



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,

ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y

NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

"CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LA CARDIOMIOPATIA DILATADA FAMILIAR EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS DIAGNOSTICADOS CON CARDIOMIOPATÍA DILATADA IDIOPÁTICA O FAMILIAR"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

RIGOBERTO ROSENDO GUTIÉRREZ

TUTOR

DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,

ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÉXICO, D.F. JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice.

	Páginas
Resumen.....	3
Marco Teórico.....	4
Planteamiento del Problema.....	14
Preguntas de Investigación.....	14
Justificación.....	14
Objetivos.....	15
Metodología.....	15
Resultados.....	24
Discusión.....	36
Bibliografía.....	38
Anexos.....	40

Resumen.

La Cardiomiopatía Dilatada (CMD) es una enfermedad del miocardio caracterizada por dilatación del ventrículo izquierdo, disfunción sistólica y fibrosis miocárdica. Es la principal causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes con insuficiencia cardíaca y la primera indicación de trasplante cardíaco. Las manifestaciones clínicas son variables e incluyen insuficiencia cardíaca, tromboembolismo y muerte súbita cardíaca. El diagnóstico puede ser difícil y las familias exhiben una variabilidad clínica con respecto a la gravedad, penetrancia y edad de inicio. La etiología puede ser genética en más del 50% de los casos esporádicos o familiares (CMD-F), Muchos casos de CMD-F tienen un modo de herencia autosómico dominante (90%). Más de 40 genes han sido asociados con la enfermedad y la frecuencia de las mutaciones varía de una población a otra. En México, el diagnóstico molecular de CMD no está disponible y la distribución de las mutaciones no se conoce. La secuenciación de nueva generación (NGS) ha revolucionado las pruebas genéticas en CMD y está permitiendo la identificación de nuevas mutaciones causantes de enfermedad así como variantes modificadoras y nuevos genes causales.

El objetivo de este estudio fue identificar las mutaciones causantes de enfermedad en un grupo de pacientes mexicanos con CMD esporádica o familiar, utilizando la secuenciación de nueva generación (NGS) para 31 genes.

Se reclutaron los pacientes que fueron diagnosticados con CMD en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez durante el 2013 a 2014, y el estudio genómico se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado; el estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Los datos clínicos fueron obtenidos de los expedientes y de la consulta externa con la exploración y entrevista con el paciente. Se extrajo DNA de sangre venosa periférica en los pacientes y familiares disponibles. Se secuenciaron los exones codificantes y los intrones flanqueantes en 31 genes que se caracterizan por ser causales de CMD. Los resultados fueron analizados y las variantes encontradas se verificaron por secuenciación capilar.

Se estudiaron 22 casos índice y en algunos casos también a sus familiares, se observaron mutaciones o variantes probablemente causales de CMD en 12 casos (54%); de estos, en 10 (83%) se encontró una mutación con reporte en las bases de datos como causal de CMD, en dos (17%) únicamente variantes con predicción funcional de ser patológicas. De los casos donde se encontró una mutación reportada, en tres estaban además asociadas a una variante con predicción funcional de ser patológicas y en un caso se encontraban dos mutaciones reportadas. De los once casos que tuvieron al menos una mutación reportada, en nueve se había relacionado a CMD y en una a síndrome de Brugada. La NGS es una herramienta útil para entender la causa genética de la CMD, las variantes modificadoras y la herencia oligogénica.

Marco Teórico.

Definición.

La cardiomiopatía es una enfermedad heterogénea causada por una anomalía funcional del músculo cardíaco (1). Con respecto a la Cardiomiopatía Dilatada (CMD), la OMS y la Sociedad Internacional de Cardiología la clasifican en primaria y secundaria. La cardiomiopatía secundaria es causada por factores extrínsecos, que incluyen infección, isquemia, hipertensión y alteraciones metabólicas, mientras que el diagnóstico de cardiomiopatía primaria (idiopática o familiar) se basa en la exclusión de cardiomiopatía secundaria y hay una gran variedad de tipos clínicos diferentes (2). La CMD está caracterizada por dilatación y alteraciones en la contracción del ventrículo izquierdo o ambos, con disfunción sistólica, con una fracción de eyección menor a 45% y síntomas clínicos de falla cardíaca, lo cual es a menudo asociado con arritmia y muerte súbita. (1).

Epidemiología.

Como grupo, las cardiomiopatías afectan a uno de cada 390 personas, no obstante la verdadera prevalencia de esta condición es difícil de determinar por los pacientes asintomáticos. De entre las cardiomiopatías, un 25% corresponde a CMD, que en Estados Unidos tiene una prevalencia de 1 en 2740 (1), causa 50,000 hospitalizaciones y 10,000 muertes cada año en los Estados Unidos, siendo la primera indicación de trasplante de corazón; el promedio de vida de los pacientes con CMD una vez siendo sintomáticos, es de 80% a los 5 años. En niños el índice de sobrevivencia a los 9 años se ha estimado en 69.8%. La incidencia de CMD ha incrementado en los últimos 5 a 10 años, quizá debido al desarrollo de nuevas técnicas no invasivas que facilitan el diagnóstico (3).

En niños mayores de un año, las cardiomiopatías son la causa más frecuente de insuficiencia cardíaca y la indicación más común de trasplante cardíaco; su prevalencia entre uno y quince años de edad es de 0.28/100,000 en niños coreanos y 1.13/100,000 en niños estadounidenses, 30 a 48% de estos casos, son CMD de tipo familiar

Diagnóstico.

La presentación clínica es variable, puede haber inicialmente fatiga generalizada, pérdida de peso, pérdida del apetito y otros síntomas poco característicos. Los pacientes que acuden a consulta en estadios más tardíos de falla cardíaca tienden a tener disnea progresiva, edema periférico, ortopnea y disnea paroxística nocturna como síntomas y signos más comunes. Menos frecuentemente ocurre síncope, dolor torácico, tromboembolismo, arritmias y rara vez muerte súbita.

