosis of BTHS. In conclusion, we have identified a novel mutation of *TAZ* in a family with different features of BTHS by means of whole-exome sequencing of the index case, a newborn with prenatal onset of DCM. Genomic diagnosis, together with accurate clinical and biochemical phenotyping is a useful tool for ascertaining the genetic background of Mendelian diseases such as BTHS. Investigations for BTHS should be considered as essential

in males presenting with DCM or LVNC during the neonatal period and the first years of life. Also, genetic screening of the relatives can prevent undesired events by uncovering mutation carriers that should follow genetic counselling in the future.

REFERENCES

1. Jefferies JL. Barth syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2013;163(3):198-205.
2. Steward CG, Newbury-Ecob RA, Hastings R, et al. Barth syndrome: An X-linked cause of fetal cardiomyopathy and stillbirth. *Prenatal Diagn*. 2010;30(10):970-976.
3. Clarke S, Bowron A, Gonzalez IL, et al. Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:23.
4. Wilkinson JD, Landy DC, Colan SD, et al. The Pediatric Cardiomyopathy Registry and Heart Failure: Key results from the first 15 years. *Heart Fail Clin*. 2010;6(4):401-413.
5. Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D. A novel X-linked gene, G4.5 is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet*. 1996;12(4):385-389.
6. Dudek J, Cheng IF, Balleininger M, et al. Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Research*. 2013;11(2):806-819.
7. Raval KK, Kamp TJ. Cardiomyopathy, mitochondria and Barth syndrome: iPSCs reveal a connection. *Nat Med*. 2014;20(6):585-586.
8. Khuchua Z, Yue Z, Batts L, Strauss AW. A zebrafish model of human Barth syndrome reveals the essential role of tafazzin in cardiac development and function. *Circul Res*. 2006;99(2):201-208.
9. Roberts AE, Nixon C, Steward CG, et al. The Barth Syndrome Registry: Distinguishing disease characteristics and growth data from a longitudinal study. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(11):2726-2732.
10. Johnston J, Kelley RI, Feigenbaum A, et al. Mutation characterization and genotype-phenotype correlation in Barth syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 1997;61(5):1053-1058.
11. Spencer CT, Bryant RM, Day J, et al. Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome. *Pediatrics*. 2006;118(2):e337-e346.
12. Momoi N, Chang B, Takeda I, Aoyagi Y, Endo K, Ichida F. Differing clinical courses and outcomes in two siblings with Barth syndrome and left ventricular noncompaction. *Eur J Pediatr*. 2012;171(3):515-520.
13. Hoischen A, van Bon BWM, Rodriguez-Santiago B, et al. De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet*. 2011;43(8):729-731.

14. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: The complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(9):531-547.
15. Cardonick EH, Kuhlman K, Ganz E, Pagotto LT. Prenatal clinical expression of 3-methylglutaconic aciduria: Barth syndrome. *Prenatal Diagn.* 1997;17(10):983-988.
16. Adès LC, Gedeon AK, Wilson MJ, et al. Barth syndrome: Clinical features and confirmation of gene localisation to distal Xq28. *Am J Med Genet.* 1993;45(3):327-334.
17. Dipple KM, McCabe ERB. Modifier genes convert “simple” Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):43-50.
18. Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: A marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(2):182-190.
19. Aprikyan AA, Khuchua Z. Advances in the understanding of Barth syndrome. *Br J Haematol.* 2013;161(3):330-338.
20. Ferri L, Donati MA, Funghini S, et al. New clinical and molecular insights on Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8(1):27.
21. Summers J, Mikolich B. Left ventricular noncompaction: A cardiomyopathy with distinct characteristics and risks. *J Cardiovasc Nurs.* 2014;29(6):535-543.
22. Huhta JC, Pomerance HH, Barness EG. Clinicopathologic conference: Barth syndrome. *Fetal Pediatr Pathol.* 2005;24(4-5):239-254.



TABLES

Table 1. Whole-exome sequencing summary.

Filters	Number of variants GATK	Number of variants LifeScope
Total variants	82251	51798
Exonic and SS variants	19912	16069
NS, SS and FS variants	9485	9085
Unknown SNP variants (absence in dbSNP130)	919	1062
>20% mutated allele	863	777
Novel/rare variants (ESP5400_EA, MAF<0,0005)	850	769
Located in genes previously related with cardiomyopathies	6	2
Real variants with a compensated number of reads in each direction	1	1

Number of variants present in the proband at the different stages of the filtering process of the results obtained from each annotation platform (GATK or Lifescope). NS, nonsynonymous variants; SS, splice-site variants; FS, frameshift variants; SNP, single nucleotide polymorphism; ESP, Exome Sequencing Project; EA, European-American origin; MAF, minimum allele frequency.



Table 2. Variant description.

Attribute	Description
-Genomic DNA position [GRCh37/hg19]	chrX:153649264
-cDNA position	c.800
-Nucleotide change	C > A
-Protein position	p.267
-Amino acid change	Threonine > Lysine
<i>In silico</i> prediction:	
- Polyphen2	Probably damaging (1.000)
- SIFT	Deleterious (score: 0.01)
- Mutation Prediction	Probability of deleterious mutation =0.648
- Mutation Taster	Disease causing (<i>p</i> -value=1)
Nucleotide conservation:	
- PhyloP	4.56 [-14.1;6.4]
Physicochemical distance amino acids:	
- Grantham distance	Moderate (78 [0-215])

General information relative to location and prediction of pathogenicity of the new variant identified in the *TAZ* gene [NM_000116].

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Pedigree of the family. Solid symbols indicate clinically affected individuals; dot-filled symbols indicate carriers; and empty symbols represent otherwise healthy individuals. Deceased individuals are represented with a forward slash. An unborn individual (miscarried fetus) is represented by a triangle, while a diamond represents a living fetus of unknown sex. Interrogation symbols indicate unawareness of the genetic conditions of individuals IV.3, II.9 and the individual who transmitted the variant in generation I, respectively.

Figure 2. Confirmation of the TAZc.800C>A variant by Sanger sequencing. A) Normal allele; B) hemizygous male carrier, and C) heterozygous female carrier.

Image 1. Cardiac imaging. A) Echocardiogram of the proband showing color images of intraparietal flow. B) Cardiac magnetic resonance showing prominent apical trabeculation with a 3:1 ratio of noncompacted to compacted left ventricular myocardium.



FIGURE 1: PEDIGREE OF THE FAMILY

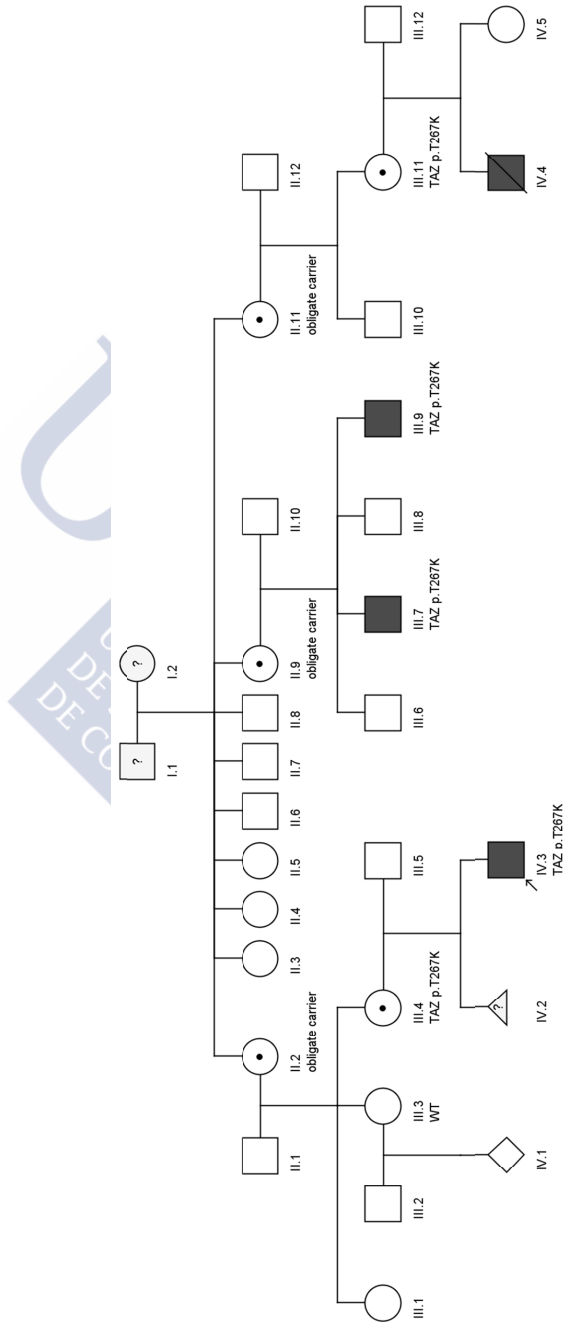
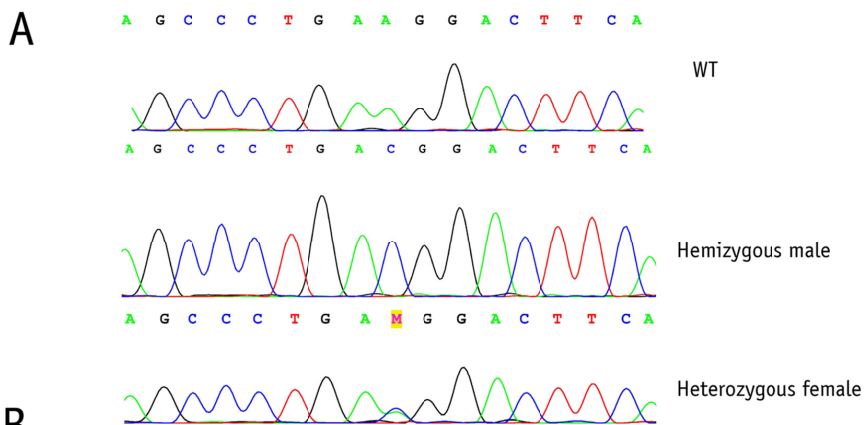


FIGURE 2: CONFIRMATION OF THE TAZc.800C>A VARIANT BY SANGER SEQUENCING

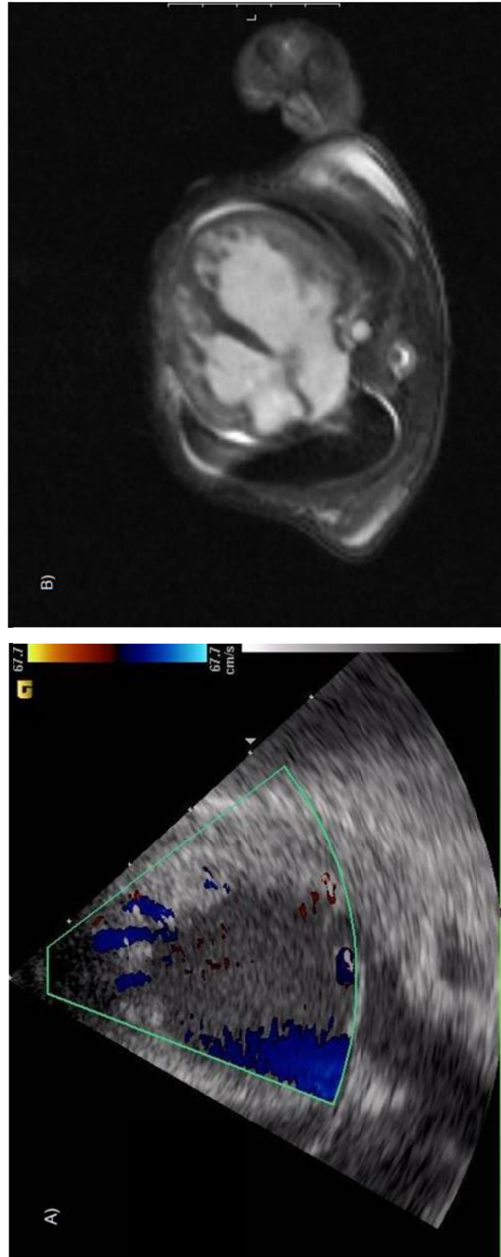


B

<i>Homo sapiens</i>	256	---	NKSAV	-----	EMRKAL	T	DFIQEEFQHLKT	-----	279
<i>Macaca mulatta</i>	226	---	NKSAV	-----	EMRKAL	T	DFIQEEFQRLKT	-----	249
<i>Canis lupus</i>	255	---	NKSAV	-----	EMRKAL	T	DFIQEEFQRLKV	-----	278
<i>Bos taurus</i>	226	---	NKSAV	-----	EMRKAL	T	DFIQEEFQRLKS	-----	249
<i>Mus musculus</i>	227	---	NKSAV	-----	EMRKAL	T	DFIQEEFQRLKM	-----	250
<i>Rattus norvegicus</i>	226	---	NKSAV	-----	EMRKAL	T	DFIQEEFQRLKM	-----	249
<i>Danio rerio</i>	226	---	NTNPT	-----	EMRKV	T	DYIQEEFRSLKA	-----	249
<i>Drosophila melanogaster</i>	245	---	QVPEP	-----	TARKL	I	TDKIQAERDLRA	-----	268
<i>Anopheles gambiae</i>	254	---	PVSEE	-----	EARKQ	I	TDRIQEEMMLKQ	-----	277
<i>Caenorhabditis elegans</i>	239	---	SLTTE	-----	QMRKI	I	DEVQTRMYQLGE	-----	262



FIGURE 3: CARDIAC IMAGING.



ARTÍCULO 5: GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION OF THE EPISTATIC INTERACTIONS BETWEEN A NOVEL RARE VARIANT AND A COMMON POLYMORPHISM IN *KCNH2* LINKED TO SUDDEN UNEXPLAINED INFANT DEATH AND ATRIAL FIBRILLATION IN A FAMILY.

AUTORES

Montserrat Santori, Rocío Gil, Alejandro Blanco-Verea, Helena Riuró, Guillermo J. Pérez, Fabiana S. Scornik, Ramón Brugada, Ángel Carracedo, María Brion.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Manuscrito en preparación.

DOI

No disponible.

ABSTRACT

Background: Sudden unexpected death in infancy is a worldwide major cause of death in children under one year of age. Molecular studies have demonstrated that cardiac ion channelopathies are responsible for a significant number of these episodes. **Methods and Results:** DNA sequencing of *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* genes in a 4-month old sudden unexpected death in infancy (SUDI) victim revealed a novel missense heterozygous mutation (V483I) and a common missense homozygous polymorphism (K897T) in *KCNH2*. However, all relatives carrying the mutation V483I were heterozygous for the polymorphism K897T. Electrophysiological characterisation of two types of recombinant HERG channels representing two different genotypes within the family, showed significant differences in both voltage and time dependence of activation and inactivation with a global gain-of-function effect of mutant *versus* wild type channels, but also differences between both types of recombinant channels. **Conclusions:** A novel gain-of-function mutation in *KCNH2* may be responsible for SUDI, atrial fibrillation and syncope episodes in a family. The polymorphism K897T is acting as a genetic modifier of the mutation, both in heterozygosis and homozygosis, although a stronger genotype-phenotype correlation is observed for the combination of the mutation with the homozygous state of the polymorphism.



GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION OF THE EPISTATIC INTERACTIONS BETWEEN A NOVEL RARE VARIANT AND A COMMON POLYMORPHISM IN *KCNH2* LINKED TO SUDDEN UNEXPLAINED INFANT DEATH AND ATRIAL FIBRILLATION IN A FAMILY.

Montserrat Santori^{1,a,b,c}, Rocío Gil^{1,a,b,c}, Alejandro Blanco-Verea^{1,a,b,c}, Helena Riuró^{1,d,e}, Guillermo J. Pérez^{1,d,e}, Fabiana S. Scornik^{1,d,e}, Ramón Brugada^{1,d,e}, Ángel Carracedo^{1,b,c,f,g}, María Brion^{1,a,b,c,h}.

¹This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

^aXenética de Enfermidades Cardiovasculares, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, Santiago De Compostela, Spain. Red de Investigación Cardiovascular (RIC). ^bGrupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. ^cFundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Servizo Galego de Saúde (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain. ^dCardiovascular Genetics Center, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, Girona, Spain. ^eDepartment of Medical Sciences, Medical School, Universitat de Girona, Girona, Spain. ^fGrupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Santiago de Compostela, Spain. ^gCenter of Excellence in Genomic Medicine Research, King Abdulaziz University Jeddah, Kingdom of Saudi Arabia.

Background: Sudden unexpected death in infancy is a worldwide major cause of death in children under one year of age. Molecular studies have demonstrated that cardiac ion channelopathies are responsible for a significant number of these episodes. **Methods and Results:** DNA sequencing of *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* genes in a 4-month old sudden unexpected death in infancy (SUDI) victim revealed a novel missense heterozygous mutation (V483I) and a common missense homozygous polymorphism (K897T) in *KCNH2*. However, all relatives carrying the mutation V483I were heterozygous for the polymorphism K897T. Electrophysiological characterisation of two types of recombinant HERG channels representing two different genotypes within the family, showed significant differences in both voltage and time dependence of activation and inactivation with a global gain-of-function effect of mutant *versus* wild type channels, but also differences between both types of recombinant channels. **Conclusions:** A novel gain-of-function mutation in *KCNH2* may be responsible for SUDI, atrial fibrillation and syncope episodes in a family. The polymorphism K897T is acting as a genetic modifier of the mutation, both in heterozygosis and homozygosis, although a stronger genotype-phenotype correlation is observed for the combination of the mutation with the homozygous state of the polymorphism.

KEY WORDS: HERG, electrophysiology, sudden unexpected death in infancy, genetics, atrial fibrillation, syncope.