Un pequeño porcentaje de pacientes desarrolla embolia sistémica o pulmonar, generalmente en estadios tardíos de la enfermedad. Las alteraciones del ritmo, como taquicardias ventriculares y taquicardias supraventriculares no son comunes. Aproximadamente 25% a 35% de los pacientes tiene taquicardia ventricular no sostenida, mientras que sólo unos pocos tienen taquicardia supraventricular (generalmente fibrilación atrial). Por lo tanto, el síncope y muerte súbita son generalmente resultado de la gravedad de la arritmia.

Los niños generalmente se presentan con signos de insuficiencia cardíaca congestiva, taquipnea, ventilación laboriosa, anorexia y falta de ganancia de peso. En niños mayores hay signos de pobre tolerancia al ejercicio y alteraciones gastrointestinales. Casos más graves experimentan síncope, arritmias o muerte súbita. Otros datos es que presentan mayor dilatación del ventrículo izquierdo (forma esférica) de lo usual con función sistólica disminuida, regurgitación mitral y arritmias ventriculares.

El diagnóstico implica descartar las causas conocidas de cardiomiopatía dilatada y para esto es necesario realizar una historia clínica completa, donde se especifique si el paciente abusa del alcohol, de la cocaína, si tuvo enfermedades de importancia (infecciones, arritmias), si toma medicamentos, si ha viajado (para descartar exposición a agentes infecciosos), embarazo y ocupación (para descartar posible exposición).

Los estudios de laboratorio de rutina deben incluir pruebas para causas conocidas de CMD, como la glucosa (diabetes mellitus), perfil tiroideo (hipotiroidismo o hipertiroidismo), estudios de hierro (hemocromatosis y sobrecarga de hierro), un panel metabólico, pruebas de función hepática, creatinina cinasa e índice de sedimentación eritrocitaria.

Las radiografías de tórax generalmente muestran cardiomegalia con o sin congestión vascular pulmonar, dependiendo del grado de falla cardíaca.

El electrocardiograma es generalmente normal en pacientes con CMD asintomáticos. Sin embargo, los pacientes sintomáticos a menudo muestran defectos de conducción, arritmias atriales e hipertrofia ventricular. Se debe realizar en todos los pacientes con CMD, ya que puede evidenciar isquemia, hipertrofia, defectos de conducción.

El ecocardiograma es útil en cualquier paciente en el que se sospecha de CMD, ya que es rápido, no invasivo, barato y permite visualizar la anatomía del corazón. Ayuda a conocer las causas de la CMD, como la enfermedad cardíaca valvular.

Las pruebas de esfuerzo permiten descartar enfermedad arterial coronaria y además, evalúan la capacidad funcional en pacientes con CMD idiopática mientras que la angiografía coronaria puede requerirse para excluir la enfermedad cardíaca isquémica.

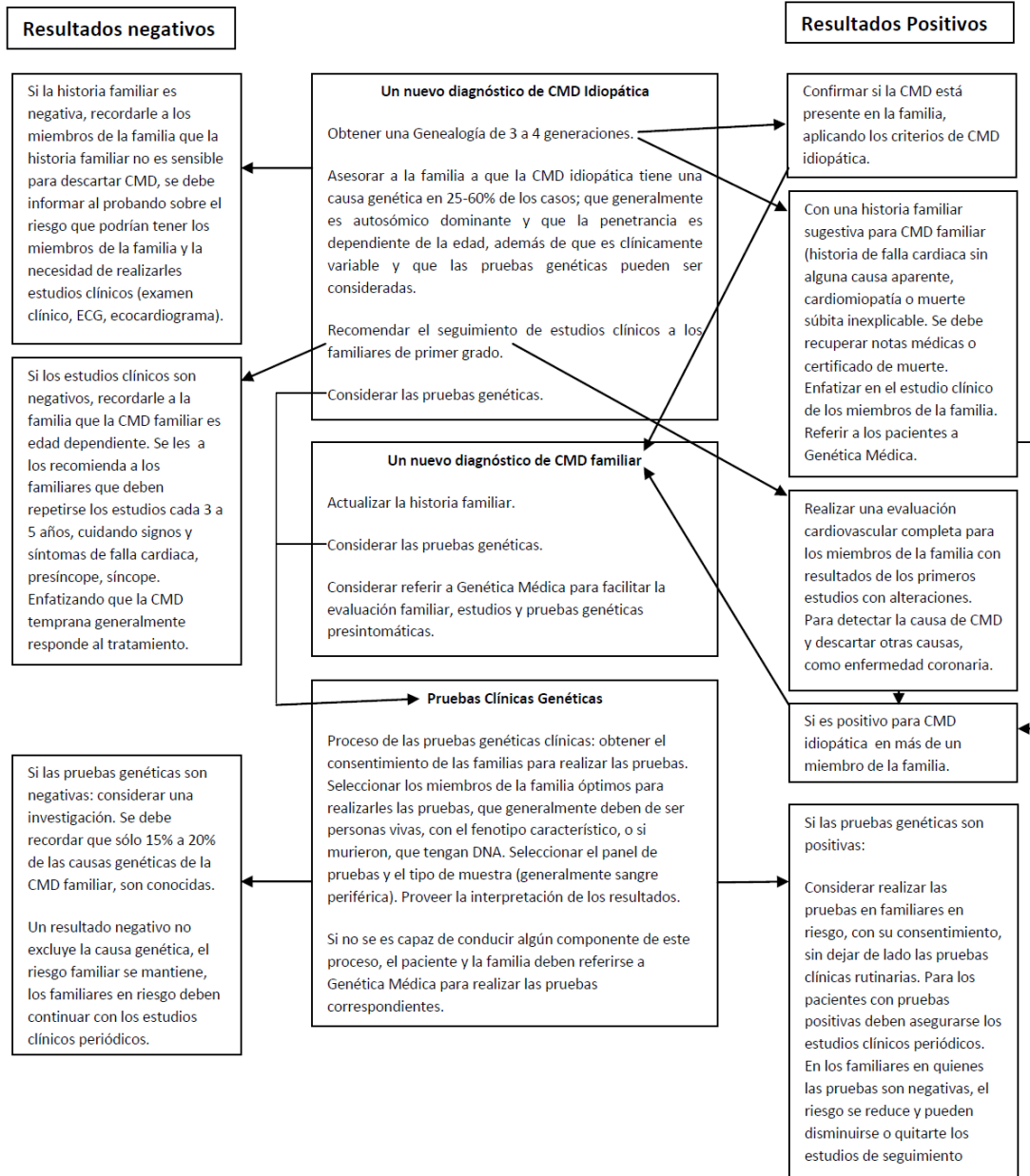
Las pruebas serológicas virales pueden ser útiles en pacientes con inmunosupresión crónica y en pacientes en quienes se sospecha de miocarditis viral aguda, pero no se realizan rutinariamente en pacientes con CMD.