1. INTRODUCTION

The loss of a child in unexplained circumstances is a devastating event for the family and immediate community. Unfortunately, the incidence of sudden unexpected death in infancy (SUDI) –occurring in the first year of life- is up to several tenfold than that of the sudden cardiac death in children above 1 year of age and adults, and represents the leading cause of post-neonatal mortality ^[5, 19, 325]. The underlying pathophysiological mechanisms behind these deaths are still poorly understood. However, it is currently accepted that cardiac channelopathies may explain approximately 10% of SUDI cases. Moreover, cardiac ion channel variants are currently the best established genetic contributor to SUDI ^[204]. The human ether-à-go-go-related gene (HERG) voltage-gated channel, encoded by *KCNH2* mediates the rapid component of the delayed rectifier potassium current I_{Kr} during phase 3 (or rapid repolarization) of the action potential (AP) ^[293]. Mutations in *KCNH2* have been associated with LQTS type 2 ^[162] and familial short QT syndrome (SQTS) type 1, sometimes involving SUDI and near-SUDI cases ^[326], and presenting overlapping atrial fibrillation (AF) ^[327]. However, phenotype variability within members of a same family is thought to be attributable to the possible coexistence of other genetic variants, including common single nucleotide polymorphisms (SNP) ^[221, 328]. Current HRS/EHRA/APHRS Expert Consensus Recommendations on Sudden Unexplained Death in Infancy ^[5] stipulate that an arrhythmia syndrome focused molecular autopsy can be useful for all SUDI victims and genetic screening of the first-degree relatives of a SUDI victim is recommended whenever a pathogenic mutation in a gene associated with increased risk of sudden death is identified in the SUDI victim. In combination with familial clinical evaluation, genetic testing appears to be an appropriate approach to unmask an underlying cardiac condition in the family. Here, we present a case report of a family in which a novel mutation in combination with a common polymorphism in *KCNH2* gene leads to a global gain-of-function of the HERG channel with possible involvement in familial AF, a SQTS-like mechanism, and SUDI; and discuss how penetrance and variable expressivity may explain the different phenotypes observed within family members.

2. METHODS

2.1. ETHICAL CONSIDERATIONS.

This study was developed according to the recommendations of the Helsinki Declaration and approved by the local Ethical Committee of the Galician Health Service. We obtained written informed consent from the parents of the proband (who is currently 2 years old) and the rest of the participants in accordance with the Institutional Review Board.

2.2. GENETIC ANALYSIS

Genomic DNA was extracted from the deceased's autopsy peripheral blood lymphocytes using a Tris-EDTA/SDS cell lysis solution and posterior proteinase K- based nuclease

denaturation, followed by a series of phenol-chloroform purification steps for separating the aqueous phase containing genomic DNA and a last step consisting of an addition of pure ethanol to precipitate the it and recover it. The yield of the extraction was quantified using both NanoDrop 1000[®] spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and Qubit[®] Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All exons and intron-exon boundaries of *KCNQ1* (NM_000218.2), *KCNH2* (NM_000238.3) and *SCN5A* (NM_198056.2) genes were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using AmpliTaq[®] Gold DNA Polymerase with GeneAmp[®] 10X PCR Buffer on a Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were purified with MultiScreen[®] PCR_{μ96} Filter Plates (Millipore, Billerica, MA, USA) prior to the sequencing reaction with BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Post-sequencing purifications were carried out using Illustra[™] Shrimp Alkaline Phosphatase, (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore, Billerica, MA, USA). Finally, the capillary electrophoresis was conducted using an ABI 3730 genetic analyser and electropherograms were analysed with SeqScape[®] Software v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2.3. CLINICAL EVALUATION

According to the findings on the genetic analysis, the infant's direct relatives were selectively evaluated for their cardiac function by electrocardiography (ECG), echocardiography, magnetic resonance imaging (MRI), Holter monitor and cardiac stress tests, looking for any evidence of cardiac arrhythmia or structure alterations.

2.4. PLASMID CONSTRUCTS AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

KCNH2-pcDNA3.1 and *GFP*-pcDNA3.1 plasmids were kindly donated by Dr. Kirstine Callø (University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark). We constructed two new plasmids from the original plasmid *KCNH2*-pcDNA3.1 by selectively combining the two single nucleotide variants (SNV) of interest, mimicking the alleles carried by the family members involved in the study: *KCNH2*^{V483I-K897T} and *KCNH2*^{K897T}. The original plasmid remained as the wild type (WT) allele, *KCNH2*^{WT}. The mutagenesis process was performed with a PCR reaction using the QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis system (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and the following primers: 5'-CAACGAGGAGGTGATCAGCCACCCCGG-3', 5'-CCGGGTGGCTGATCACCTCCTCGTTG-3' (for V483I) and 5'-GCAGGCGCACGGACACGGACACGG-3', 5'-CCGTGTCGTGTCCTGCGCCTGC-3' (for K897T). Primer sequences are given for each variant as forward and reverse, respectively. Plasmid DNA was amplified in competent DH5α *Escherichia coli* bacteria and subsequently extracted and verified by direct sequencing.

2.5. CELL CULTURES AND TRANSFECTION

Experiments were performed on human embryonic kidney (HEK) 293 cells (European Collection of Cell Cultures, ECACC) grown in Minimum Essential Medium Eagle supplemented

with 10% Fetal Bovine Serum (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% Penicillin-Streptomycin and 1% Glutamax[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C and 5% CO₂. HEK 293 cells were transiently transfected using GeneCellin[™] Transfection Reagent (BioCellChallenge, France) or Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer’s specifications, reproduce the three different genotypes involving the two SNVs under study, and including the WT genotype. Therefore, three different products resulted from combining the above described plasmids. To simplify the nomenclature, we designated abbreviated names to the recombinant products of *KCNH2* as follows (subscripts “HT” and “HM” mean heterozygous and homozygous, respectively): HERG-WT, for the products of *KCNH2*^{WT}; HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} for the combined products of *KCNH2*^{V483I-K897T} and *KCNH2*^{WT}; and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} for the combined products of *KCNH2*^{V483I-K897T} and *KCNH2*^{K897T}. Green Fluorescent Protein (GFP) signal given out by co-transfected *GFP* plasmids allowed identification of positive cell transfection. Forty-eight hours after transfection, cells were collected to perform electrophysiological experiments.

2.6. ELECTROPHYSIOLOGY

Potassium currents were recorded from single cells at room temperature using the whole cell patch-clamp technique [329]. Voltage clamp experiments were controlled and analysed with an Axopatch[™] 200B amplifier and pCLAMP[™] 10.2/Digidata 1440A Data Acquisition System (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and, OriginPro8 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Pipettes were pulled from $\emptyset = 1.15$ mm capillary tubes (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany) using a micropipette puller (Narishige Co. Ltd, Tokyo, Japan). Their resistance ranged from 2.9 – 3.8 M Ω when filled with a solution compound of (in mM): 130 K-Aspartate, 10 NaCl, 10 HEPES, 1 EGTA and 2 ATP Mg²⁺ (pH 7.2 with KOH). The bath solution contained (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 10 HEPES, 1.2 MgCl₂, and 1.8 CaCl₂ (pH 7.4 with NaOH). Osmolality was adjusted by adding glucose to 326 mOsm and 310 mOsm for bath and pipette solution, respectively.

2.7. STATISTICS

Statistical analyses were performed using Origin 8 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA) and GraphPad Prism software (GraphPad software, La Jolla, CA). Mean values are expressed as mean \pm standard error (SE). Statistical comparisons were performed using the unpaired Student’s t-test, and for multiple comparisons ANOVA with post-hoc Bonferroni. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. CLINICAL FINDINGS:

The proband (individual IV.1, Figure 1A), is a 4-month-old male infant who was found dead while sleeping on his cot at the nursery. The *post-mortem* investigation did not reveal

any evidence of negligence nor violent death and according to the forensic autopsy report it was classified as SUDI. The infant never manifested any symptoms of a previous cardiac disease; neither did his parents. However, the infant's grandmother (individual II.4) and great-grandfather (individual I.2) were diagnosed with paroxysmal AF. Individual II.4 is the only child of a marriage that suffered three abortions; one of them due to ectopic pregnancy. This individual is currently a 60 year-old woman who reported up to five episodes of AF and a history of syncope events for which she was admitted at the intensive care unit in several occasions. She also has a history of hypertension concomitant with thyroid cancer, but since she underwent a total thyroidectomy in 2007 and AF has persisted afterwards in absence of hypertension, this was not considered the cause. Her first child was a stillborn girl at full term, 37 years ago. During her clinical evaluation, the blood pressure was normal, MRI showed moderate dilatation of the left ventricle (83 × 50 mm) with no evidence of hypertrophy, and ventricular ejection fraction of 54%. She is currently undergoing flecainide treatment. Individuals III.3 and III.6 showed normal heart dimensions during the clinical evaluation and ejection fractions of 70% and 55%, respectively. Individual III.5 refused to undergo clinical evaluation. All members of the generation III are healthy individuals younger than 32 years-old. The family has reported up to 11 cases of SUDI, perinatal deaths, and stillbirths within earlier generations although no medical history is available, to our knowledge.

3.2. GENETIC TEST:

As a result of the genetic analysis of the proband, a novel heterozygous missense SNV was found on the exon 6 of *KCNH2* gene, c.1447G>A, that entails the amino acid substitution V483I at the S2-S3 intracellular loop of the protein. This SNV was absent in all the consulted databases, such as Exome Variant Server (EVS, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>) and HGMD® (<http://www.biobase-international.com/product/hgmd>). In addition, another missense variant was found in homozygosis in the same gene; a known common polymorphism, c.2690A>C (rs1805123) which leads to the amino acid substitution K897T at the C-terminal domain of the protein. The outcome of the genetic test performed to the index case's closest relatives for these SNVs revealed that both V483I and K897T variants were inherited in the same allele throughout the maternal family line, where members II.4, III.3, III.5 and III.6 are carriers, members II.5 and III.2 do not carry any of the SNVs and member III.1 was a stillborn child in 1978, therefore, not included in the study. The proband's father, member III.4, carries one copy of the K897T allele but none of V483I. We have not tested members I.1 and I.2, but since I.1 is a healthy 90 year-old woman and I.2 was affected of AF, he was likely a carrier. *In silico* tool PolyPhen2^[302] (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) predicted that the mutation is possibly damaging (score 0.880), and the sequence alignment showed a conserved domain among several species such as chimpanzee, dog, mouse, rat, cow and zebrafish (Figure 1B).

3.3. ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF THE CHANNEL:

We performed co-expression studies to assess the functionality of the heterotetrameric co-assembly involving the two possible allele products carried by any individual in the family studied. In this sense, we characterised the electrophysiological properties of recombinant HERG channels and compared them to WT homotetrameric channels.

Inward rectification is a hallmark of HERG channels ^[293, 330, 331]. We first investigated if any of the variants studied affected this property. We measured tail currents elicited by a two-step protocol (Figure 2, inset), from HERG-WT, HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} transfected cells. Normalised peak currents were plotted against test pulse. Instantaneous *I-V* plots followed the typical inward rectification observed for HERG channels ^[330], which was not altered in any of the genetic conditions studied.

To analyse a possible effect of recombinant HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels on the voltage dependence of the steady state current activation and inactivation respect to HERG-WT channels, we recorded currents elicited by two different protocols. Representative tail current traces obtained by a steady state activation protocol are depicted in Figure 3A. The voltage dependence of channel activation was assessed by plotting the relative amplitude of tail currents as a function of test potential (Figure 3B). Fitting these data to a Boltzmann function revealed a +7.9 mV positive shift of $V_{1/2}$ in HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} ($V_{1/2} = +1.82 \pm 0.80$ mV; $n=9$) respect to HERG-WT ($V_{1/2} = -6.08 \pm 1.16$ mV; $n=5$) and +6.19 mV respect to HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} ($V_{1/2} = -4.37 \pm 1.10$ mV; $n=10$); both comparisons were statistically significant (Figure 3C and Table 1). Steady state inactivation of HERG channels was determined by applying a three-pulse protocol to isolate the inactivation from the transitory overlapping activation (Figure 4A). The first pulse to +40 mV was followed by a series of short repolarizing steps from +50 mV to -120 mV (Δ -10 mV) that progressively removed inactivation, avoiding concomitant deactivation. The third pulse to +75 mV brought channels back to an inactivated state, thus, the magnitude of peak current elicited at this step indicated the scope of current availability induced by the second pulse. Peak currents evoked by the third pulse were normalised and plotted versus test potential (Figure 4B, inset). Inactivation $V_{1/2}$ values were obtained by fitting data to a Boltzmann function (Figure 4B and Table 1). For HERG-WT, $V_{1/2}$ was -53.18 ± 1.33 mV ($n=10$), whilst for HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM}, $V_{1/2}$ values were -53.97 ± 0.91 mV ($n=8$) and -38.67 ± 0.81 mV ($n=5$), respectively. Inactivation data denoted a +14.51 mV positive shift of HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels compared to HERG-WT, and a +15.3 mV shift compared to HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} ($p < 0.05$ for both comparisons). Differences between HERG-WT and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} were not statistically significant. We calculated the window current for each condition as the product of the steady-state activation and steady-state inactivation Boltzmann fittings (Figure 5). To note, a larger and broader window current was observed for HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels *versus* HERG-WT and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT}, due to the rightward shift of the inactivation curve respect to the activation.

Since activation of HERG channels is considerably slower than inactivation, an “envelope of tails” protocol was used instead of a usual step-based protocol, to analyse the activation time-course of HERG channels at +50 mV (Figure 6A). Normalised peak tail currents were fitted with a mono-exponential function and provided activation *tau* (τ) values (Table 1) of 169 ± 14.5 ms for HERG-WT ($n=13$), 127 ± 9.9 ms for HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} ($n=8$), and 97 ± 3.9 ms for HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels ($n=6$). All comparisons were statistically significant ($p<0.05$).

The onset of inactivation was studied using a protocol in which an initial depolarising pulse at +40mV fully inactivated HERG channels for 2 seconds, followed by a repolarising pulse at -110 mV for 25 ms to recover channels from inactivation and, finally, a 400 ms step from +40 mV to -40 mV (Δ -10 mV) re-inactivated channels. The time-courses of inactivation (*tau*) were fit to a monoexponential equation and plotted against voltage (Figure 6B). We found that inactivation *taus* obtained in cells expressing HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels were significantly increased compared with those expressing HERG-WT channels within the range +40 to -10 mV. Significant differences between HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} were observed between -20 mV and -40 mV. Deactivation of HERG channels was measured with a two-step protocol consisting of a first pulse at +50 mV to activate the channels, followed by a series of pulses from +20 to -110 mV that removed inactivation as the activation progressively decayed. The deactivation time course is best characterised with a bi-exponential function that represents both the initial (and faster) phase, when the channel recovers from inactivation in a fully opened state, and the slower phase as the activation progressively decays. No differences were observed either in the slow or fast components of the deactivation time course fittings for any of the HERG channel conditions studied (data not shown).

4. DISCUSSION

In this work we report the identification of a novel missense mutation, V483I, in a 4-month old infant who suddenly died during sleep. We also identified the common polymorphism, K897T, co-inherited with the mutation in the same allele throughout the maternal line. Common SNPs are thought to have a low impact by themselves on disease development, but may act as genetic modifiers of the phenotype caused by rare or private variants [235]. Regarding the common SNP K897T, several functional and association studies have been published [332-338]; however, they report controversial conclusions about the effects of the polymorphism on the duration of the QT interval. We hypothesized that the combined effect of V483I and K897T is altering the proper functioning of HERG channels. This could explain the incomplete penetrance and variable expressivity observed between genotype-positive individuals, from completely asymptomatic, to AF, syncope and SUDI episodes. The more severe phenotype of the proband could be due to the homozygous condition of K897T, which may be exerting a stronger modulation on the effect of V483I compared to the heterozygous condition of the polymorphism present in other family members.

Whole-cell patch clamp experiments were performed to assess the electrophysiological properties of heterotetrameric HERG channels resulting from the random assembly of co-expressed WT and recombinant α -subunits, mimicking the genetic conditions of the proband and his relatives. The unique biophysical properties of HERG channels characterised by slow activation and deactivation kinetics, together with rapid voltage-dependent inactivation and recovery from inactivation, confer them a crucial role during repolarization as inward-rectifying potassium channels ^[339]. In the first place, our results on the instantaneous tail currents plotted as I - V relationships followed the typical inward rectification that is hallmark for this channel but none of the mutation/polymorphism combinations studied significantly affected the conduction pathway of HERG. However, our data showed significant alterations of both voltage and time dependence of current activation and inactivation. Steady-state activation curve of HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels was significantly shifted towards more positive potentials compared to the other two conditions. This situation seems to imply a loss-of-function of the channel, as potassium conductance is compromised. On the other hand, steady-state inactivation of HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels was also altered, as exhibited by the shifted curve towards more positive potentials. In contrast with the voltage dependence of activation, inactivation properties observed in HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels suggest a gain-of-function effect. The combined positive shift of HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} steady-state inactivation curve and the also positive shift in the steady-state activation produces a significant increase in the window current, with a functional impact of gain-of function of HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} channels compared with HERG-WT and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} channels.

We also studied the effect of these variants on the time dependence of inactivation and activation. Compared to HERG-WT, the inactivation time constants of HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} were significantly lengthened at a wide range of test potentials. When comparing HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} to HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM}, the significant differences were observed from -20 to -40 mV. These results indicate that inactivation in recombinant channels is slower than in HERG-WT channels, suggesting that, together, both variants contribute to a gain-of-function mechanism of HERG channels, but the homozygous condition of the polymorphism K897T seems to be relevant during repolarization. The markedly faster activation time constant of HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} compared with HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} and HERG-WT channels further contributes to the gain-of-function mechanism as it denotes the presence of a larger potassium current flowing during the depolarisation phase which would predict a shortening of the cardiac action potential.