La biopsia endomiocárdica se reserva sólo a pacientes con sospecha de enfermedad infiltrativa del miocardio, tales como hemocromatosis o amiloidosis; puede considerarse también en pacientes con falla cardíaca fulminante, para excluir miocarditis de células gigantes, la cual requiere tratamiento agresivo y temprano.

La biopsia de músculo esquelético se utiliza en casos raros que presentan una alteración primaria de músculo (distrofia muscular de Duchenne) (3).

No se han encontrado parámetros clínicos o morfológicos capaces de predecir las formas familiares, sólo se ha encontrado que los casos esporádicos tienen edad más avanzada y una peor función ventricular en comparación con los casos familiares. (5). A muchos pacientes se les realiza el diagnóstico hasta que desarrollan los síntomas o arritmias, o mediante alteraciones que se detectan en evaluaciones rutinarias (6), en el esquema 1 se resume la manera en cómo abordar clínicamente un paciente con CMD (7).

Esquema 1: Abordaje clínico de un paciente con CMD.



Diagnóstico Diferencial.

El diagnóstico diferencial de CMD incluye otras causas de crecimiento ventricular izquierdo, entre ellas, la Cardiomiopatía Hipertrófica (CMH) y la Cardiomiopatía Restrictiva (CMR) (Ver tabla 1) (7) (4).

Tabla 1: Características de las Cardiomiopatías.

Tipo de cardiomiopatía	Características	Comentarios
Cardiomiopatía Dilatada	Dilatación de ventrículo izquierdo, disfunción sistólica.	Puede también estar acompañado de dilatación de ventrículo derecho o atrial y dilatación ventricular (cuatro cámaras). Generalmente se caracteriza por una fracción de eyección <50 o 45%; la fracción de eyección puede ser de 10-20% cuando la enfermedad es avanzada.
Cardiomiopatía Hipertrófica	Hipertrofia de ventrículo izquierdo. No hay dilatación. Puede ser hipercontráctil. En estadios más tardíos se parece a CMD.	Puede mostrar asimetría septal, hipertrófica o concéntrica. Hipertrofia de ventrículo izquierdo. La hipertrofia ocurre comúnmente con engrosamiento de la pared ventricular más de 15 mm, aunque puede ser grave (>20 mm) o muy grave (>>20 mm), cuando lo normal es que la pared del ventrículo izquierdo sea menor o igual a 12 mm. Cavidad del ventrículo izquierdo más pequeño o normal. Fracción de eyección >80%. El estadio tardío de la enfermedad puede mostrar una disminución de la fracción de eyección y dilatación.
Cardiomiopatía Restrictiva	Moderada hipertrofia ventricular izquierda. Función sistólica normal a moderada disminución.	CMR generalmente se define fisiológicamente, cuando es necesaria una elevada presión diastólica del ventrículo izquierdo para obtener un volumen diastólico final del ventrículo izquierdo, normal. La fracción de eyección puede ser normal y generalmente no es menor de 40%.
Cardiomiopatía ventricular arritmogénica derecha	Pérdida de miocitos e infiltración de fibroblastos del miocardio asociados con la susceptibilidad de arritmias y muerte súbita en jóvenes.	Inicialmente sólo afecta ventrículo derecho, es familiar en 30 a 50%. Más del 80% se diagnóstica antes de los 40 años de edad. El electrocardiograma reporta alteraciones de la conducción.
Ventrículo Izquierdo no compactado	Pesada trabeculación o apariencia esponjosa del miocardio del ventrículo izquierdo.	Se propone que puede ser causado durante la formación embrionaria o adquirirse después y se ha sugerido que es secundario a trastornos mitocondriales. Inicia a edades tempranas con características clínicas variables, con hipertrofia ventricular

izquierda principalmente, aunque también derecha; eventos tromboembólicos y muerte súbita.

Una fracción de eyección normal se considera entre 55 a 75%. Normalmente la pared del ventrículo izquierdo tiene un grosor de 9-11 mm.

La Cardiomiopatía es una patología compleja, la subdivisión anterior es sólo académica, ya que los estudios familiares han demostrado que la CMH podría ser una fase temprana de un fenotipo que subsecuentemente evoluciona a CMD o CMR. Además en una misma familia pueden coexistir Cardiomiopatía Ventricular derecha Arritmogénica y CMD, o bien CMD y CMH con la misma mutación (8).

Etiología.

La causa más común de CMD en los Estados Unidos es la isquemia cardíaca, producida por enfermedad arterial coronaria, causas menos comunes son alteraciones estructurales de corazón, enfermedad tiroidea, enfermedad por acumulación de hierro, exposición a cardiotoxinas, radiación en tórax, artritis inflamatoria, miocarditis, infecciones por protozoarios (p. ej: enfermedad de Chagas), y muchas otras. La participación genética en la CMD se desconocía hasta 1993 cuando se encontró una mutación en el gen de distrofina (*DMD*) en hombres con CMD ligada al X. La historia familiar de la misma enfermedad indica que los factores genéticos contribuyen a la etiología y patogénesis. Entre los factores genéticos se encuentran las mutaciones que causan la enfermedad o los polimorfismos genéticos que se han encontrado asociados a la enfermedad y que probablemente están involucrados en la patogénesis de esta enfermedad en su forma multifactorial (7). La CMD familiar es debida a una variante o mutación genética con un efecto mayor y a otros factores que alteran su expresividad, tales como genes modificadores y factores ambientales; por ejemplo, se han encontrado autoanticuerpos en 20% de los familiares de primer grado y en 58% de las familias estudiadas, tanto en casos esporádicos como familiares de cardiomiopatía dilatada. (5).

Se ha reportado que en 30% a 50% de los pacientes con CMD se identifica una historia familiar positiva (8), principalmente consistente con herencia autosómico dominante (90%) (7), no obstante algunos casos son autosómico recesivos (1-2%) (7) o recesivos ligados al X (5-10%) (2) (7) y mitocondriales. Más de 40 genes han sido identificados en asociación con CMD familiar no sindrómica. Cuando la CMD ocurre en ausencia de una causa identificable, la enfermedad es referida como idiopática; la cardiomiopatía dilatada idiopática (CMD idiopática) en 20% a 50% de los casos es un trastorno familiar, y se detecta mediante estudios ecocardiográficos y electrocardiográficos en familiares de primer grado (6) (9).

Se ha demostrado que la CMD familiar (cuyo criterio es la presencia de dos o más familiares afectados de CMD o con antecedente de un familiar de primer grado con muerte súbita de causa desconocida antes de los 35 años) tiene una expresividad variable y penetrancia incompleta dependiente de la edad, se desarrolla en niños (principalmente en el caso de las mitocondriales), adolescentes y adultos (con un pico entre los 20 y 50 años de edad), pero rara vez en la tercera

edad. Se ha demostrado que la CMD familiar tiene heterogeneidad genética, con mutaciones identificadas en genes que codifican para proteínas sarcoméricas (cadena pesada de β -miosina, troponina cardiaca T, troponina C y troponina I), proteínas del músculo cardiaco LIM (CLP), cypher/ZASP (LBD3) y vinculina (VCL), desmoplaquina (DSP), desmina (DES), teletonina (TCAP), tafazzina (G4.5), también como otros que codifican para proteínas del complejo asociado a distrofina que incluye la δ -sarcoglicano (SGCD) y distrofina (DMD). Se han descrito alteraciones de las interacciones sarcomero-citoesqueleto, de la arquitectura del miocito, depósitos de amiloide, anormalidades desmosomales, atesoramiento del calcio, función de los canales iónicos, dinámica de la energía mitocondrial e integridad de la membrana y citoesqueleto. Debido a que esta heterogeneidad genética existe en el contexto de un fenotipo común, se ha propuesto una vía final común para el desarrollo de la enfermedad ante cualquier anormalidad proteica, que afecta la función del cardiomiocito y conduce a daño celular, inflamación, depósito de colágeno, remodelación, dilatación y falla sistólica; en la tabla dos especificamos varios genes relacionados con CMD (Ver tabla 2) (6) (7). Cabe mencionar que en la tabla dos se describen las frecuencias para diferentes mutaciones, que fueron tomadas de metanálisis y estudios en diferentes poblaciones; estas frecuencias varían notablemente dependiendo de la población en que se haya realizado el estudio, por ejemplo en Holanda, en una muestra de 418 pacientes con CMD, la mutación más frecuente fue en el gen *PLN* en un 14%, en otras regiones del mundo se conoce con una frecuencia de 0.4% (10). Esta diferencia observable en la frecuencia puede deberse a que en varias poblaciones el número de pacientes fue muy pequeño, o que los estudios existentes utilizaron diferentes criterios de selección de pacientes, o que en realidad existen diferencias que dependen de la población en que se estudian (Ver tabla 2).

Tabla 2: Genes reportados en asociación con CMD no síndromica.

GEN	PROTEINA	FUNCIÓN	TAMAÑO (exones/no. de bases)	MODO DE HERENCIA	FRECUENCIA (%)
<i>TTN</i> (2q31)	Titina	Estructura sarcomérica; andamio de otras proteínas.	352/ 304,814	AD	20-27
<i>PLN</i> (6q22.1)	Fosfolambda	Regulador del Ca en el retículo sarcoplásmico; inhibe la bomba SERCA2.	2/ 12,452	AD	0.4-14
<i>LMNA</i> (1q22)	Laminina A/C	Estructura/estabilidad de la membrana interna nuclear; expresión génica.	22/57,517	AD	5-8
<i>DMD</i> (Xp21.2-p21.1)	Distrofina	DAGC; traduce fuerza contractile	79/2,220,391	LX	7.5
<i>LDB3</i> (10q23.2)	Ciper/Zasp	Ensamble del citoesqueleto; agrupamiento de las proteínas de membrana.	17/ 69,277	AD	1-5.8
<i>MYH6</i> (14q11.2)	α -miosina de cadena pesada	Proteína sarcomérica: contracción muscular.	39/26,288	AD	4.3
<i>MYH7</i> (14q11.2)	α -miosina de cadena pesada	Proteína sarcomérica: contracción muscular.	40/22,883	AD	2-4.2
<i>MYPN</i> (10q21.1)	Miopaladina	Proteína sarcomérica, disco z	27/ 105,863	AD	3.5
<i>TNNT2</i>	Troponina	Proteína sarcomérica:	19/ 18,755	AD	2.9