Gain-of-function of HERG channels due to mutations in *KCNH2* may create an excessive repolarization reserve in both, atria and ventricles. This effect may lead to SQTs and paroxysmal AF as it has been previously reported ^[340]. Our results point to SQTs as the explanation for the SUDI episode. However, we have not observed any direct evidence of SQTs in the family. Still, none of the proband's relatives expressed the mutation V483I in *KCNH2* together with the polymorphism K897T in homozygosis. It is possible that the mild gain-of-function effects of the mutation do not provoke a shortening of the ventricular

action potential that compromise its function but, in the atria, the increase in the repolarization reserve may be enough to provoke AF as it was observed in the proband's grandmother (individual II.4) and great-grandfather (individual I.2). In summary, our biophysical characterisation of recombinant HERG channels revealed a compound gain-of-function effect caused by the mutation V483I. A more severe effect of the mutation was observed when accompanied by the polymorphism in homozygosis, in contrast with that observed when the polymorphism was in heterozygosis, which presented with a mild effect indistinguishable from WT channels for several of the measured channel function parameters. This epistatic effect of V483I and the homozygous expression of K897T may underlie a SQTS that could explain the sudden death of the proband.

REFERENCES:

1. Wong LCH, Behr ER. Sudden unexplained death in infants and children: the role of undiagnosed inherited cardiac conditions. *Europace* 2014; 16(12):1706-13.
2. Moon RY, Horne RSC, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *The Lancet* 2007; 370(9598):1578-87.
3. Priori SG, Wilde AA, Horie M et al. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 2013; 10(12):1932-63.
4. Wilders R. Cardiac ion channelopathies and the sudden infant death syndrome. *ISRN Cardiology* 2012; 2012:846171.
5. Trudeau M, Warmke J, Ganetzky B, Robertson G. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 1995; 269(5220):92-5.
6. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; 80:795 - 803.
7. Brugada R, Hong K, Dumaine R et al. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004; 109(1):30-5.
8. Hong KUI, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; 16(4):394-6.
9. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Translational Research* 2013; 161(1):1-14.
10. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 1999; 99:529 - 33.
11. Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 1981; 391:85-100.

12. Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7(4):248-9.
13. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 1995; 81(2):299-307.
14. Sanguinetti MC, Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *The Journal of General Physiology* 1990; 96(1):195-215.
15. Marsman RF, Tan HL, Bezzina CR. Genetics of sudden cardiac death caused by ventricular arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11(2):96-111.
16. Anson BD, Ackerman MJ, Tester DJ et al. Molecular and functional characterization of common polymorphisms in HERG (KCNH2) potassium channels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2004.
17. Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A et al. A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res* 2003; 59(1):27-36.
18. Gouas L, Nicaud V, Berthet M et al. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(11):1213-22.
19. Paavonen KJ, Chapman H, Laitinen PJ et al. Functional characterization of the common amino acid 897 polymorphism of the cardiac potassium channel KCNH2 (HERG). *Cardiovasc Res* 2003; 59(3):603-11.
20. Pfeufer A, Jalilzadeh S, Perz S et al. Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the general population: Results from the KORA study. *Circ Res* 2005; 96(6):693-701.
21. Pietilä E, Fodstad H, Niskasaari E et al. association between HERG K897T polymorphism and QT interval in middle-aged finnish women. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40(3):511-4.
22. Nof E, Cordeiro JM, Pérez GJ et al. A common single nucleotide polymorphism can exacerbate long-QT type 2 syndrome leading to sudden infant death. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3(2):199-206.
23. Smith PL, Baukowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996; 379(6568):833-6.
24. Gaita F, Giustetto C, Bianchi F et al. Short QT syndrome: A familial cause of sudden death. *Circulation* 2003; 108(8):965-70.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Novel *KCNH2* variant identified in a family. A) Pedigree of the family; Solid symbols indicate clinically affected individuals (including SIDS); and empty symbols represent otherwise healthy individuals. Deceased individuals are represented with a forward slash. An unborn individual (miscarried fetus) is represented by a small solid circle. An arrow marks the proband. B) Electropherogram of the DNA sequence and residual alignment of *KCNH2*p.V483I.

Figure 2: Current-Voltage (*I-V*) relationships of HERG channels determined using a two-step protocol (inset). First step fully activated (and inactivated) potassium currents during 2 seconds to +50mV, and were progressively recovered from inactivation during second step (inset). Peaks from currents elicited during this step were measured and normalized to the maximal value of *I* for each condition. Plot shows relative *I* values against test potential. Symbols represent pulse values for HERG-WT (■, *n*=11); HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} (▲, *n*=12); and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} (●, *n*=10).

Figure 3: Voltage dependence of HERG channel activation. A) Representative inward tail currents of recombinant versus wild type channels from HEK293 transfected cells evoked at -100mV after a series of 800ms pulses ranging from -50 to +70mV from rest potential at -80mV (B) and plotted versus test potential (C). Symbols represent experimental values for HERG-WT (■, *n*=5); HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} (▲, *n*=10); and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} (●, *n*=9) expressed as mean ± SE.

Figure 4. Voltage dependence of HERG channel inactivation. A) Representative current traces showing steady-state inactivation of wild type and recombinant HERG channels obtained with a three pulse protocol depicted in B (inset). B) Normalized peak current values were plotted versus test potential and fitted to a Boltzmann function to determine midpoint activation ($V_{1/2}$) and slope factor (*k*), (see Table 1). HERG-WT (■, *n*=10); HERG-V483I^{HT} + K897T^{HT} (▲, *n*=8); and HERG-V483I^{HT} + K897T^{HM} (●, *n*=5) expressed as mean ± SE

Figure 5. Steady-state window current for WT and recombinant HERG channels. HERG window current was calculated as the activation-inactivation variable product at each voltage using the steady-state activation and inactivation Boltzmann curves.

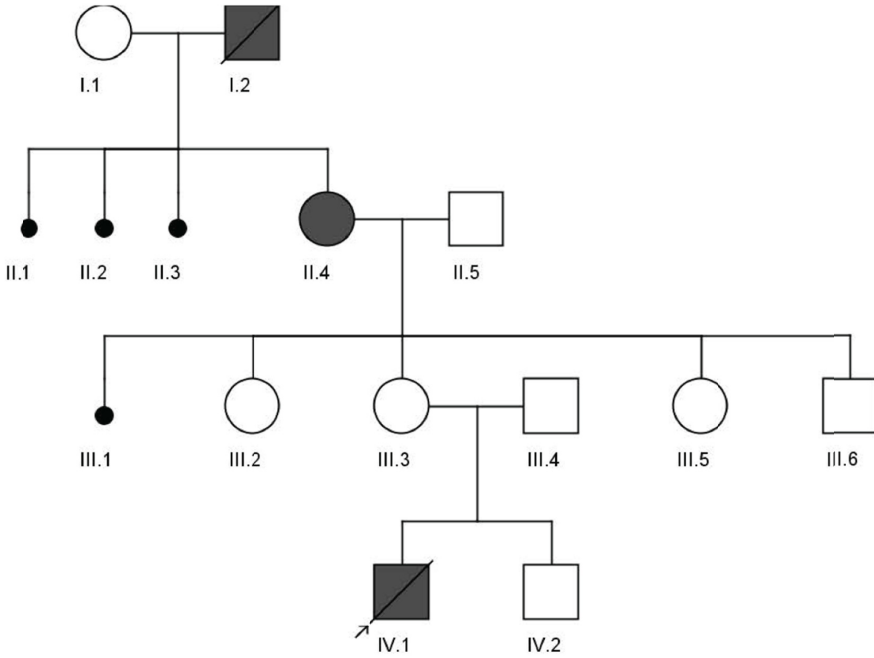
Figure 6. Activation and inactivation time dependence of HERG channels. A) Activation time course was analysed with an “envelope of tails” protocol. From a holding potential of -80 mV, an initial pulse to +50mV of variable duration ($\Delta 20$ ms) was applied to fully activate (and inactivate) channels and then, stepped backward to -120mV to remove inactivation. Peak tail currents were measured at -120mV, normalized to the maximal current, plotted versus the time pulse duration and fitted with a mono-exponential equation to obtain the activation tau (τ); (see Table 1). B) Onset of inactivation of HERG currents. Tau was measured by fitting inactivating currents during test pulses at each potential with a single exponential function.

Table 1. Biophysical parameters of WT and recombinant HERG channels. Steady-state activation and inactivation were calculated by data fitting to Boltzmann functions. $V_{1/2}$ is the voltage for half maximal steady-state activation or steady-state inactivation and k is the slope factor. Activation time constants (τ) were calculated by fitting data to mono-exponential functions. Values are expressed as mean \pm SE.



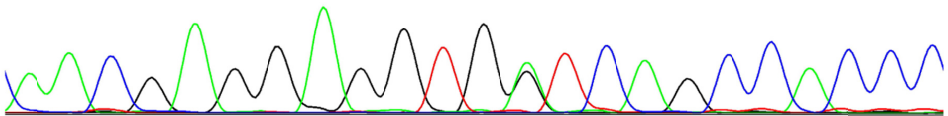
Figure 1: Novel *KCNH2* identified in a family.

A



B

A A C G A G G A G G T G **R** T C A G C C A C C C
*KCNH2*p.V483I



<i>Homo sapiens</i>	435	E T E E G P P A T E C G Y A C Q P L A V V D L I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E E V V S	484
<i>Par. troglodytes</i>	435	E T E E G P S A T E C G Y A C Q P L A V V D L I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E E V V S	484
<i>Macaca mulatta</i>	442	E T E E G P P A T E C G Y A C Q P L A V V D L I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E E V V S	491
<i>Canis lupus</i>	434	E T E E G P P A P D C G Y A C Q P L A V V D F I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E E V V S	483
<i>Mus musculus</i>	437	E T E D G S Q A P D C G Y A C Q P L A V V D L I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E E V V S	486
<i>Rattus norvegicus</i>	437	E T E D G S Q A P D C G Y A C Q P L A V V D L I V D I M F I V D I L I N F R T T Y V N A N E E V V S	486
<i>Gallus gallus</i>	255	D Q E E - A Q R H N C G Y S C S P L N V V D L I V D I M F I I D I L I N F R T T Y V N S N E E V V S	303
<i>Danio rerio</i>	433	D E E E - E V I Q R C G Y S C S T L N V V D L I V D I M F V V D I V I N F R T T Y V N S N D E V V S	481

Figure 2: I-V relationships of wild type and recombinant HERG channels.

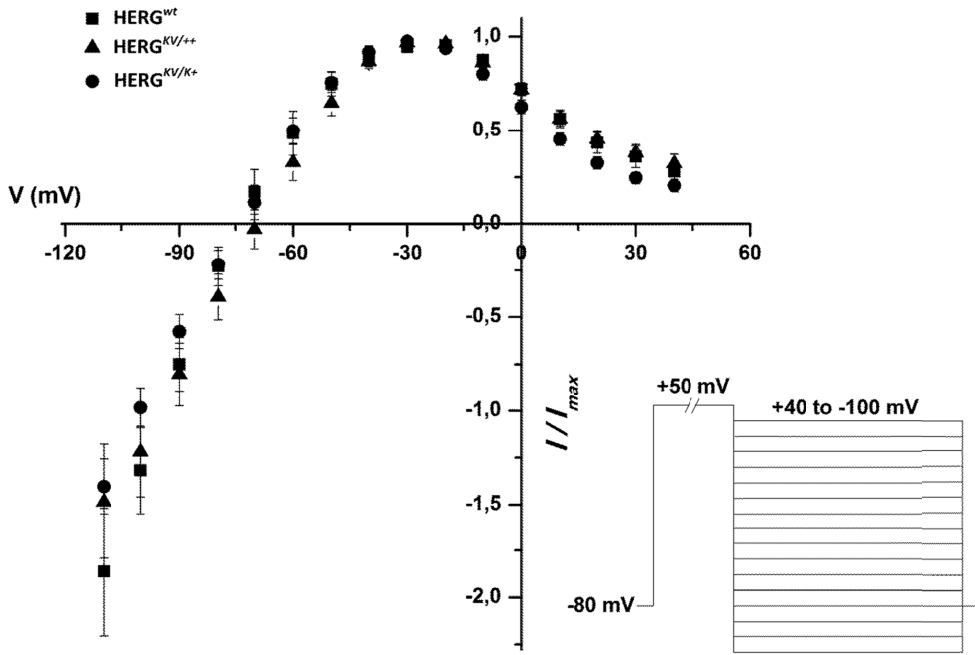


Figure 3: Voltage dependence of HERG channel activation.

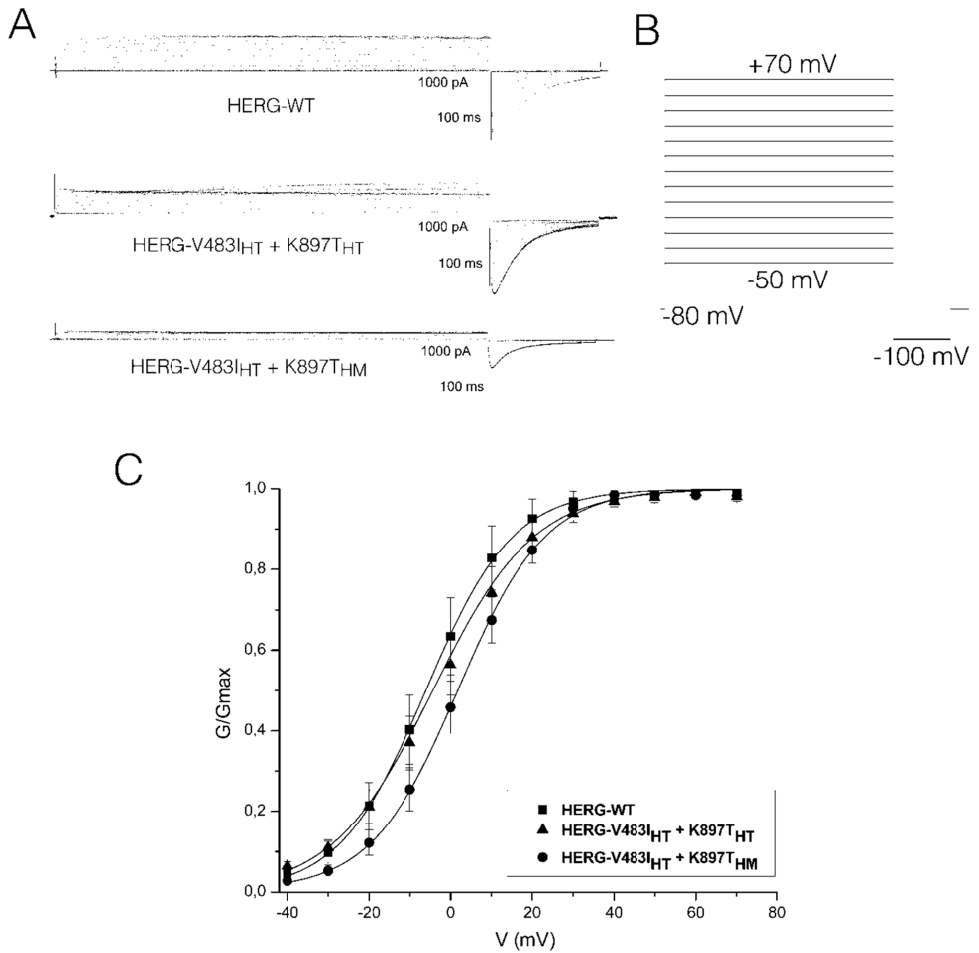


Figure 4. Voltage dependence of HERG channel inactivation.

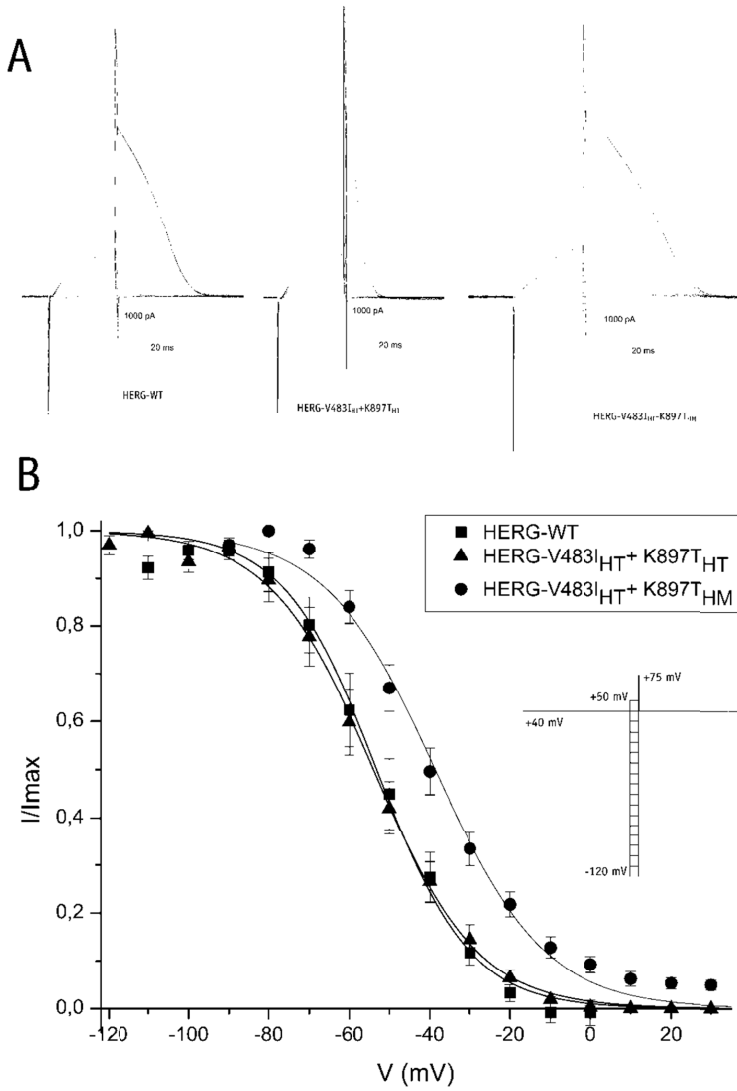


Figure 5. Steady-state window current for WT and recombinant HERG channels.