(1q32.1)	cardiaca T	contracción muscular.			
<i>SCN5A</i> (3p22.2)	Canal de sodio	Control del flujo del ion de sodio	31/ 101,617	AD	2.6
<i>MYBPC3</i> (11p11.2)	Proteína C unida a miosina	Proteína sarcomérica: contracción muscular.	36/ 21,297	AD	2
<i>ANKRD1</i> (10q23.31)	Proteína 1 con dominio repetido de ankirina	Proteína repetida ankirina cardiaca (CARP); localizada en el complejo miopadina / titina.	9/ 9,181	Desconocida	2
<i>RBM20</i> (10q25.2)	RNA unida a proteína 20	Proteína de unión al RNA del corte y empalme	17/ 195,073	AD	1.9
<i>TMPO</i> (12q23.1)	Timopietina	También LAP2; una proteína nuclear asociada a laminina.	11/ 34,868	Desconocida	1.1
<i>LAMA4</i> (6q21)	Laminina a-4	Proteína de la matriz extracelular.	46/ 147,008	Desconocida	1
<i>VCL</i> (10q22.2)	Metavinculina	Estructura sarcomérica; discos intercalados.	24/ 122,047	AD	1
<i>TCAP</i> (17q12)	Titina-Capa o teletonina	Proteínas del disco Z que se asocian con titina; ensamble del sarcomero.	2/ 2,369	AR, AD y desconocida	1
<i>PSEN1/2</i> (14q24.2)/(1q42.13)	Presenilina 1 y 2	Proteínas transmembranales, actividad gamma secretasa.	18/ 87,274 17/ 25,922	Desconocida	1
<i>ACTN2</i> (1q42)	α -actina-2	Estructura sarcomérica; anclaje para actina miofibrilar.	24/ 78,178	AD	0.9
<i>CRYAB</i> (11q22.3)	Alfa beta cristalina	Proteína citoesquelética.	9/ 15,158	AD, AR y desconocida	0.7
<i>TPM1</i> (15q22.1)	α -tropomiosina	Proteína sarcomérica; contracción muscular.	12/ 29,284	AD	0.6
<i>ABCC9</i> (12p12.1)	SUR2A	Subunidad reguladora de Kir6.2, rectifica el canal KATP en el interior.	43/ 144,014	AD	0.6
<i>ACTC1</i> (15q14)	Actina cardiac	Proteína sarcomérica; contracción muscular.	8/ 8,044	AD	0.5
<i>PDLIM3</i> (4q35)	PDZ LIM domino de la proteína 3	Proteína citoesquelética.	8/ 34,953	Desconocida	0.5
<i>ILK</i> (11p15)	Integrina ligada a cinasa	Cinasa intracelular serina-treonina; interactúa con integrinas.	10/ 7,142	AD	0.5
<i>TNNC1</i> (3p21.3)	Troponina cardiaca C	Proteína sarcomérica; contracción muscular.	6/ 2,980	AD	0.4
<i>TNNI3</i> (19q13.4)	Troponina cardiaca I	Proteína sarcomérica, contracción muscular, también se ha visto como recesivo.	8/ 6,007	AD	0.4
<i>DES</i> (2q35)	Desmina	DAGC; traduce la fuerza contráctil.	9/ 8,363	AD	0.4
<i>SGCD</i> (5q33)	α -sarcoglicano	DAGC; traduce la fuerza contráctil.	13/ 897,446	AD, AR y desconocido	0.3
<i>CSRP3</i> (11p15.1)	Proteína LIM muscular	Sensor de estiramiento sarcomérico / discos Z.	7/ 28,543	AD	0.3
<i>EYA4</i> (6q23.2)	Ojos ausentes 4	Co-activador transcripcional	28/291,523	AD	¿?
<i>TAZ/G4.5</i> (Xq28)	Tafazina	Desconocida	11/10,212	LX	¿?

LX: Ligado al X, AD: Autosómico dominante, AR: Autosómico recesivo. ¿?: Frecuencia desconocida.

Otros genes que también están involucrados en la CMD y cuyas frecuencias son en general muy bajas, son: *BAG3* (proteína asociada a *BCL2* y que favorece la regulación de la conducción cardiaca), *DSC2* (desmocolina dos, es del complejo de desmosoma), *DSG2* (desmogleina dos, se encuentra en los desmosomas), *DSP* (desmoplaquina, es del complejo de los desmosomas), *EMD* (emerina, proteína de la envoltura nuclear), *JUP (DP3)* (cinasa ligada a integrina, se encuentra en los desmosomas), *MYOZ1* (proteína C unida a miosina, se encuentra en los discos Z), *NEBL* (cadena pesada de beta miosina, se encuentra en los discos Z), *PKP2* (nebulite, se encuentra en demosomas), *TG21* (sarcoglicano delta, se encuentra en el citoesqueleto), *TGFB3* (proteína 1 de la envoltura nuclear sináptica, regula los procesos intra y extracelulares) y *TMEM43* (participa en la formación de tafazina que forma parte de la envoltura nuclear) (8).

Se han encontrado también algunos polimorfismos asociados a CMD, por ejemplo Trp4Arg de *CSRP3* y Asn654Lys de *NBLT*, en 0.2% en caucásicos y 1.2% en japoneses con CMD; otro ejemplo es Thr326Ile de *BMP10* el cual fue encontrado en 2 de 46 pacientes japoneses con CMD acompañada de hipertensión. Otros varios polimorfismos se han relacionado a la susceptibilidad de CMD, como algunos alelos HLA, ejemplo HLA-DR4 en caucásicos; la infección por virus de Hepatitis C, etc. (2).

La tecnología genómica de nueva generación ha permitido complementar y superar las estrategias para descubrir nuevos genes (9). Dada la heterogeneidad genética en CMD, la mayoría de las mutaciones ha demostrado una prevalencia variable (<<1% a 27%) (12), lo que hace necesario secuenciar un gran número de genes para hacer efectivas las pruebas genéticas. La dificultad para interpretar los resultados del análisis bioinformático de las mutaciones se debe a la baja prevalencia de cada mutación entre las familias, y a la necesidad de individualizar la patogenicidad de mutaciones previamente no reportadas (6).

Las herramientas de biotecnología avanzada, que incluyen la secuenciación de segunda generación, permiten estudiar un gran número de genes de enfermedades conocidas e identificar nuevos genes y vías causales de la enfermedad, lo cual permitirá abrir el estudio a nuevas investigaciones científicas y tratamientos médicos.

Entre las ventajas de realizar pruebas genéticas están: a) la caracterización clínica de los grupos en riesgo de desarrollar CMD, b) la identificación de portadores sanos de alguna mutación, que se espera desarrollen la enfermedad en el curso de su vida o que no la desarrollen en el caso de que sean portadores de una forma autosómico recesiva; c) el impacto en la reproducción en el caso de que uno de los padres sea portador (8).

Hay varios puntos que necesitan ser aclarados en esta enfermedad, y se requiere de criterios diagnósticos específicos y del estudio de las formas desconocidas (5); además, para entender y mejorar el pronóstico de estos pacientes, es recomendable que sean evaluados por un equipo especializado, que consista en Médicos Genetistas y Cardiólogos, ya que de esta manera se podrá estudiar a los pacientes de manera integral y se podrá obtener información relevante y útil para ellos (13).

Correlación genotipo-fenotipo.

Más allá de la naturaleza hereditaria de esta enfermedad, se ha logrado demostrar que además existe una correlación genotipo-fenotipo (11). Los estudios de series de pacientes pueden proveer datos de la prevalencia de las mutaciones; además, las mutaciones evaluadas en una población pueden ayudar a definir marcadores clínicos en los portadores para enfocar mejor el seguimiento (8).

La CMD de tipo familiar es producto de al menos una mutación en alguno de los más de 40 genes relacionados, 33 de los cuales se han asociado a características extracardiacas. Mutaciones asociadas con CMD afectan funcionalmente diversos componentes de diferentes estructuras subcelulares, como sarcoméros, discos Z, mitocondrias, la interfase citoesqueleto-sarcomero y el núcleo. Correlaciones entre el genotipo y el fenotipo se han identificado para los genes *LMNA* y *RBM20*, ambos asociados con muerte súbita cardiaca.

Cuando se estudiaron mutaciones en *MYH7* y *MYBPC3* en 652 pacientes de Alemania con CMD, las características clínicas como edad de inicio, presión diastólica del ventrículo, adelgazamiento del septum ventricular y fracción de eyección ventricular no difieren significativamente entre los que tuvieron mutaciones positivas y los que no tenían estas mutaciones. No obstante el grado de dilatación es más grave en pacientes con mutaciones con *MYH7* que en pacientes con mutaciones en *MYBPC3*. Hubo más casos familiares entre los portadores de mutaciones en *MYBPC3* y estos pacientes tuvieron también regurgitación de la válvula mitral menos grave que quienes tenían mutaciones en *MYH7* (11).

Las mutaciones en *PLN* se asociaron a cardiomiopatía arritmogénica con compromiso cardiaco izquierdo y/o derecho, además de bajo voltaje en el electrocardiograma.

Las mutaciones en *LMNA*, *DES*, *DMD* y *DMPK* están asociadas con frecuencia a trastornos neuromusculares.

Se ha reportado que no hay diferencias con respecto a la mortalidad entre los pacientes con una mutación y aquellos en quienes no se detectó alguna mutación, no obstante si se combinan variables como muerte, trasplante cardiaco o arritmias ventriculares malignas, entonces se observa significativamente mayor morbimortalidad en quienes tienen la mutación (10).

Plan terapéutico.

Para las cardiomiopatías hereditarias, las opciones terapéuticas son limitadas, y por lo tanto la utilidad clínica de las pruebas genéticas son cruciales para determinar la etiología de la enfermedad en el probando; cuando se identifica una variante patogénica puede estudiarse a la familia, lo que permite excluir de la monitorización regular a los que no la presentan e identificar aquellos que son positivos y necesitan de monitorización clínica o alguna intervención para así prevenir las complicaciones y reducir la morbilidad y mortalidad del padecimiento (4) (10). Identificar las mutaciones específicas puede algunas veces guiar el manejo clínico, a medida que para algunas se puede establecer mejor la evolución. Por ejemplo, las mutaciones en *LMNA* están

asociadas con un alto riesgo de muerte súbita por arritmia, incluso antes de que ocurra la CMD, por lo que se recomienda el implante de un desfibrilador cardiovertidor (10).

Estudios de Cardiomiopatía Dilatada en México.

La literatura con respecto a los estudios de CMD en México, muestran que la gran mayoría se relaciona a la enfermedad de Chagas, y hasta donde hemos revisado no hay un estudio Genético de esta enfermedad en nuestro país y por tanto, el propósito de este trabajo es abordar los casos estudiados en el Instituto Nacional de Cardiología, para llevar a cabo un estudio clínico-genético completo. La importancia de tener un estudio sobre el comportamiento de la CMD en nuestra población, radica en el hecho de que se ha demostrado que un gran número de enfermedades hereditarias tienen diferencias fenotípicas y genotípicas secundarias a factores ambientales y genéticos en cada población; por mencionar un ejemplo, en la Fibrosis Quística se ha observado que las mutaciones en CFTR (gen regulador de la transductancia transmembranal) en Mexicanos tienen frecuencias diferentes que las observadas en otras poblaciones (14).