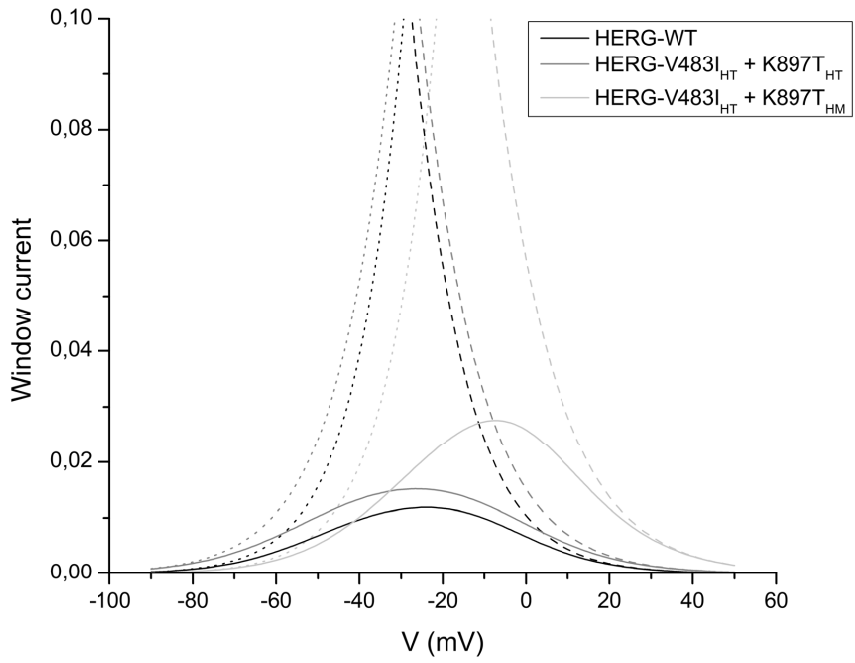


Figure 6. Activation and inactivation time dependence of HERG channels.

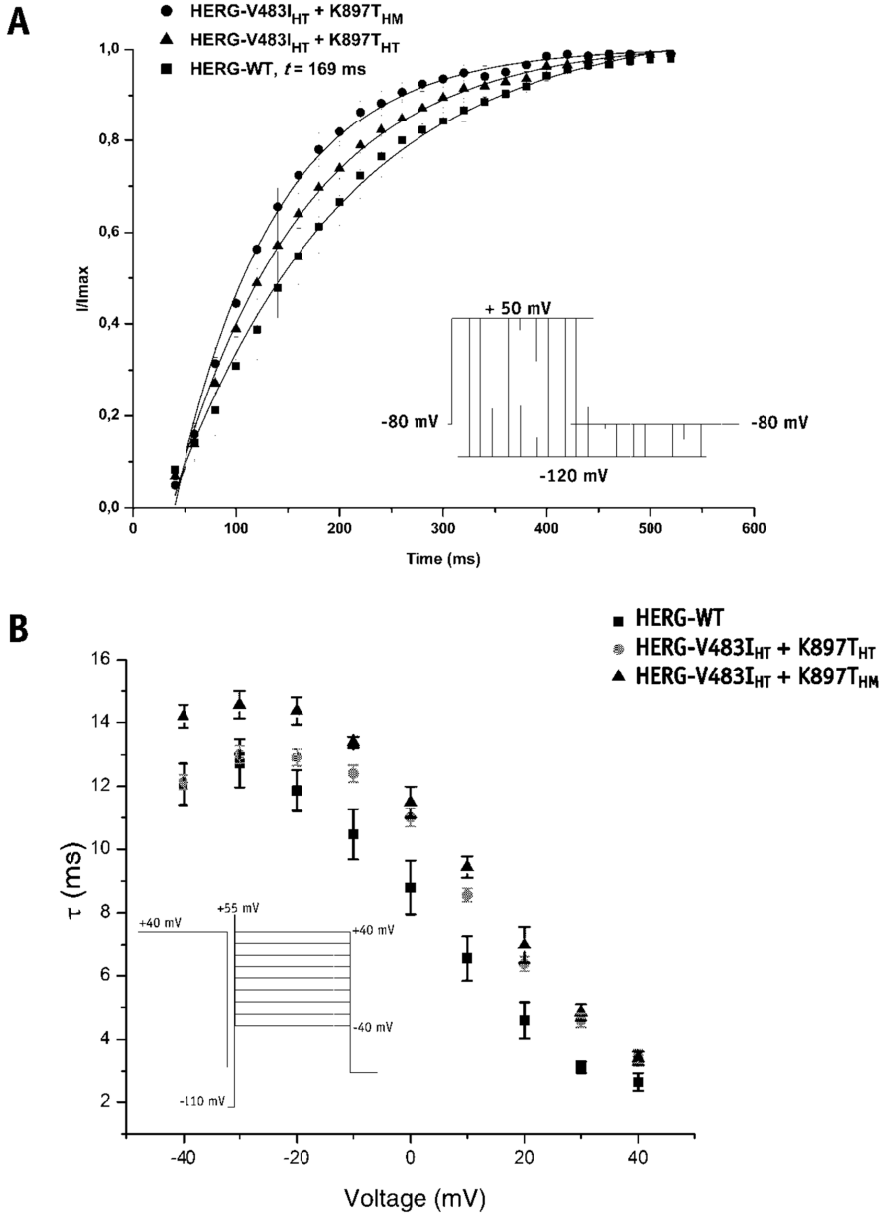


Table 1 Biophysical parameters of WT and recombinant HERG channels.

	I_{Kr} at -30mV		Steady-state activation			Steady-state Inactivation			Activation time constant	
	pA/pF	n	$V_{1/2}$ (mV)	k	n	$V_{1/2}$ (mV)	k	n	τ (ms)	n
HERG-WT	+122.54 ± 20.53	11	-6.08 ± 1.16	10.61 ± 1.03	5	-53.18 ± 1.33	11.63 ± 1.17	10	169 ± 14.5	13
HERG-V483I^{HT} + K897I^{HT}	+67.07 ± 9.13	11	-4.37 ± 1.10	12.34 ± 0.97	10	-53.97 ± 0.91	12.91 ± 0.81	8	127 ± 9.9	8
HERG-V483I^{HT} + K897I^{HM}	+82.32 ± 16.12	9	+1.82 ± 0.80	10.65 ± 0.71	9	-38.67 ± 0.81	13.74 ± 0.72	5	97 ± 3.9	6





DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Tanto en adultos como en niños, las muertes súbitas inexplicadas representan todo un reto para los profesionales sanitarios en lo que se refiere al asesoramiento y al manejo del posible riesgo de otros miembros de la familia. En este apartado se discutirá el riesgo cardíaco potencial implicado en la muerte súbita infantil inexplicada, el papel de la autopsia molecular, la evaluación de las familias, las estrategias actuales para su estudio y, por último, las directrices futuras en esta área.

Al comienzo de la Introducción de este manuscrito se definía el término SUDI (del inglés, *sudden unexpected or unexplained death in infancy*) como la categoría en la que se engloban todos los casos de muerte súbita inesperada o inexplicada en niños menores de un año. En esta categoría se incluiría un subgrupo de casos denominados SIDS (del inglés, *sudden infant death syndrome*) que recoge todos aquellos casos de SUDI que cumplen una serie de criterios forenses y circunstanciales más estrictos^[19].

Existe un solapamiento inevitable entre ambas categorías, ya que SIDS es siempre un diagnóstico por exclusión y SUDI lo es ocasionalmente. Esto significa que, por definición, nunca podría establecerse una causa de muerte definitiva para un caso de SIDS, ya que inmediatamente pasaría a ser clasificado como SUDI. A esta ambigüedad podrían atribuírsele las inconsistencias que existen entre los estudios realizados sobre muerte súbita infantil, debido a los diferentes métodos de evaluación de los casos y la aplicación de distintas definiciones. Este complicado y controvertido enfoque persistirá mientras no se adopten medidas y protocolos más precisos y objetivos a nivel internacional para clasificar estas muertes.

Hay un solo punto claro en este solapamiento y es la existencia de una serie de factores extrínsecos e intrínsecos común para ambas categorías; y la única forma de resolver esta controversia consiste en la identificación de dichos factores y la relación causal entre ellos. A medida que se vayan dilucidando estos factores, la tendencia será a unificar conceptos, en vez de diversificarlos; de tal manera que al final (de forma

idealista) el término SIDS acabaría desapareciendo y las muertes clasificadas como SUDI (inexplicadas), lograrían obtener una explicación.

Los factores extrínsecos asociados a la muerte súbita infantil están bastante bien identificados en la actualidad, y la modificación de ciertas prácticas ha dado lugar a la reducción de las tasas de muerte súbita infantil de forma global, aunque en ciertos casos no se ha llegado a comprender del todo el porqué de esta tendencia. Por ejemplo, existe una fuerte asociación entre la posición para dormir de un lactante en decúbito prono y SIDS; y desde las campañas *Back-to-sleep* de los años noventa en las que se promovió la adopción del decúbito supino como alternativa para evitar la muerte súbita de los lactantes durante los periodos de sueño, el número de casos de SIDS se ha reducido drásticamente en todo el mundo^[341]. Hoy en día se cree que, probablemente, muchas de estas muertes fuesen consecuencia de asfixias accidentales o sofocación; sin embargo, sería simplista considerar estas muertes como accidentales solamente, ya que, de hecho, la mayoría de bebés que duermen en ambientes y circunstancias similares no mueren.

Aquí es donde la investigación de los factores intrínsecos adquiere importancia. De acuerdo con la Hipótesis del Triple Riesgo, un evento de SIDS sólo ocurrirá en aquellos lactantes con una vulnerabilidad genética que los predisponga a ello mientras atraviesa un periodo crítico en su desarrollo y se exponga a un estresante exógeno^[32]. Numerosos estudios asocian determinadas variaciones genéticas con la ocurrencia de SIDS. Entre los factores genéticos vinculados a SIDS podrían distinguirse dos grandes clases: variantes genéticas con posibles efectos de predisposición y variantes genéticas con correlatos fisiológicos^[33].

La primera clase incluye una serie de variantes que no pueden ser correlacionadas directamente con una disfunción fisiológica pero que en varias ocasiones se ha demostrado su asociación estadísticamente significativa a la ocurrencia de SIDS y por tanto, podrían predisponer a ello. Esta clase de variantes genéticas encaja en el modelo de triple riesgo como factores que generan vulnerabilidad intrínseca del lactante. Entre ellas cabe destacar las alteraciones en el gen del transportador de la serotonina (*5-HTT*), el más estudiado dentro de esta categoría, ya que la serotonina modula y toma partido en varias funciones homeostáticas autónomas, como la toma de aire o la respiración entrecortada, la termorregulación, la respuesta al dióxido de carbono y al oxígeno, el despertar, etc. Otros genes implicados en la regulación autónoma son el de la monoamino oxidasa A (*MAOA*) y el de la tirosin hidroxilasa (*TH01*). A pesar de los ya numerosos estudios sobre es quetos genes, a día de hoy no existe una asociación definitiva entre ninguno de ellos y la ocurrencia de SIDS, ya que en general el tamaño de las cohortes estudiadas suele ser demasiado pequeño y los resultados de los estudios se contradicen unos a otros. La regulación del sistema inmune también ha sido objeto de estudio desde el punto de vista genético, ya que las víctimas de SIDS muestra con frecuencia signos leves de infección y de activación del sistema inmune, sugiriendo que la

alteración de una respuesta inmune podría estar implicada en algunos de estos casos. Algunos genes estudiados son los de las interleucinas 6 y 10 (*IL-6* e *IL-10*, respectivamente) y el del factor de necrosis tumoral (*TNF- α*). Una vez más, los estudios proporcionan resultados contradictorios sin que haya podido demostrarse una asociación estadísticamente significativa entre las variantes genéticas estudiadas y SIDS. Por último, dentro de esta primera clase, se ha propuesto que la disminución prolongada de ATP atribuible a una disfunción del metabolismo mitocondrial podría conducir a un desacoplamiento de la cadena respiratoria y del aparato de fosforilación oxidativa causada por mutaciones en el genoma mitocondrial. Aunque las mutaciones individuales en el ADN mitocondrial pueden dar lugar a enfermedades monogénicas mitocondriales que afectan al corazón, cerebro, músculo esquelético y sistema neuroendocrino, actualmente no existe prueba de la existencia de mutaciones recurrentes asociadas a SIDS y se necesitan más trabajos para valorar la potencial asociación de cada SNP mitocondrial con el síndrome.

La segunda clase de alteraciones genéticas está constituida por variantes que causan un efecto fisiológico mensurable o cuantificable objetivamente, suficiente y/o necesario para provocar un evento de SIDS. Los genes estudiados por excelencia son aquellos cuyas mutaciones patogénicas son responsables de los trastornos eléctricos primarios del corazón en adultos y niños; también denominados canalopatías cardíacas, tales como LQTS, SQTS, BrS o CPVT, que ya han sido descritos detalladamente en la introducción de esta tesis.

La justificación para el abordaje de su estudio parecía obvia, ya que mutaciones en estos genes son responsables de buena parte de las muertes súbitas cardíacas en niños y adultos menores de 40 años (incluido un importante número de deportistas profesionales y amateurs) sólo por detrás de las miocardiopatías estructurales. La prueba definitiva vino con el hallazgo de la asociación entre SIDS y LQTS en un estudio prospectivo de más de 19 años con más de 34.000 recién nacidos en seguimiento mediante revisión de electrocardiogramas. Desde el inicio de los estudios genéticos y hasta la fecha, se han identificado variantes con patogenicidad demostrada en asociación a SIDS en los genes *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE3*, *KCNJ8* (subunidades de canales de potasio cardíacos), *SCN5A*, *SCN3B*, *SCN4B* (subunidades de canales de sodio cardíacos), *CAV3*, *SNTA1*, *RYR2*, *GPD1-L* y *GJAI* (otros canales y proteínas asociadas).

Las miocardiopatías estructurales se han excluido tradicionalmente de la investigación genética en los casos de SIDS porque cualquier signo de la enfermedad identificado durante el examen forense, tanto a nivel macroscópico como microscópico, sería suficiente para frenar el diagnóstico de SIDS por exclusión, por leve que éste fuese. No obstante, algunas de estas enfermedades continúan siendo la causa más frecuente de muerte súbita en adultos y niños, como HCM o DCM.

Antes de que muchos de los estudios funcionales que se describirán a continuación vieran la luz, nuestro grupo fue pionero en la búsqueda a gran escala de mutaciones patogénicas asociadas a HCM en genes de la sarcómera en casos de SIDS después de haber completado estudios previos exitosos en adultos jóvenes; ambos presentados en esta tesis (**ARTÍCULOS 1 Y 2**). Existía una problemática inherente al manejo de muestras procedentes de autopsias de casos de SIDS, ya que en ningún caso se disponía de sangre para la extracción de ADN y el material de partida eran bloques de tejido fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE). Este proceso de conservación del tejido está optimizado para conservar su estructura, pero es poco útil para la realización de estudios retrospectivos de genética molecular. La calidad del ADN obtenido era insuficiente para realizar un estudio de genes candidatos mediante secuenciación directa tradicional, tanto en lo que a degradación se refiere como en lo que respecta a la presencia de inhibidores de PCR y secuenciación. En ese momento, la única opción disponible era el estudio de mutaciones puntuales mediante genotipado de alto rendimiento mediante espectrometría de masas en la plataforma Sequenom MassARRAY del Centro Nacional de Genotipado (CEGEN), en el nodo de Santiago de Compostela. El ensayo se había realizado previamente con muestras de ADN de adultos que sufrieron muerte súbita cardiaca, entre las que se incluían algunas provenientes de tejido en FFPE^[295] (**ARTÍCULO 1**). De este modo, en 2009 finalizamos la primera fase de un estudio multicéntrico en el que analizamos la presencia o ausencia de más de 600 mutaciones asociadas a HCM en 140 casos de SIDS^[27] procedentes del Instituto de Medicina Forense de la Universidad de Bonn, en Alemania; y en 2010 se completó la segunda fase del estudio con el que llegamos a las 286 muestras, procedentes éstas del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Zurich, en Suiza; sobre las cuales analizamos la presencia de 680 mutaciones distribuidas en 16 genes; con unos resultados extraordinarios en términos de calidad de genotipado, comparables a aquellos obtenidos con ADN extraído de sangre fresca, y que fueron finalmente publicados a principios del año 2012. Como resultado de esta investigación identificamos 9 variantes raras en 10 sujetos; 7 de ellas en *MYBPC3* (además de una variante novel en el mismo gen hallada durante la confirmación de los resultados de Sequenom por secuenciación directa), una en *MYH6* y una en *TNNI3*^[28] (**ARTÍCULO 2**).