De la investigación documental destacan tres artículos relacionados con la CMD realizados en México, en el primero se evaluaron los polimorfismos (Ser49Gly y Arg389Gly) del gen del receptor beta 1 adrenérgico en 47 pacientes con cardiomiopatía dilatada y en 93 controles, todos mexicanos; los resultados sugieren que el polimorfismo Arg389Gly podría estar relacionado con la susceptibilidad para desarrollar cardiomiopatía dilatada idiopática (15).

El segundo artículo describe clínicamente una familia con 24 individuos en 3 generaciones afectadas por cardiomiopatía dilatada y alteraciones de la conducción cardiaca. Los autores encontraron que 16 de ellos, de ambos sexos, tenían además de cardiomiopatía dilatada, bloqueo arterioventricular, en un patrón autosómico dominante, esta relación no había sido reportada anteriormente (16).

En el tercer trabajo se evalúa la relación entre los genes (*HLA-DR* y *HLA-DQB*) del complejo de histocompatibilidad mayor tipo II y la susceptibilidad a cardiomiopatía dilatada idiopática en pacientes Mexicanos; los alelos *HLA-DR* y *DQB* fueron analizados en 53 pacientes con CMD idiopática y 99 controles étnicamente emparejados. Los pacientes mostraron un incremento de la frecuencia de *HLA-DR4* y *HLA-DQB1* cuando se compararon con los controles sanos. Por otra parte, los pacientes con CMD idiopática mostraron una disminución de la frecuencia del alelo *HLA-DR11*. Estos datos sugieren que variaciones en los alelos HLA clase II podrían ser un factor involucrado genéticamente con la susceptibilidad de CMD idiopática en la población mestizo mexicana (17).

Secuenciación de nueva generación

La secuenciación semiconductora de liberación de torrente de iones (Ion Torrent) se dió a conocer en el 2010 y ha demostrado comparada con otras técnicas, un bajo costo, calidad, simplicidad y rapidez, además de un alto rendimiento en el campo de la secuenciación, mediante el uso de chips secuenciadores de iones que permiten hacer mediciones de secuencias de DNA de 10 Mb a más de 1 Gb. Su simplicidad le confiere un sesgo mínimo y una alta precisión de 99.6%. Este método se basa en la detección de iones de hidrógeno que se liberan durante la polimerización de DNA, es decir es un método de secuenciación por síntesis.

Consiste en micropocillos que contienen una cadena de DNA que se va a secuenciar y una sola especie de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP). El dNTP al reconocer el nucleótido complementario se incorpora a él provocando la liberación de un ion de hidrógeno que es detectado por el sensor de iones en la base del pocillo, lo que indica que se ha producido una reacción. Esto se repite con cada dNTP.

Planteamiento del Problema.

Los reportes de estudios en series de pacientes con CMD idiopática y monogénica en otros países, muestran su gran variabilidad fenotipo-genotipo, controversias y dificultades para el diagnóstico molecular, sin embargo, en México no hay un estudio que caracterice clínica y genéticamente a una serie de pacientes. Por otra parte, no se ha implementado en ninguna de nuestras instituciones un método de diagnóstico temprano o pre sintomático y la mayoría de los pacientes se diagnóstica hasta que desarrolla síntomas o arritmia.

No se ha desarrollado una plataforma para el diagnóstico molecular de la CMD idiopática y familiar y por lo tanto, se desconoce qué porcentaje de casos idiopáticos son de origen genético en México ni se han descrito las características fenotípicas y genotípicas de la CMD familiar en México.

Preguntas de Investigación.

- ¿Cuál es la frecuencia de casos idiopáticos que son de origen genético?
- ¿Existen diferencias en la frecuencia de las mutaciones en los genes causales de la CMD familiar entre nuestra población y lo que se ha publicado en otras poblaciones?
- ¿Es posible implementar el diagnóstico genómico de la CMD familiar e identificar de manera presintomática los familiares portadores de las mutaciones para ofrecer un tratamiento más oportuno?

Justificación

La CMD tiene una incidencia de 1 en 2740 personas, causa 50,000 hospitalizaciones y 10,000 muertes cada año en los Estados Unidos, siendo la primera indicación de trasplante de corazón; el promedio de vida de los pacientes con CMD una vez siendo sintomáticos, es de 80% a los 5 años. Se ha reportado que el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de pacientes afectados con CMD mejora su pronóstico, y disminuye la morbimortalidad, por lo que este estudio permitirá tener mayor conocimiento de las características genéticas de esta enfermedad en nuestra población y detectar mutaciones causales no descritas, lo cual permitiría plantear en un futuro una estrategia para el diagnóstico molecular temprano de la CMD familiar.

Objetivo General.

Identificar mutaciones en los 31 genes descritos como causales de Cardiomiopatía Dilatada Familiar (CMD) en un grupo de pacientes con CMD idiopática o familiar, y realizar estudios clínicos y genéticos de los familiares de primer grado para identificar portadores y afectados, con el objeto de conocer las características genéticas de la CMD familiar en nuestra población.

Objetivos Específicos.

- Identificar la proporción de casos de CMD idiopática que son de origen genético.
- Describir las formas de herencia de la CMD familiar en los pacientes estudiados.
- Describir el espectro de mutaciones en los genes causales conocidos que presenta el grupo de pacientes estudiados y buscar si la mutación cosegrega con la enfermedad en la familia.
- Buscar correlaciones fenotipo-genotipo en los pacientes diagnosticados con CMD familiar, así como si existe penetrancia reducida y expresión variable.

Objetivo Secundario.

- Proponer una estrategia para el diagnóstico molecular de la CMD familiar en nuestra población.

Metodología.

- a) Diseño del estudio.

El presente estudio fue producto de una investigación observacional, analítica y prospectiva.

- b) Universo.

Para este trabajo de investigación se seleccionaron todos los pacientes (casos índice) que aceptaron participar de ambos sexos y de cualquier edad con diagnóstico de CMD que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Cardiología durante un período de 12 meses, que comprendió de mayo del 2013 a mayo del 2014.