Sorprendentemente, no obtuvimos resultados comparables en un estudio posterior que consistió en el genotipado de 433 variantes en los 3 genes principales asociados a LQTS, en el que no pudimos identificar variantes patogénicas en ninguno de los 175 casos de SIDS que analizamos (datos no publicados, presentados como **ANEXO AL ARTÍCULO 2**) siguiendo una estrategia similar a la descrita en el **ARTÍCULO 1** de esta tesis. Teniendo en cuenta que se estima que entre un 10-15% de los casos de SIDS puedan ser debidos a canalopatías cardíacas, habría cabido esperar encontrar alguna variante entre todos ellos. Sin embargo, el hecho de que solamente estudiásemos

mutaciones previamente descritas y, siendo la mayor parte de ellas privadas (descritas en una sola familia), podría explicar la ausencia de variantes en la cohorte estudiada.

A pesar del descubrimiento de tal cantidad de defectos genéticos asociados a las miocardiopatías, el conocimiento actual de los mecanismos fisiopatológicos que conducen al fenotipo de la enfermedad a partir de una mutación sarcomérica sigue siendo bastante limitado. En parte, esto es debido a la heterogeneidad clínica que presentan la HCM o la DCM, que puede variar desde individuos asintomáticos hasta eventos de muerte súbita cardíaca o desarrollo de hipertrofia patente ya durante la juventud^[61]. La edad de aparición del fenotipo también parece estar relacionada con el tipo de gen y de mutación, según varias investigaciones. En un corazón normal, la hidrólisis de ATP a ADP + P_i (actividad ATPasa de la cabeza de la miosina) proporciona la energía necesaria para promover la translocación de la actina hacia la cabeza de miosina y generar el golpe de fuerza; para lo cual también es necesaria la unión de Ca²⁺ a la troponina C, ya que sólo así quedarán “al descubierto” los puntos de unión de la miosina a la actina. La unión de una nueva molécula de ATP a la miosina produce, entonces, la disociación de la miosina de la actina. Existen varias hipótesis que intentan explicar estos mecanismos moleculares por medio de los cuales las mutaciones sarcoméricas asociadas a miocardiopatías puedan afectar a diferentes fases de este proceso.

La primera de ellas propone que la alteración de la sensibilidad al Ca²⁺ de los miofilamentos puede alterar la actividad ATPasa de la miosina, lo cual repercutiría en la capacidad de contracción de la sarcómera y derivaría en disfunción cardíaca sistólica y diastólica. Esto ha sido demostrado, al menos, para mutaciones en los genes *TNNT2*, *TNNC1*, *TNNI3*, y *TPM*. Estas variantes genéticas alteran la sensibilidad al Ca²⁺ en estado estacionario de la actividad ATPasa de la actomiosina, y/o la generación del golpe de fuerza. Algunas de ellas también alteran la cinética y amplitud de la contracción y/o relajación del músculo cardíaco. A modo de ejemplo, la mutación p.S166F en el gen *TNNI3* de la troponina I (identificada en un caso de SIDS en el trabajo presentado como **ARTÍCULO 2**) altera la capacidad de unión de Ca²⁺ de la troponina C; la cual viene determinada por la cinética de asociación y disociación del Ca²⁺^[342].

La segunda hipótesis postula que la modificación directa de las proteínas implicadas en la regulación de la actividad ATPasa produce el mismo efecto que las anteriores; lo cual ha sido demostrado para mutaciones en los genes *MYH7* o *MYL2*, entre otros. Como ejemplo, la mutación p.A13T en el gen *MYL2* (identificada en un caso de SIDS en el trabajo presentado como **ARTÍCULO 3**) que ha sido estudiada en numerosas ocasiones mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*, conduce a cambios en la organización de la sarcómera, así como alteraciones funcionales que incluyen la disminución de la actividad ATPasa de la actomiosina. Dada su localización en el brazo/palanca de la miosina, se

creo que esta mutación afecte a la capacidad de hidrolizar ATP de los puentes cruzados, proveyendo energía insuficiente para la contracción^[343].

Hasta el año pasado aún no se habían encontrado pruebas directas de ineficiencia de la actividad ATPasa de la sarcómera en humanos, pero un estudio halló por primera vez diferencias significativas entre la actividad ATPasa de la sarcómera en miocardios humanos hipertrofiados portadores de mutación sarcomérica (en *MYH7* o *MYBPC3*) y la de individuos con hipertrofia no portadores (utilizados como controles negativos), sugiriendo que las alteraciones energéticas están relacionadas fundamentalmente con la propia mutación y no tanto con otras características de la hipertrofia del miocardio. Mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear se puede medir la relación de fosfocreatina cardíaca frente a ATP. La síntesis de fosfocreatina comprende una serie de procesos bioquímicos, el último de los cuales consiste en la fosforilación de la molécula de creatina en el músculo esquelético, para lo que se quiere ATP. Por tanto, el cálculo de la ratio fosfocreatina/ATP es una medida del estado energético y la disminución de energía disponible en la célula estaría directamente relacionada con el desarrollo de HCM. Esta ratio se ha visto significativamente reducida en portadores de mutaciones en *TNNT2*, *MYH7* y *MYBPC3* con respecto a controles^[78].

El más interesante de todos los hallazgos funcionales expuestos hasta aquí es, desde el punto de vista del objetivo de la tesis, que esta reducción de energía disponible se ha observado en individuos portadores de mutación que no presentaban signo alguno de hipertrofia; lo cual sugiere que los cambios en la eficiencia energética del miocardio podrían representar un desencadenante primario de la disfunción cardíaca y del remodelado del músculo hacia el fenotipo de HCM. Además de este experimento, midieron también la función contráctil y el uso de energía por parte de la sarcómera; y concluyeron que, incluso en fases iniciales de la miocardiopatía previas al desarrollo de hipertrofia, las mutaciones sarcoméricas conducen a una disminución general del trabajo de contracción del miocardio incluso sin alteración del consumo energético; y además, el fenotipo es dependiente del gen afectado, lo que proporciona nuevas dianas terapéuticas para HCM desde fases muy tempranas^[78].

Por tanto, es posible que algunas de estas variantes sean lo suficientemente patogénicas como para alterar la correcta función de la sarcómera, ser responsables de la disfunción cardíaca y desencadenar un proceso de arritmogénesis incluso en ausencia de fenotipo evidente en el corazón de una víctima de muerte súbita infantil inexplicada. La identificación de variantes patogénicas asociadas a HCM en casos de SIDS ha abierto la puerta a que investigadores de todo el mundo empiecen a considerarlas como posible base molecular detrás de los eventos de SUDI (incluidos algunos de los casos clasificados como SIDS)^[19, 204, 344] y, quizás, en los próximos años estos genes se incluyan de forma más generalizada en el análisis genético *post-mortem* que se conoce comúnmente como “autopsia molecular”.

Con la llegada de las tecnologías de ultrasecuenciación a la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX) el proyecto de investigación sobre las causas genéticas de la muerte súbita infantil se hacía más ambicioso ya que estas plataformas ofrecen la posibilidad de secuenciar “a la carta” desde regiones pequeñas del genoma hasta exomas y genomas completos; con una tasa de error pequeña y a un coste más asequible que el de la secuenciación tradicional, permitiendo el acceso a una cantidad de información descomunal en un margen de tiempo minúsculo si se compara con lo que se tardaría en abordar el mismo estudio por secuenciación directa. Estas plataformas de ultrasecuenciación han supuesto una revolución para el estudio de enfermedades heterogéneas, como lo son la mayoría de las asociadas a MSC.

Como continuación de los trabajos desarrollados en los años anteriores, nos propusimos realizar la autopsia molecular de una nueva serie de 41 casos de muertes súbitas infantiles clasificadas como SIDS provenientes del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Colonia, en Alemania; de los cuales disponíamos de ADN extraído de sangre o tejido congelado (**ARTÍCULO 3**); lo cual facilitaba el cumplimiento de los requisitos de calidad del ADN (concentración e integridad) que necesita la plataforma SOLiD 5500xl de secuenciación masiva. Para ello, diseñamos un panel de 500 kilobases que incluía en su versión inicial 81 genes asociados a enfermedades con riesgo de muerte súbita; tanto estructurales como arritmogénicas, y algunos asociados a trastornos de la aorta. La segunda versión del panel incluyó varios genes más asociados a trastornos de la aorta hasta alcanzar un total de 86 genes. Hasta donde sabemos, este trabajo ha sido pionero en la realización de la autopsia molecular mediante secuenciación masiva en paralelo de más de 80 genes a una cohorte de SIDS y SADS de tamaño considerable. Actualmente se calcula que entre un 10 y un 15 por ciento de los casos de SUDI/SIDS son debidos a canalopatías subyacentes, pero aún queda una gran parte de casos sin explicar.

A la luz de nuestros estudios genéticos y del progreso alcanzado por otros grupos de investigación en el campo funcional, no sólo es posible que ciertas miocardiopatías estructurales (en sus estadios más iniciales) sean responsables del componente genético de parte de las muertes súbitas infantiles, sino que, a juzgar por el alto número de variantes potencialmente patogénicas identificadas en este último trabajo, éstas podrían superar en número a las muertes causadas por canalopatías subyacentes; lo cual concordaría con la frecuencia de aparición de estas enfermedades en la población adulta. En este estudio hemos podido correlacionar algunos hallazgos genéticos con otros recogidos en los informes de la autopsia y de la revisión de antecedentes clínicos y familiares; lo cual supone que, a falta de estudios funcionales, podría establecerse un posible origen etiológico del evento de muerte súbita infantil o como mínimo un motivo para estudiar a los familiares en riesgo si manifiestan su deseo de participar mediante la

firma de un consentimiento debidamente informado; aunque esto no siempre es viable dadas las circunstancias.

Las recomendaciones del consenso de expertos de la *Heart Rhythm Society* y la *European Heart Rhythm Association* para la realización de pruebas genéticas en casos de muerte súbita inesperada infantil y de adultos establecen^[5]:

1. *Se recomienda* la recogida de una muestra de tejido adecuada para el posterior análisis de ADN (5-10 mL de sangre total en tubo EDTA, tarjetas FTA para muestras de sangre, o muestra de tejido congelado de corazón, hígado o bazo).
2. En el marco de muertes súbitas con autopsia negativa, *se puede considerar* la realización del análisis genético dirigido hacia canales iónicos (*RYR2*, *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*) en un intento de establecer una causa probable de muerte y facilitar la identificación de familiares en riesgo potencial; y *se recomienda* cuando las evidencias circunstanciales apuntan hacia un diagnóstico clínico de LQTS o CPVT específicamente (estrés emocional, desencadenante acústico, ahogamiento como desencadenante de la muerte súbita...).
3. *Se recomienda* la realización de pruebas genéticas para mutaciones específicas a los familiares de primer grado u otros apropiados tras la identificación de una mutación causal en un individuo fallecido.

Por tanto, el diagnóstico molecular tras una muerte súbita sólo está recomendado expresamente (recomendación de Clase I) cuando las circunstancias apuntan hacia un síndrome arritmico, quedando excluidas todas las miocardiopatías estructurales. Incluso en pacientes, estas pruebas sólo se consideran de Clase I cuando existe un diagnóstico claro de LQTS, CPVT (en este caso basta sólo con indicios basados en exámenes médicos, en ausencia de un diagnóstico definitivo), HCM o DCM (esta última sólo si además de la alteración estructural también se ve afectada la conducción cardiaca; es decir si hay algún tipo de bloqueo cardiaco, o bien si hay historia familiar previa de MSC), sean sintomáticos o no. En cualquier otro caso, sin diagnóstico definitivo, o aún con diagnóstico definitivo o altamente sospechoso del paciente en el caso de BrS, SQTS, ARVC, LVNC, RCM, o DCM (en ausencia de bloqueo cardiaco), la recomendación del diagnóstico molecular es de Clase II (IIa, puede ser útil; o IIb, puede ser considerado). La prueba de portadores está recomendada en todos los casos siempre que se encuentre una mutación causal en el caso índice^[5].

El enfoque recomendado para el diagnóstico molecular es el dirigido a genes candidatos; en primer lugar a aquellos que se asocian a $\geq 5\%$ de los casos de una de las enfermedades recogidas en la declaración y, en caso negativo, se puede valorar la posibilidad de analizar otros. El rendimiento del diagnóstico molecular varía mucho dependiendo del tipo de enfermedad; por lo que un resultado negativo nunca debe ser considerado motivo suficiente para descartar la presencia de cualquiera de estas

enfermedades. Si el paciente/fallecido tiene un fenotipo inequívoco, algunos expertos se han mostrado a favor de recurrir a pruebas genéticas para el descubrimiento de nuevos genes causantes para ese fenotipo en particular^[5].

Esas pruebas genéticas incluyen a la NGS. Las ventajas son obvias, puesto que se multiplica la información obtenida y se reduce el tiempo y el coste necesarios para lograrla. En vez de estudiar un gen de cada vez, los laboratorios de genómica pueden secuenciar una parte del genoma, el exoma o el genoma completo de una muestra de ADN del paciente/individuo fallecido. Esta tecnología proporciona un listado de todas las variantes (de un solo nucleótido y también pequeñas deleciones e inserciones) de cada gen analizado. En el más sencillo de los casos, la secuenciación de un panel de genes candidatos permitiría hallar una (o más) variantes patogénicas causantes del fenotipo dado. La secuenciación del exoma o el genoma completo permite, además, identificar nuevos genes candidatos asociados a trastornos de herencia mendeliana. Sin embargo, estas tecnologías tienen una limitación importante: proporcionan una cantidad de información demasiado grande y, a menudo, de difícil interpretación dadas las herramientas de análisis bioinformático de las que disponemos en la actualidad; lo cual puede conducir erróneamente a la identificación de numerosos falsos positivos (entiéndase, variantes identificadas como patogénicas que, a menos que se demuestre lo contrario, no lo son).

La NGS también se utiliza como herramienta de diagnóstico molecular en vida. Generalmente, el análisis genético se emplea como prueba de apoyo para el diagnóstico clínico, ya que en muchas de las enfermedades con riesgo de muerte súbita, la presencia de una variante genética no determina un diagnóstico patológico. Sin embargo, en algunos casos, el hallazgo de una variante genética puede ser suficiente (o, al menos, igual de determinante que cualquier otra prueba) para establecer un diagnóstico patológico. Como ejemplo de aplicación de la NGS al diagnóstico molecular, se presenta el caso de un neonato que manifestaba DCM desde la etapa fetal, bradicardia e hipotonía, y sufrió una parada cardiorrespiratoria al poco de nacer. Inmediatamente el caso fue remitido al Laboratorio de Xenética de Enfermedades Cardiovasculares del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago, que en colaboración con la FPGMX se encarga del estudio genético de las cardiopatías familiares procedentes del Hospital Clínico Universitario de Santiago (**ARTÍCULO 4**). El procedimiento habitual habría sido someter la muestra de ADN del individuo a secuenciación del mismo panel de genes de MSC que se utilizó para el estudio de SIDS antes descrito (y que se va actualizando periódicamente con genes nuevos), pero debido a la urgencia del caso, como alternativa se procedió a la secuenciación del exoma completo del neonato. Después del filtrado y análisis pertinente de las variantes, se determinó como probable mutación causal una variante missense en el gen *TAZ* del cromosoma X, asociado al síndrome de Barth (BTHS), patología que ya ha sido descrita en la introducción de esta tesis. Tras informar

a los clínicos, se procedió a la realización de varias pruebas de laboratorio para hallar más evidencias que confirmaran el diagnóstico. El BTHS es una enfermedad monogénica heterogénea, con múltiples manifestaciones clínicas y penetrancia y expresividad variables. No todos los signos de la patología están presentes al mismo tiempo, ni tienen por qué llegar a presentarse. Este neonato llegó a manifestar varios de los signos que definen a este síndrome, tales como DCM, LVNC, neutropenia, hipotonía, bajo peso corporal, y disfunción sistólica; algunos de ellos de forma crónica-intermitente. Cabe destacar que la fundación sin ánimo de lucro para la investigación de BTHS, la *Barth Syndrome Foundation*, recoge en su catálogo de pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad que la presencia de una mutación en *TAZ* es tan determinante como cualquier otro hallazgo bioquímico concordante con la patología. El análisis de portadores en la familia reveló la presencia de varias mujeres heterocigotas y otros tantos varones que la portaban en hemocigosis, los cuales manifestaron distintos signos del síndrome en el momento del estudio (durante la evaluación clínica a la que fueron sometidos tras el resultado de la prueba genética) y también durante el estudio retrospectivo de su historia clínica; lo que condujo a la reconsideración de su diagnóstico clínico hacia el de BTHS. A pesar de que ninguno de ellos presenta actualmente síntomas graves de la enfermedad (fundamentalmente arritmias cardíacas), la historia clínica de uno de ellos reporta la existencia de neutropenia crónica-intermitente, lo que le expone a un aumento del riesgo a sufrir infecciones.

En el caso de esta familia, el diagnóstico fue sencillo y rápido (semanas), si se compara con el tiempo medio de demora actual en el diagnóstico de BTHS desde la aparición del primer signo, que es de aproximadamente 3,3 años^[314]. De todos modos, estos casos se dan con muy poca frecuencia y lo más normal es tener que lidiar con cantidades enormes de variantes de cuya implicación funcional no se tiene conocimiento alguno y es necesario recurrir a las predicciones de patogenicidad de algoritmos bioinformáticos, estudios de cosegregación familiar -como se mencionaba antes-, y, en el mejor de los casos, a estudios funcionales *in vitro* o *in vivo* que ayuden a demostrar la implicación de la variante en el desarrollo de la patología; aunque, por supuesto, esto no siempre es viable en todos los laboratorios.

Para entender cómo los estudios funcionales pueden ayudar a explicar el mecanismo fisiopatológico subyacente a un caso de muerte súbita infantil inexplicada en el que se identifica una variante novel candidata, se presenta el caso de un lactante de 4 meses de edad que falleció súbitamente en la guardería, aparentemente mientras dormía la siesta (**ARTÍCULO 5**). Después de hablar con la familia para evaluar el caso con los antecedentes que ellos reportaron y tras el análisis genético dirigido de acuerdo a las recomendaciones de los expertos, identificamos una variante *missense* novel en el gen *KCNH2*, acompañada de un polimorfismo común (en homocigosis) que ha sido catalogado en numerosas ocasiones como modificador genético de otras variantes. El

estudio de portadores en la familia reveló que ambos están heredados en el mismo alelo por la línea materna del niño y que, además, el padre del menor era portador de una copia del polimorfismo.

Con el fin de determinar el grado de alteración funcional producido por la variante novel y el posible efecto modificador del polimorfismo sobre ésta, diseñamos un estudio funcional *in vitro* para estudiar el comportamiento del canal de potasio HERG (Kv11.1) codificado por *KCNH2* con dos combinaciones de las citadas variantes nucleotídicas en un intento de representar los distintos genotipos de los miembros de la familia implicados en el estudio, además de compararlos con el canal de genotipo silvestre o *wild type* (WT). Los experimentos de electrofisiología celular mediante *whole-cell patch clamp* que realizamos para registrar las corrientes iónicas dieron como resultado la presencia de alteraciones funcionales de los canales recombinantes frente a los no recombinantes.

En la introducción se explicaba que la alteración funcional de los canales de potasio HERG podía ser debida bien a mecanismos de pérdida de función o bien de ganancia de función, con resultado de prolongación del intervalo QT o acortamiento de éste, respectivamente. Nuestra hipótesis de trabajo era que la combinación de variante novel y polimorfismo común afectaría al funcionamiento normal del canal y podría representar un sustrato fisiopatológico suficiente para desencadenar un evento de SIDS. Además, pensamos que también podría explicar los fenómenos de penetrancia incompleta y expresividad variable que se dan entre los miembros de la familia con genotipo positivo. Hallamos diferencias significativas entre las propiedades de activación e inactivación dependientes de voltaje y de tiempo, respectivamente, de los canales recombinantes frente a los WT. En concreto, y como resumen del estudio, lo que observamos fue una combinación de mecanismos de pérdida y ganancia de función con resultado global de ganancia de función de los canales HERG recombinantes, con efecto mayor para aquellos que poseen el polimorfismo en homocigosis. Estos resultados sugieren que el efecto modificador del polimorfismo podría ser dependiente de la carga alélica para éste: el fenotipo más severo del caso índice (SIDS) podría ser debido a la homocigosis del polimorfismo, el cual podría estar ejerciendo una modulación más fuerte sobre la variante novel comparado con el genotipo heterocigoto para el polimorfismo que presentan los demás miembros portadores de la variante novel. Otra posibilidad es, que el fenotipo más severo en estos canales sea debido a la imposibilidad de que *KCNH2* sintetice subunidades α WT, de manera que al ensamblarse y formar el tetrámero final que conforma el canal, el fenotipo se mostrase más leve, como ocurre en los canales recombinantes de los familiares.

La ganancia de función de los canales HERG debida a mutaciones en *KCNH2* podría originar una excesiva repolarización tanto en las aurículas como en los ventrículos. Este efecto podría conducir al desencadenamiento de SQTS y fibrilación auricular, tal y como se ha descrito previamente. Si bien no hemos encontrado evidencias de SQTS en la

familia, nuestros resultados apuntan a este síndrome como posible responsable del evento de SIDS. También es posible que la ganancia de función más leve observada para el otro genotipo no sea suficiente para producir un acortamiento del PA ventricular que comprometa su función pero, en las aurículas sí podría ser suficiente para provocar fibrilación auricular.

Tampoco se puede descartar la presencia de otros modificadores genéticos en genes diferentes. Aunque las variantes raras ocurren en, relativamente, pocos casos, se ha sugerido que la acumulación de variantes raras y otras no tan raras, puedan representar una proporción considerable de rasgos fenotípicos en la población. Se estima que al menos el 70% de las variantes raras exónicas tienen efectos funcionales, el ~20% con efecto altamente deletéreo y el ~50% levemente deletéreo^[345]. En los trastornos con patrones de herencia mendelianos, se considera que las variantes raras que producen efectos graves son suficientes para causar la enfermedad. Sin embargo, el papel de las variantes con efecto menos deletéreo en las enfermedades humanas se ha estudiado muy poco. Como se mencionaba anteriormente, este hecho supone una dificultad añadida a la labor del investigador con el crecimiento exponencial de la ultrasecuenciación como herramienta de trabajo.

Recientemente se ha publicado un trabajo que analizó combinaciones de variantes raras y comunes en 13 canales de potasio para determinar si existen efectos aditivos, opuestos o acciones sinérgicas que pudiesen desencadenar fibrilación auricular familiar. De las 19 variantes *missense* que encontraron en 9 genes, 11 eran variantes raras. La presencia de variantes raras era mayor en probandos de fibrilación auricular. Cuando estudiaron las propiedades electrofisiológicas de cada una de las variantes individualmente con técnicas de *patch clamp* similares a las que se han descrito previamente en esta tesis, observaron que la mayoría de ellas producía efectos funcionales bastante modestos. Sin embargo, las simulaciones bioinformáticas que llevaron a cabo para estudiar combinaciones de variantes de distinta frecuencia poblacional indicaron que alteraciones pequeñas -pero simultáneas- de varias corrientes de potasio distintas (es decir, de varios tipo de canales afectados) producían alteraciones no lineales que podían resultar en prolongamientos o acortamientos considerables del PA auricular (>30 ms)^[346].

Estos resultados recalcan varias de las cuestiones tratadas en esta disertación, como son la heterogeneidad genética de las enfermedades cardiovasculares con riesgo de MSC, los fenómenos de epistasia y pleiotropía o la existencia de modificadores genéticos que, a menudo, ponen en entredicho el uso tan extendido de los términos “monogénico” o “mendeliano” cuando se trata de determinar el patrón de herencia de un determinado fenotipo en una familia y establecer a los individuos en riesgo potencial de sufrirlo. En el caso de la muerte súbita infantil, debe tenerse muy en cuenta también el importante papel que juega el ambiente en la etiología del fenotipo de la enfermedad o síndrome. También

se reafirma la necesidad de crear herramientas de simulación eficaces para acelerar el uso de las tecnologías de última generación como herramienta de diagnóstico, ya que la obtención de “toneladas” de información no es útil si no se logra interpretar correctamente. Mientras esta labor se desarrolla, los estudios funcionales continúan siendo el referente para la correcta asignación de causalidad a las variantes candidatas, aunque no siempre están al alcance; al menos de forma masiva.

Por último, un asunto muy importante que concierne a los estudios genéticos, ya sean mediante secuenciación masiva o no, es el de tratamiento de los datos. Primero, porque tanto la autopsia molecular como la medicina personalizada en pacientes requieren de un equipo multidisciplinar para interpretar correctamente los resultados y proveer los mejores diagnóstico y calidad de vida posibles al paciente y sus familiares. Para ello es necesario que exista consenso y unidad en las prácticas rutinarias así como formación continuada que ayude a entender los conceptos de penetrancia incompleta, expresividad variable, heterogeneidad genética, heterocigosidad compuesta o digénica y la naturaleza fundamentalmente probabilística del riesgo que confieren las variantes genéticas. Segundo, y en concreto por el tema que trata la tesis, porque el análisis genético en niños es aún más controvertido, ya que un resultado negativo puede liberar a un menor de seguimientos médicos o investigaciones invasivas, pero uno positivo puede llevar a complejas situaciones que afecten a la vida del niño de forma negativa si se manejan inapropiadamente. Dada la complejidad de las muertes súbitas infantiles, en las que los mecanismos fisiopatológicos aún están poco esclarecidos, los beneficios y perjuicios potenciales del análisis genético de otros familiares (especialmente los menores de edad) deben ser considerados cautelosamente a la vista de la cantidad de información que generan las actuales tecnologías, que pueden incluir resultados inesperados o de difícil explicación.





CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La autopsia molecular es una herramienta útil para intentar establecer una causa probable de muerte súbita y para facilitar la identificación de individuos en riesgo potencial de sufrirla.
2. La correcta recogida de muestras biológicas en casos de muerte súbita infantil -tal y como recomiendan los comités internacionales de expertos- es esencial para la posterior realización exitosa de análisis genéticos.
3. El genotipado de variantes con la plataforma de alto rendimiento MassARRAY de Sequenom es una estrategia eficaz y coste-efectiva, incluso cuando se trabaja con muestras de ADN degradadas, como las procedentes de tejido embebido en bloques de parafina.
4. Mediante dicha estrategia hemos identificado variantes en genes previamente asociados a miocardiopatía hipertrófica en un 3,5% de los casos de muerte súbita infantil inexplicada estudiados, además de una variante novel. Al menos una de estas variantes produce alteración funcional de la proteína.
5. El mismo tipo de estudio no nos permitió, por el contrario, identificar variantes de riesgo previamente descritas en los tres genes más frecuentemente mutados en el síndrome de QT largo en una cohorte de muerte súbita infantil inexplicada.
6. La secuenciación de nueva generación en la plataforma 5500XL SOLiD™ System ha sido una herramienta eficaz para realizar la autopsia molecular de casos de muerte súbita infantil inexplicada, incluso con degradación parcial de la muestra de ADN.

7. El panel de genes utilizado mostró una cobertura media de las regiones de interés muy superior a los mínimos recomendados, y sólo un 1,12% de estas regiones presentó una cobertura inferior a 20×.
8. Con esta herramienta y nuestra estrategia de filtrado se han podido identificar variantes candidatas en el 85,4% de los casos. De las 63 variantes identificadas, el 58,7% de ellas fueron noveles. Dos de las previamente descritas producen alteración funcional de sus respectivas proteínas sarcoméricas.
9. El hallazgo más sorprendente de este estudio es la identificación de un alto número de variantes en genes asociados a miocardiopatías (81% del total o 68% excluyendo la titina). Este resultado está en consonancia con los de nuestros estudios previos de genotipado de alto rendimiento.
10. Los hallazgos en las autopsias y las investigaciones clínicas y familiares son fundamentales para correlacionar las variantes genéticas con la posible vulnerabilidad intrínseca al desencadenamiento de la muerte súbita infantil inexplicada en sus portadores. En tres de los casos portadores de variantes en proteínas de la sarcómera (*MYBPC3* y *MYH6*) y en el canal de sodio cardiaco (*SCN5A*), la información disponible nos ha permitido establecer una hipótesis plausible sobre dicha vulnerabilidad.
11. La secuenciación de nueva generación es una herramienta útil para el diagnóstico molecular prospectivo y retrospectivo de patologías con un claro patrón de herencia monogénico, como el síndrome de Barth.
12. Los estudios de co-segregación en las familias son fundamentales para la determinación de la posible patogenicidad de las variantes detectadas mediante secuenciación masiva.
13. La variante p.V483I en el gen *KCNH2* altera la función del canal de potasio cardiaco HERG mediante un mecanismo de ganancia de función. Esta variante podría ser la responsable de los episodios sincopales, fibrilación auricular y muerte súbita infantil inexplicada en una familia española.
14. Situado en el mismo gen, el polimorfismo p.K897T actúa como modificador genético de la variante p.V483I. Además, existe una marcada correlación entre el genotipo para el polimorfismo (en heterocigosis u homocigosis) y el fenotipo de la función del canal recombinante.

15. La penetrancia incompleta y la expresividad variable son fenómenos característicos de las patologías cardíacas con riesgo de muerte súbita y con frecuencia complican el descifrado de los resultados del análisis genético que se lleva a cabo para ayudar a establecer un diagnóstico certero.
16. A falta de estudios funcionales que demuestren la capacidad de alteración funcional de las variantes noveles y las ya descritas pero no estudiadas, el desarrollo de herramientas bioinformáticas precisas que ayuden a discernir la patogenicidad o inocuidad de las variantes, es cada vez más necesario; sobre todo en el contexto de la secuenciación de nueva generación.







BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA.

1. Montagnana M, Lippi G, Franchini M et al. Sudden cardiac death in young athletes *Intern Med J.* 2008;47:1373-1378.
2. Adabag AS, Luepker RV, Roger VL et al. Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:216-225.
3. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C et al. Epidemiology of sudden cardiac death: Clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 2008;51:213-228.
4. Bezzina CR. Common genetic variation and risk for sudden cardiac death in acquired cardiac disease. *Heart Rhythm.* 2014;11:653-654.
5. Priori SG, Wilde AA, Horie M et al. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm.* 2013;10:1932-1963.
6. Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M et al. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J.* 2008;29:1670-1680.
7. Mellor G, Raju H, de Noronha SV et al. Clinical characteristics and circumstances of death in the sudden arrhythmic death syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* 2014;7:1078-1083.
8. Straus S, Bleumink G, Dieleman J et al. The incidence of sudden cardiac death in the general population. *J Clin Epidemiol.* 2004;57:98-102.
9. Myerburg RJ, Castellanos A. Emerging paradigms of the epidemiology and demographics of sudden cardiac arrest. *Heart Rhythm.* 2006;3:235-239.
10. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaeamic causes of sudden cardiac death. *Heart.* 2006;92:316-320.
11. Vatta M, Dumaine R, Varghese G et al. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet.* 2002;11:337-345.
12. Priori SG, Aliot E, Blømstrom-Lundqvist C et al. Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology. *Europace.* 2002;4:3-18.

13. de Vreede-Swagemakers JJM, Gorgels APM, Dubois-Arbouw WI et al. Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990s: A population-based study in the maastricht area on incidence, characteristics and survival. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1500-1505.
14. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J.* 1997;18:1231-1248.
15. The International Classification of Diseases. World Health Organization. <http://www.who.int/classifications/icd/en/>, Fecha de acceso: 14 enero
16. Behr ER, Casey A, Sheppard M et al. Sudden arrhythmic death syndrome: a national survey of sudden unexplained cardiac death. *Heart.* 2007;93:601-605.
17. Margey R, Roy A, Tobin S et al. Sudden cardiac death in 14- to 35-year olds in Ireland from 2005 to 2007: a retrospective registry. *Europace.* 2011;13:1411-1418.
18. Winkel BG, Holst AG, Theilade J et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1–35 years. *Eur Heart J.* 2011;32:983-990.
19. Wong LCH, Behr ER. Sudden unexplained death in infants and children: the role of undiagnosed inherited cardiac conditions. *Europace.* 2014;16:1706-1713.
20. Health at a Glance: Europe 2014. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Publishing. <http://www.oecd.org/>, Año 2014
21. FastStats: Deaths and Mortality Rates. Centers for Disease Control and Prevention/National Center for Health Statistics. <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/deaths.htm>, Fecha de acceso: 14 Enero 2015
22. Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.es/>. Fecha de acceso: 14 Enero 2015
23. Task Force on Sudden Infant Death Syndrome. SIDS and other sleep-related infant deaths: Expansion of recommendations for a safe infant sleeping environment. *Pediatrics.* 2011;10.1542/peds.2011-2284
24. Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation.* 2012;125:620-637.
25. Saenen JB, Van Craenenbroeck EM, Proost D et al. Genetics of sudden cardiac death in the young. *Clin Genet.* 2014;10.1111/cge.12519
26. Weber MA, Ashworth MT, Risdon RA et al. The role of post-mortem investigations in determining the cause of sudden unexpected death in infancy. *Arch Dis Child.* 2008;93:1048-1053.
27. Brion M, Allegue C, Gil R et al. Involvement of hypertrophic cardiomyopathy genes in sudden infant death syndrome (SIDS). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2009;2:495-496.
28. Brion M, Allegue C, Santori M et al. Sarcomeric gene mutations in sudden infant death syndrome (SIDS). *Forensic Sci Int.* 2012;219:278-281.
29. Krous HF, Beckwith JB, Byard RW et al. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics.* 2004;114:234-238.
30. Malloy MH, MacDorman M. Changes in the classification of sudden unexpected infant deaths: United States, 1992–2001. *Pediatrics.* 2005;115:1247-1253.

31. Krous H. Sudden infant death syndrome (SIDS), sudden unexpected death in infancy (SUDI), and sudden unexplained death in childhood (SUDC). *Forensic Pathology of Infancy and Childhood*. 2014;193-206.
32. Filiano J, Kinney H. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Neonatology*. 1994;65:194-197.
33. Courts C, Madea B. Genetics of the sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int*. 2010;203:25-33.
34. Kinney HC. Neuropathology provides new insight in the pathogenesis of the sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol*. 2009;117:247-255.
35. Guntheroth WG, Spiers PS. The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics*. 2002;110:e64.
36. Froggatt P, Lynas MA, MacKenzie G. Epidemiology of sudden unexpected death in infants ('cot death') in Northern Ireland. *Br J Prev Soc Med*. 1971;25:119-134.
37. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009;32:638-647.
38. Rognum T, Saugstad O. Biochemical and immunological studies in SIDS victims. Clues to understanding the death mechanism. *Acta Paediatr*. 1993;82:82-85.
39. Kinney HC, Richerson GB, Dymceki SM et al. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:517.
40. Randall BB, Paterson DS, Haas EA et al. Potential asphyxia and brainstem abnormalities in sudden and unexpected death in infants. *Pediatrics*. 2013;132:e1616-e1625.
41. Kinney HC, Thach BT. The sudden infant death syndrome. *New Engl J Med*. 2009;361:795-805.
42. Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev*. 2002;82:945-980.
43. Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology: Enhanced e-book*. Elsevier Health Sciences; 2010.
44. Sequeira V, Nijenkamp LL, Regan JA et al. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2014;1838:700-722.
45. Harris SP, Lyons RG, Bezold KL. In the thick of it HCM-causing mutations in myosin binding proteins of the thick filament. *Circul Res*. 2011;108:751-764.
46. Tardiff JC. Thin filament mutations developing an integrative approach to a complex disorder. *Circul Res*. 2011;108:765-782.
47. Tortora GJ, Derrickson BH. *Principles of Anatomy and Physiology*. Wiley Global Education; 2013.
48. Lopes LR, Elliott PM. A straightforward guide to the sarcomeric basis of cardiomyopathies. *Heart*. 2014;10.1136/heartjnl-2014-305645
49. Abelmann WH. Classification and natural history of primary myocardial disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1984;27:73-94.
50. Brigden W. Uncommon myocardial diseases. The non-coronary cardiomyopathies. *The Lancet*. 1957;270:1179-1184.

51. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: An American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113:1807-1816.
52. Elliott P, Andersson B, Arbustini E et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2008;29:270-276.
53. Nugent AW, Daubeney PEF, Chondros P et al. The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia. *New Engl J Med*. 2003;348:1639-1646.
54. Lipshultz SE, Sleeper LA, Towbin JA et al. The incidence of pediatric cardiomyopathy in two regions of the United States. *New Engl J Med*. 2003;348:1647-1655.
55. Keren A, Syrris P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5:158-168.
56. Marston S, Copeland ON, Jacques A et al. Evidence from human myectomy samples that MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency. *Circul Res*. 2009;105:219-222.
57. Ware SM. Genetic diagnosis in pediatric cardiomyopathy: clinical application and research perspectives. *Prog Pediatr Cardiol*. 2011;31:99-102.
58. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014;10.1093/eurheartj/ehu284
59. Teekakirikul P, Kelly MA, Rehm HL et al. Inherited cardiomyopathies: Molecular genetics and clinical genetic testing in the postgenomic era. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15:158-170.
60. Maron BJ, Roberts WC. Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1979;59:689-706.
61. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet*. 2013;381:242-255.
62. Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Failure Society of America, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:2703-2738.
63. Semsarian C, Ingles J, Maron MS et al. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1249-1254.
64. Wilde AAM, Behr ER. Genetic testing for inherited cardiac disease. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:571-583.
65. Christiaans I, van Engelen K, van Langen IM et al. Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. *Europace*. 2010;12:313-321.

66. Maron BJ, Ackerman MJ, Nishimura RA et al. Task Force 4: HCM and other cardiomyopathies, mitral valve prolapse, myocarditis, and Marfan syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1340-1345.
67. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990;62:999-1006.
68. Thierfelder L, Watkins H, MacRae C et al. α -Tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell*. 1994;77:701-712.
69. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy in childhood. *Pediatr Clin North Am*. 2004;51:1305-1346.
70. Seidman CE, Seidman J. Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy a personal history. *Circul Res*. 2011;108:743-750.
71. Morita H, Rehm HL, Menesses A et al. Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *New Engl J Med*. 2008;358:1899-1908.
72. Ho CY, Landstrom AP, Ackerman MJ. Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010;122:2430-2440.
73. Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *New Engl J Med*. 2011;364:1643-1656.
74. Colan SD. Clinical issues in the pediatric hypertrophic cardiomyopathies. *Prog Pediatr Cardiol*. 2009;25:27.
75. Landstrom AP, Ackerman MJ, Ho CY. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010;122:2441-2450.
76. Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- β . *J Clin Invest*. 2010;120:3520-3529.
77. Tian T, Liu Y, Zhou X et al. Progress in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A mini-review. *Gerontology*. 2013;59:199-205.
78. Witjas-Paalberends ER, Güçlü A, Germans T et al. Gene-specific increase in the energetic cost of contraction in hypertrophic cardiomyopathy caused by thick filament mutations. *Cardiovasc Res*. 2014;103:248-257.
79. Valdés-Mas R, Gutiérrez-Fernández A, Gómez J et al. Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Communications*. 2014;5
80. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: The complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:531-547.
81. Hershberger RE, Norton N, Morales A et al. Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:155-161.
82. Tariq M, Ware SM. Importance of genetic evaluation and testing in pediatric cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2014;6:1156-1165.
83. McNally EM, Golbus JR, Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123:19-26.

84. Taylor M, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:27.
85. Haghighi K, Kolokathis F, Pater L et al. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest.* 2003;111:869-876.
86. Roberts AM, Ware JS, Herman DS et al. Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med.* 2015;7:270ra276.
87. Herman DS, Lam L, Taylor MRG et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *New Engl J Med.* 2012;366:619-628.
88. Norton N, Li D, Rampersaud E et al. Exome sequencing and genome-wide linkage analysis in 17 families illustrate the complex contribution of TTN truncating variants to dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:144-153.
89. Feng J, Yan J, Buzin CH et al. Mutations in the dystrophin gene are associated with sporadic dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab.* 2002;77:119-126.
90. Barth PG, Scholte HR, Berden JA et al. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci.* 1983;62:327-355.
91. da Cruz E, Ivy D, Jaggars J. *Pediatric and congenital cardiology, cardiac surgery and intensive care.* Springer London; 2014.
92. Fatkin D, Otway R, Richmond Z. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Clin.* 2010;6:129-140.
93. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ et al. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation.* 1989;80:564-572.
94. Wilkinson JD, Landy DC, Colan SD et al. The Pediatric Cardiomyopathy Registry and Heart Failure: Key results from the first 15 years. *Heart Fail Clin.* 2010;6:401-413.
95. Basso C, Corrado D, Bauce B et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* 2012;5:1233-1246.
96. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Prasad SK et al. Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy: an under-recognized clinical entity. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:2175-2187.
97. Rampazzo A, Nava A, Malacrida S et al. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2002;71:1200-1206.
98. Gerull B, Heuser A, Wichter T et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2004;36:1162-1164.
99. Pilichou K, Nava A, Basso C et al. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 2006;113:1171-1179.
100. Syrris P, Ward D, Evans A et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet.* 2006;79:978-984.

101. Tiso N, Stephan DA, Nava A et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet.* 2001;10:189-194.
102. Beffagna G, Occhi G, Nava A et al. Regulatory mutations in transforming growth factor- β 3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res.* 2005;65:366-373.
103. Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet.* 2008;82:809-821.
104. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *The Lancet.* 2000;355:2119-2124.
105. Norgett EE, Hattell SJ, Carvajal-Huerta L et al. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2761-2766.
106. Kaplan SR, Gard JJ, Carvajal-Huerta L et al. Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13:26-32.
107. Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ. Genetics of right ventricular cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005;16:927-935.
108. Corrado D, Leoni L, Link MS et al. Implantable cardioverter-defibrillator therapy for prevention of sudden death in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circulation.* 2003;108:3084-3091.
109. Saffitz JE. Dependence of electrical coupling on mechanical coupling in cardiac myocytes: Insights gained from cardiomyopathies caused by defects in cell-cell connections. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1047:336-344.
110. Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N et al. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm.* 2004;1:3-11.
111. Ross SE, Hemati N, Longo KA et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* 2000;289:950-953.
112. Hoedemaekers YM, Caliskan K, Majoor-Krakauer DF. Noncompaction cardiomyopathy. *Clinical cardiogenetics.* Springer; 2011:97-122.
113. Feldt RH, Rahimtoola SH, Davis GD et al. Anomalous ventricular myocardial patterns in a child with complex congenital heart disease. *Am J Cardiol.* 1969;23:732-734.
114. Chin TK, Perloff JK, Williams RG et al. Isolated noncompaction of left ventricular myocardium. A study of eight cases. *Circulation.* 1990;82:507-513.
115. Oechslin EN, Attenhofer Jost CH, Rojas JR et al. Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy with poor prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:493-500.
116. Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S et al. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2014-2027.

117. Garcia-Pavia P, de la Pompa JL. Left ventricular noncompaction: A genetic cardiomyopathy looking for diagnostic criteria*. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:1981-1983.
118. Camerini F, Mestroni L, Sinagra G et al. The role of clinical observation: Red flag 6 — left ventricular non-compaction. In: Sinagra G, Mestroni L, Camerini F, eds. *Genetic Cardiomyopathies.* Springer Milan; 2013:71-72.
119. Gati S, Chandra N, Bennett RL et al. Increased left ventricular trabeculation in highly trained athletes: do we need more stringent criteria for the diagnosis of left ventricular non-compaction in athletes? *Heart.* 2013;99:401-408.
120. Arbustini E, Weidemann F, Hall JL. Left ventricular noncompaction: A distinct cardiomyopathy or a trait shared by different cardiac diseases? *J Am Coll Cardiol.* 2014;64:1840-1850.
121. Dooijes D, Hoedemaekers Y, Michels M et al. Left ventricular noncompaction cardiomyopathy: disease genes, mutation spectrum and diagnostic implications. 2009,
122. Hoedemaekers YM, Caliskan K, Michels M et al. The importance of genetic counseling, DNA diagnostics, and cardiologic family screening in left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:232-239.
123. Barth PG, Valianpour F, Bowen VM et al. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): An update. *Am J Med Genet A.* 2004;126:349-354.
124. Ichida F, Tsubata S, Bowles KR et al. Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation.* 2001;103:1256-1263.
125. Russo LM, Webber SA. Idiopathic restrictive cardiomyopathy in children. *Heart.* 2005;91:1199-1202.
126. Kirkels J, de Jonge N. Restrictive cardiomyopathy. *Clinical Cardiogenetics.* Springer; 2011:129-139.
127. Kaski JP, Syrris P, Burch M et al. Idiopathic restrictive cardiomyopathy in children is caused by mutations in cardiac sarcomere protein genes. *Heart.* 2008;94:1478-1484.
128. Mogensen J, Kubo T, Duque M et al. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *The Journal of Clinical Investigation.* 2003;111:209-216.
129. Katriotis D, Wilmshurst PT, Wendon JA et al. Primary restrictive cardiomyopathy: clinical and pathologic characteristics. *J Am Coll Cardiol.* 1991;18:1230-1235.
130. Cubero GI, Larraya GL, Reguero JR. Familial restrictive cardiomyopathy with atrioventricular block without skeletal myopathy. *Exp Clin Cardiol.* 2007;12:54.
131. Merlo M, Spezzacatene A, Brun F et al. Definition, classification, epidemiology, and clinical relevance of cardiomyopathies. In: Pinamonti B, Sinagra G, eds. *Clinical Echocardiography and Other Imaging Techniques in Cardiomyopathies.* Springer; 2014:3-12.
132. Jenni R, Oechslin EN, van der Loo B. Isolated ventricular non-compaction of the myocardium in adults. *Heart.* 2007;93:11-15.
133. Baró I, Escande D, Demolombe S. Basic physiology of ion channel function. In: Gussak I, Antzelevitch C, eds. *Electrical Diseases of the Heart.* Springer London; 2013:7-24.
134. Hille B. *Ion channels of excitable membranes.* MA, USA: Sinauer Sunderland; 2001.

135. Amin AS, Tan HL, Wilde AA. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*. 2010;7:117-126.
136. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 2005;85:1205-1253.
137. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias[mdash]diagnosis and therapy. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9:319-332.
138. Antzelevitch C, Burashnikov A. Mechanisms of Cardiac Arrhythmia. In: Gussak I, Antzelevitch C, eds. *Electrical Diseases of the Heart*. Springer London; 2013:93-128.
139. Wit AL, Cranefield PF. Triggered and automatic activity in the canine coronary sinus. *Circul Res*. 1977;41:434-445.
140. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and Regulation of the Heart Automaticity. *Physiol Rev*. 2008;88:919-982.
141. Garratt C. *Mechanisms and Management of Cardiac Arrhythmias*. Wiley; 2001.
142. Gaztañaga L, Marchlinski FE, Betensky BP. Mecanismos de las arritmias cardiacas. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:174-185.
143. Zipes DP. Mechanisms of clinical arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:902-912.
144. Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM et al. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circul Res*. 2002;91:e21-e26.
145. Priori SG, Napolitano C, Tiso N et al. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2001;103:196-200.
146. Fuster V, Walsh R, Harrington R. *Hurst's the Heart: Two Volume Set*. McGraw Hill Professional; 2010.
147. Castellanos A, Ferreiro J, Pefkaros K et al. Effects of lignocaine on bidirectional tachycardia and on digitalis-induced atrial tachycardia with block. *Br Heart J*. 1982;48:27-32.
148. Priori SG, Napolitano C, Memmi M et al. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2002;106:69-74.
149. Kléber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev*. 2004;84:431-488.
150. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH et al. Heterogeneity within the ventricular wall. *Circ Res*. 1991;69:427.
151. Di Diego JM, Sun Z-Q, Antzelevitch C. $I_{(to)}$ and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;271:H548-H561.
152. Volders PG, Sipido KR, Carmeliet E et al. Repolarizing K^+ currents I_{TO1} and I_{Ks} are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation*. 1999;99:206-210.
153. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L et al. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2009;120:1761-1767.

154. Tester DJ, Ackerman MJ. Cardiac channelopathies and the molecular autopsy. In: Collins K, Byard R, eds. *Forensic Pathology of Infancy and Childhood*. Springer; 2014:899-942.
155. Arnestad M, Crotti L, Rognum TO et al. Prevalence of long QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 2007;115:361 - 367.
156. Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W. QT interval: how to measure it and what is "normal". *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17:333-336.
157. Romano C, Gemme G, Pongiglione R. Aritmie cardiache rare dell'eta pediatrica. *Clin Pediatr (Phila)*. 1963;45:656 - 683.
158. Ward OC. A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc*. 1964;54:103 - 106.
159. Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval, and sudden death. *Am Heart J*. 1957;54:59 - 68.
160. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*. 2001;104:569-580.
161. Wang Q, Curran ME, Splawski I et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet*. 1996;12:17 - 23.
162. Curran ME, Splawski I, Timothy KW et al. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*. 1995;80:795 - 803.
163. Wang Q, Shen J, Splawski I et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*. 1995;80:805 - 811.
164. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation*. 2011;123:1021-1037.
165. Tester DJ, Benton AJ, Train L et al. Prevalence and spectrum of large deletions or duplications in the major long QT syndrome-susceptibility genes and implications for long qt syndrome genetic testing. *Am J Cardiol*. 2010;106:1124-1128.
166. Schwartz PJ. Cardiac sympathetic innervation and the sudden infant death syndrome. A possible pathogenetic link. *Am J Med*. 1976;60:167 - 172.
167. Maron BJ, Clark CE, Goldstein RE et al. Potential role of QT interval prolongation in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 1976;54:423 - 430.
168. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A et al. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *New Engl J Med*. 1998;338:1709-1714.
169. Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R et al. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *New Engl J Med*. 2000;343:262-267.
170. Schwartz PJ, Priori SG, Bloise R et al. Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *The Lancet*. 2001;358:1342-1343.
171. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:1391-1396.
172. Priori SG, Napolitano C, Giordano U et al. Brugada syndrome and sudden cardiac death in children. *The Lancet*. 2000;355:808-809.

173. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 1998;392:293-296.
174. Berne P, Brugada J. Brugada syndrome 2012. *Circ J*. 2012;76:1563-1571.
175. Sarquella-Brugada G, Campuzano O, Arbelo E et al. Brugada syndrome: clinical and genetic findings. *Genet Med*. 2015;10.1038/gim.2015.35
176. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M et al. An international compendium of mutations in the *SCN5A*-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2010;7:33-46.
177. Mizusawa Y, Wilde AAM. Brugada syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2012;5:606-616.
178. Benito B, Brugada J, Brugada R et al. Síndrome de Brugada. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:1297-1315.
179. Raju H, Papadakis M, Govindan M et al. Low prevalence of risk markers in cases of sudden death due to Brugada syndrome: Relevance to risk stratification in Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:2340-2345.
180. Tan B-H, Pundi KN, Van Norstrand DW et al. Sudden infant death syndrome-associated mutations in the sodium channel beta subunits. *Heart Rhythm*. 2010;7:771-778.
181. Van Norstrand DW, Valdivia CR, Tester DJ et al. Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like gene (GPD1-l) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 2007;116:2253-2259.
182. Probst V, Denjoy I, Merregalli PG et al. Clinical aspects and prognosis of brugada syndrome in children. *Circulation*. 2007;115:2042-2048.
183. Ylänen K, Poutanen T, Hiippala A et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Eur J Pediatr*. 2010;169:535-542.
184. Reid D, Tynan M, Braidwood L et al. Bidirectional tachycardia in a child. A study using His bundle electrography. *Br Heart J*. 1975;37:339-344.
185. Coumel P. Catecholamine-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children: report of four cases. *Br Heart J*. 1978;40:28-37.
186. Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children: A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation*. 1995;91:1512-1519.
187. Jiang D, Xiao B, Yang D et al. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca^{2+} release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13062-13067.
188. Mohamed U, Napolitano C, Priori SG. Molecular and electrophysiological bases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18:791-797.
189. Brugada R, Brugada J, Brugada P. *Clinical approach to sudden cardiac death syndromes*. Springer; 2010.
190. Swan H, Piippo K, Viitasalo M et al. Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:2035-2042.

191. Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2001;103:485-490.
192. Liu N, Rizzi N, Boveri L et al. Ryanodine receptor and calsequestrin in arrhythmogenesis: What we have learnt from genetic diseases and transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;46:149-159.
193. Kontula K, Laitinen PJ, Lehtonen A et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: Recent mechanistic insights. *Cardiovasc Res*. 2005;67:379-387.
194. van der Werf C, Wilde AAM. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: from bench to bedside. *Heart*. 2013;99:497-504.
195. Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvin A et al. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet*. 2012;21:2759-2767.
196. Nyegaard M, Overgaard Michael T, Søndergaard Mads T et al. Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;91:703-712.
197. Tester DJ, Dura M, Carturan E et al. A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): Stress-induced leak via ryanodine receptors. *Heart Rhythm*. 2007;4:733-739.
198. Allouis M, Probst V, Jaafar P et al. Unusual clinical presentation in a family with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia due to a G14876A ryanodine receptor gene mutation. *The American Journal of Cardiology*. 2005;95:700-702.
199. Bjerregaard P, Gussak I. Short QT syndrome. In: Gussak I, Antzelevitch C, eds. *Electrical Diseases of the Heart*. Springer; 2013:569-581.
200. Gussak I, Brugada P, Brugada J et al. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology*. 2000;94:99-102.
201. The Short QT Syndrome website. <http://www.shortqtsyndrome.org/>, Fecha de acceso: 29 de enero de 2015
202. Iribarren C, Round AD, Peng JA et al. Short QT in a cohort of 1.7 million persons: Prevalence, correlates, and prognosis. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*. 2014;19:490-500.
203. Morphet JA. The short QT syndrome and sudden infant death syndrome. *Can J Cardiol*. 2007;23:145.
204. Wilders R. Cardiac ion channelopathies and the sudden infant death syndrome. *ISRN Cardiology*. 2012;2012:846171.
205. Giustetto C, Schimpf R, Mazzanti A et al. Long-term follow-up of patients with short QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:587-595.
206. Dipple KM, McCabe ERB. Phenotypes of patients with "simple" mendelian disorders are complex traits: Thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet*. 2000;66:1729-1735.
207. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J. *Introduction to Genetic Analysis, 10th edition*. Macmillan Higher Education; 2011.
208. GeneReviews™. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/. Fecha de acceso: 30 de enero de 2015

209. Jefferies JL, Martinez HR, Towbin JA. Genetics of congenital and acquired cardiovascular disease. In: Da Cruz E, Ivy D, Jaggars J, eds. *Pediatric and congenital cardiology, cardiac surgery and intensive care*. Springer London; 2014:3-16.
210. Bates MGD, Bourke JP, Giordano C et al. Cardiac involvement in mitochondrial DNA disease: clinical spectrum, diagnosis, and management. *Eur Heart J*. 2012;33:3023-3033.
211. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797:113-128.
212. Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ et al. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics*. 2004;114:925-931.
213. Holmgren D, Wåhlander H, Eriksson BO et al. Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease. *Eur Heart J*. 2003;24:280-288.
214. Taylor RW, Giordano C, Davidson MM et al. A homoplasmic mitochondrial transfer Ribonucleic Acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:1786-1796.
215. Santorelli FM, Tanji K, Manta P et al. Maternally inherited cardiomyopathy: an atypical presentation of the mtDNA 12S rRNA gene A1555G mutation. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64:295-300.
216. Hirano M, Pavlakis SG. Topical review: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): Current concepts. *J Child Neurol*. 1994;9:4-13.
217. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C et al. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet*. 2013;132:1077-1130.
218. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: A potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors. *Heart Rhythm*. 2012;9:57-63.
219. Rigato I, Bauce B, Rampazzo A et al. Compound and digenic heterozygosity predicts life-time arrhythmic outcome and sudden cardiac death in desmosomal gene-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;10.1161/circgenetics.113.000288
220. Page SP, Kounas S, Syrris P et al. Cardiac myosin binding protein-c mutations in families with hypertrophic cardiomyopathy: Disease expression in relation to age, gender, and long term outcome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:156-166.
221. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation*. 1999;99:529 - 533.
222. Mannens M, Smeets H. Introduction to Molecular Genetics. In: Baars H, Van der Smagt JJ, Doevendans P, eds. *Clinical Cardiogenetics*. Springer; 2011:3-19.
223. Roden DM. Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. *J Intern Med*. 2006;259:59-69.
224. Chapelon C, Piette J, Uzzan B et al. [The advantages of histological samples in sarcoidosis. Retrospective multicenter analysis of 618 biopsies performed on 416 patients]. *La Revue de medecine interne*. 1986;8:181-185.

225. Abriel H, Zaklyazminkaya EV. Cardiac channelopathies: Genetic and molecular mechanisms. *Gene*. 2013;517:1-11.
226. Miller TE, Estrella E, Myerburg RJ et al. Recurrent third-trimester fetal loss and maternal mosaicism for long-QT syndrome. *Circulation*. 2004;109:3029-3034.
227. Bezzina C, Veldkamp MW, van den Berg MP et al. A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res*. 1999;85:1206-1213.
228. Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V et al. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110:1201-1209.
229. Remme CA. Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects. *J Physiol*. 2013;591:4099-4116.
230. Biagini E, Cocco F, Ferlito M et al. Dilated-hypokinetic evolution of hypertrophic cardiomyopathy: Prevalence, incidence, risk factors, and prognostic implications in pediatric and adult patients. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1543-1550.
231. Oechslin E, Jenni R. Left ventricular non-compaction revisited: a distinct phenotype with genetic heterogeneity? *Eur Heart J*. 2011;10.1093/eurheartj/ehq508
232. Dettmeyer RB, Kandolf R. Cardiomyopathies misdiagnosed as sudden infant death syndrome (SIDS). *Forensic Sci Int*. 2009;194:e21-e24.
233. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review. *JAMA*. 2002;287:1308-1320.
234. Dipple KM, McCabe ERB. Modifier genes convert “simple” Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab*. 2000;71:43-50.
235. Marsman RF, Tan HL, Bezzina CR. Genetics of sudden cardiac death caused by ventricular arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:96-111.
236. Arking DE, Pulit SL, Crotti L et al. Genetic association study of QT interval highlights role for calcium signaling pathways in myocardial repolarization. *Nat Genet*. 2014;advance online publication
237. Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y et al. Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet*. 2013;45:1044-1049.
238. Fischer A, Gessler M. HEY genes in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:221-226.
239. Richard P, Charron P, Carrier L et al. Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003;107:2227-2232.
240. Ho CY, Lever HM, DeSanctis R et al. Homozygous mutation in cardiac troponin t: Implications for hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2000;102:1950-1955.
241. Lin TL, Ichihara S, Yamada Y et al. Phenotypic Variation of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by the Phe^{¹¹⁰}→Ile Mutation in Cardiac Troponin T. *Cardiology*. 2000;93:155-162.

242. Ingles J, Doolan A, Chiu C et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet.* 2005;42:e59.
243. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1903-1910.
244. Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: A marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2:182-190.
245. Lopes LR, Syrris P, Guttman OP et al. Novel genotype–phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2014;10.1136/heartjnl-2014-306387
246. Bos JM, Poley RN, Ny M et al. Genotype–phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab.* 2006;88:78-85.
247. Zhang M, Tavora F, Burke A. Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic DCM. *Heart.* 2011;97:2090.
248. Basso C, Burke M, Fornes P et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Archiv.* 2008;452:11-18.
249. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S et al. HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies: This document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm.* 2011;8:1308-1339.
250. Tan HL, Hofman N, van Langen IM et al. Sudden unexplained death: Heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation.* 2005;112:207-213.
251. van der Werf C, Hofman N, Tan HL et al. Diagnostic yield in sudden unexplained death and aborted cardiac arrest in the young: The experience of a tertiary referral center in The Netherlands. *Heart Rhythm.* 2010;7:1383-1389.
252. Ingles J, Yeates L, Semsarian C. The emerging role of the cardiac genetic counselor. *Heart Rhythm.* 2011;8:1958-1962.
253. Resta R, Biesecker B, Bennett R et al. A new definition of genetic counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force Report. *Journal of Genetic Counseling.* 2006;15:77-83.
254. Robinson CL, Jouni H, Kruisselbrink TM et al. Disclosing genetic risk for coronary heart disease: effects on perceived personal control and genetic counseling satisfaction. *Clin Genet.* 2015;10.1111/cge.12577:n/a-n/a.
255. Blue GM, Kasparian NA, Sholler GF et al. Genetic counselling in parents of children with congenital heart disease significantly improves knowledge about causation and enhances psychosocial functioning. *Int J Cardiol.* 2015;178:124-130.
256. Otten E, Birnie E, Ranchor AV et al. A group approach to genetic counselling of cardiomyopathy patients: satisfaction and psychological outcomes sufficient for further implementation. *Eur J Hum Genet.* 2015;10.1038/ejhg.2015.10
257. Ingles J, Yeates L, Hunt L et al. Health status of cardiac genetic disease patients and their at-risk relatives. *Int J Cardiol.* 2013;165:448-453.

258. Wordsworth S, Leal J, Blair E et al. DNA testing for hypertrophic cardiomyopathy: a cost-effectiveness model. *Eur Heart J*. 2010;31:926-935.
259. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;103:89 - 95.
260. Biobanks: Obtainment, preservation and utilisation of human biological material. Medical-ethical guidelines and recommendations. Central Ethical Committee of the Swiss Academy of Medical Sciences. Basel, Suiza Año 2006
261. Código de buenas prácticas aplicables a biobancos de investigación biomédica en España. Red Nacional de Biobancos. Instituto de Investigación Carlos III. Madrid, España. Año 2012
262. Human biobanks for research. German Ethics Council. Berlin, Alemania Año 2010
263. Haff LA, Smirnov IP. Multiplex genotyping of PCR products with MassTag-labeled primers. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3749-3750.
264. Haff LA, Smirnov IP. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res*. 1997;7:378-388.
265. Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R et al. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98:581-584.
266. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74:560-564.
267. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74:5463-5467.
268. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. 1953;171:737-738.
269. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-1351.
270. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
271. Dressman D, Yan H, Traverso G et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100:8817-8822.
272. Lubitz SA, Ellinor PT. Next generation sequencing for the diagnosis of cardiac arrhythmia syndromes. *Heart Rhythm*. 2015,
273. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotech*. 2009;27:182-189.
274. Weber P, Ohlendorf D, Wendoloski J et al. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*. 1989;243:85-88.
275. Hendrickson WA, Pähler A, Smith JL et al. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86:2190-2194.

276. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet.* 2011;12:745-755.
277. Graham FL, Smiley J, Russell WC et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36:59-72.
278. Lin Y-C, Boone M, Meuris L et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun.* 2014;5
279. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005;51:187-200.
280. Taylor RG, Walker DC, McInnes RR. E.coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:1677-1678.
281. Brown TA. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction.* Wiley; 2010.
282. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J Cell Comp Physiol.* 1962;59:223-239.
283. Nelson M, McClelland M. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. In: Ray W, ed. *Methods in Enzymology.* Academic Press; 1992:279-303.
284. January CT, Gong Q, Zhou Z. Long QT syndrome: Cellular basis and arrhythmia mechanism in LQT2. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2000;11:1413-1418.
285. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.
286. Walker J. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In: Walker J, ed. *The Protein Protocols Handbook.* Humana Press; 2002:11-14.
287. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1979;76:4350-4354.
288. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112:195-203.
289. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503-517.
290. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977;74:5350-5354.
291. Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ et al. HERG K⁺ channels: Structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev.* 2012;92:1393-1478.
292. Perrin MJ, Subbiah RN, Vandenberg JI et al. Human ether-a-go-go related gene (hERG) K⁺ channels: Function and dysfunction. *Prog Biophys Mol Biol.* 2008;98:137-148.
293. Trudeau M, Warmke J, Ganetzky B et al. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science.* 1995;269:92-95.

294. Molleman A. *Patch clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology*. Wiley; 2003.
295. Allegue C, Gil R, Blanco-Verea A et al. Prevalence of HCM and long QT syndrome mutations in young sudden cardiac death-related cases. *Int J Legal Med*. 2011;125:565-572.
296. Wang DW, Desai RR, Crotti L et al. Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome. *Circulation*. 2007;115:368-376.
297. Sun AY, Koontz JI, Shah SH et al. The S1103Y cardiac sodium channel variant is associated with implantable cardioverter-defibrillator events in blacks with heart failure and reduced ejection fraction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:163-168.
298. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C et al. From FastQ data to high-confidence variant calls: The Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;10.1002/0471250953.bi1110s43:11.10.11-11.10.33.
299. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:e164.
300. Tester DJ, Ackerman MJ. Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children. *Annu Rev Med*. 2009;60:69-84.
301. Ng D, Johnston JJ, Teer JK et al. Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6:337-346.
302. Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248-249.
303. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4:1073-1081.
304. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet*. 2006;43:295-305.
305. Mathe E, Olivier M, Kato S et al. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:1317-1325.
306. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR et al. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res*. 2010;20:110-121.
307. Jefferies JL. Barth syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2013;163:198-205.
308. Steward CG, Newbury-Ecob RA, Hastings R et al. Barth syndrome: An X-linked cause of fetal cardiomyopathy and stillbirth. *Prenatal Diagn*. 2010;30:970-976.
309. Clarke S, Bowron A, Gonzalez IL et al. Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:23.
310. Bione S, D'Adamo P, Maestrini E et al. A novel X-linked gene, G4.5 is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet*. 1996;12:385-389.
311. Dudek J, Cheng IF, Balleininger M et al. Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Research*. 2013;11:806-819.

312. Raval KK, Kamp TJ. Cardiomyopathy, mitochondria and Barth syndrome: iPSCs reveal a connection. *Nat Med.* 2014;20:585-586.
313. Khuchua Z, Yue Z, Batts L et al. A zebrafish model of human barth syndrome reveals the essential role of tafazzin in cardiac development and function. *Circul Res.* 2006;99:201-208.
314. Roberts AE, Nixon C, Steward CG et al. The Barth Syndrome Registry: Distinguishing disease characteristics and growth data from a longitudinal study. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:2726-2732.
315. Johnston J, Kelley RI, Feigenbaum A et al. Mutation characterization and genotype-phenotype correlation in Barth syndrome. *The American Journal of Human Genetics.* 1997;61:1053-1058.
316. Spencer CT, Bryant RM, Day J et al. Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome. *Pediatrics.* 2006;118:e337-e346.
317. Momoi N, Chang B, Takeda I et al. Differing clinical courses and outcomes in two siblings with Barth syndrome and left ventricular noncompaction. *Eur J Pediatr.* 2012;171:515-520.
318. Hoischen A, van Bon BWM, Rodriguez-Santiago B et al. De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet.* 2011;43:729-731.
319. Cardonick EH, Kuhlman K, Ganz E et al. Prenatal clinical expression of 3-methylglutaconic aciduria: Barth syndrome. *Prenatal Diagn.* 1997;17:983-988.
320. Adès LC, Gedeon AK, Wilson MJ et al. Barth syndrome: Clinical features and confirmation of gene localisation to distal Xq28. *Am J Med Genet.* 1993;45:327-334.
321. Aprikyan AA, Khuchua Z. Advances in the understanding of Barth syndrome. *Br J Haematol.* 2013;161:330-338.
322. Ferri L, Donati MA, Funghini S et al. New clinical and molecular insights on Barth syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:27.
323. Summers J, Mikolich B. Left ventricular noncompaction: A cardiomyopathy with distinct characteristics and risks. *J Cardiovasc Nurs.* 2014;29:535-543.
324. Huhta JC, Pomerance HH, Barness EG. Clinicopathologic conference: Barth syndrome. *Fetal Pediatr Pathol.* 2005;24:239-254.
325. Moon RY, Horne RSC, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *The Lancet.* 2007;370:1578-1587.
326. Brugada R, Hong K, Dumaine R et al. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation.* 2004;109:30-35.
327. Hong KUI, Bjerregaard P, Gussak I et al. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005;16:394-396.
328. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Translational Research.* 2013;161:1-14.
329. Hamill O, Marty A, Neher E et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 1981;391:85-100.
330. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME et al. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell.* 1995;81:299-307.

331. Sanguinetti MC, Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *The Journal of General Physiology*. 1990;96:195-215.
332. Anson BD, Ackerman MJ, Tester DJ et al. Molecular and functional characterization of common polymorphisms in HERG (KCNH2) potassium channels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2004,
333. Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A et al. A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res*. 2003;59:27-36.
334. Gouas L, Nicaud V, Berthet M et al. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum Genet*. 2005;13:1213-1222.
335. Paavonen KJ, Chapman H, Laitinen PJ et al. Functional characterization of the common amino acid 897 polymorphism of the cardiac potassium channel KCNH2 (HERG). *Cardiovasc Res*. 2003;59:603-611.
336. Pfeufer A, Jalilzadeh S, Perz S et al. Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the general population: Results from the KORA study. *Circ Res*. 2005;96:693-701.
337. Pietilä E, Fodstad H, Niskasaari E et al. Association between HERG K897T polymorphism and QT interval in middle-aged Finnish women. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:511-514.
338. Nof E, Cordeiro JM, Pérez GJ et al. A common single nucleotide polymorphism can exacerbate long-QT type 2 syndrome leading to sudden infant death. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:199-206.
339. Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature*. 1996;379:833-836.
340. Gaita F, Giustetto C, Bianchi F et al. Short QT syndrome: A familial cause of sudden death. *Circulation*. 2003;108:965-970.
341. Trachtenberg FL, Haas EA, Kinney HC et al. Risk factor changes for sudden infant death syndrome after initiation of back-to-sleep campaign. *Pediatrics*. 2012;129:630-638.
342. Liu B, Tikunova SB, Kline KP et al. Disease-related cardiac troponins alter thin filament Ca²⁺ association and dissociation rates. *PLoS One*. 2012;7:e38259.
343. Farman GP, Muthu P, Kazmierczak K et al. Impact of familial hypertrophic cardiomyopathy-linked mutations in the NH2 terminus of the RLC on β -myosin cross-bridge mechanics. *J Appl Physiol*. 2014;117:1471-1477.
344. Sweeting J, Semsarian C. Cardiac abnormalities and sudden infant death syndrome. *Paediatr Respir Rev*. 2014;15:301-306.
345. Kryukov GV, Pennacchio LA, Sunyaev SR. Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *Am J Hum Genet*. 2007;80:727-739.
346. Mann SA, Otway R, Guo G et al. Epistatic effects of potassium channel variation on cardiac repolarization and atrial fibrillation risk. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1017-1025.