- c) Diseño de la Muestra.

La muestra fue no probabilística, de tipo selectiva y cuantitativa.

Criterios de inclusión.

Pacientes diagnosticados con cardiomiopatía dilatada idiopática o familiar que acepten participar, o que se autorice su participación por parte de los padres, tutores o responsables.

Criterios de exclusión (3).

- Que tenga algún tipo de CMD secundaria a:
 - Alteración crónica de electrolitos (p. ej: hipocalcemia, hipofosfatemia y uremia).
 - Enfermedad de Cushing, alteración de la hormona de crecimiento o feocromocitoma, hipotiroidismo congénito o tirotoxicosis. Así como diabetes mellitus previo a detectarse CMD.
 - Hipertensión arterial descontrolada (>160/100 mmHg) o mayor a un año de diagnóstico. Isquemia cardíaca, miocarditis, enfermedades cardíacas congénitas, taquicardia supraventricular o enfermedad valvular.
 - Enfermedades infecciosas como brucelosis, difteria, psitacosis o fiebre tifoidea, rickettsias o micobacterias. virus coxsackie A y B, citomegalovirus, Epstein-Barr, VIH o varicela complicada.
 - Enfermedades como Chagas o sea positivo a esta prueba, esquistosomiasis o toxoplasmosis .
 - Enfermedades infiltrativas como hemocromatosis, amiloidosis y sarcoidosis.
 - Cor pulmonale.
 - Enfermedades neuromusculares como distrofia muscular de Duchenne, ataxia de Friedreich o distrofia miotónica.
 - Haber consumido los siguientes tóxicos: anfetaminas, agentes retrovirales por más de un año, agentes cromoterapéuticos (antraciclinas, trastuzumab), cloroquina, fenotiazinas o cocaína.
 - Haber estado en contacto con los siguientes tóxicos, por enfermedad o de manera laboral o en la vivienda por más de cinco años: monóxido de carbono, radiación, cobalto, plomo o mercurio.
 - Etilismo crónico (<40g/día en mujeres, >80g/día en hombres, por más de 5 años.
 - Algún grado de desnutrición.
 - Enfermedades reumatológicas, como arteritis de células gigantes, esclerodermia y lupus eritematoso sistémico.
 - CMD durante el periodo periparto.

Criterios de eliminación.

- Que el paciente desee retirarse del proyecto.
- Que no se logren completar sus estudios clínicos y genéticos.

d) Unidades de observación.

De entre todos los individuos de ambos sexos y de cualquier edad, con diagnóstico de CMD, fueron unidades de observación los pacientes con CMD idiopática y familiar así como los familiares de primer grado de los casos índice en los cuales se identificó una mutación.

e) Definición de las variables.

Sano: para fines del proyecto se consideró así a toda aquella persona que no tiene CMD ni otras enfermedades crónico degenerativas.

Cardiomiopatía Dilatada. Se caracteriza por dilatación y alteraciones en la contracción del ventrículo izquierdo o ambos, con disfunción sistólica, con una fracción de eyección menor a 45% y síntomas clínicos de falla cardiaca, lo cual a menudo se asocia con arritmia y muerte súbita.

Cardiomiopatía Dilatada Idiopática. Es una Cardiomiopatía Dilatada cuya etiología se desconoce.

Cardiomiopatía Dilatada Familiar. Se refiere a la Cardiomiopatía Dilatada que se presenta en dos o más familiares afectados de CMD o con antecedente de un familiar de primer grado con muerte súbita de causa desconocida antes de los 35 años.

Formas de Herencia de la Cardiomiopatía Dilatada Familiar. Se refiere a la manera en cómo se transmite la Cardiomiopatía Dilatada de una generación a otra en una misma familia.

Mutaciones Causales de Cardiomiopatía Dilatada Familiar. Se refiere a los cambios patológicos permanentes y heredables en la secuencia del DNA genómico de los genes que están relacionados a la presencia Cardiomiopatía Dilatada.

Correlación fenotipo-genotipo de los pacientes afectados con Cardiomiopatía Dilatada Familiar. Se refiere a las características bioquímicas, fisiológicas y clínicas de los pacientes con CMD que guardan relación con mutaciones específicas y que podrían diferir dependiendo de la mutación.

f) Métodos de recolección de la información.

Para este estudio, se recolectaron los datos de fuentes primarias o directas, por lo tanto se revisaron los expedientes de los pacientes con diagnóstico de CMD idiopática o familiar y se entrevistó al paciente afectado cuando acudió a su consulta regular.

Una vez captado el paciente, mediante el consentimiento informado por escrito, se realizó el llenado de una hoja de recolección de datos que incluyó historia clínica, árbol genealógico y revisión clínica-genética completa; del expediente se obtuvieron los resultados de estudios de gabinete y de laboratorio.

A los familiares de primer grado de los pacientes con CMD idiopática y Familiar que se pudieron contactar y aceptaron participar se les realizó electrocardiograma y cuando fue posible, ecocardiograma para identificar a los familiares afectados pero clínicamente asintomáticos y así establecer nuevos casos de CMD Familiar.

A los casos índice con CMD Idiopática y Familiar se les tomó una muestra de 10 ml de sangre venosa, se extrajo el DNA y se llevó a cabo secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) para la búsqueda de mutaciones y variantes genéticas en 31 genes relacionados con CMD, que se seleccionaron porque en el momento del diseño del estudio eran los mejor caracterizados.

Se invitó a participar a los familiares de primer grado de los pacientes que presentaron alguna mutación o variante genética, y se les tomó una muestra de sangre venosa periférica de 10 ml, para buscar intencionadamente las mutaciones y/o variantes e identificar otros portadores o afectados, mediante secuenciación capilar.

No se excluyó ningún caso, independientemente de si se pudieron estudiar los familiares o no.

En el anexo se muestra la hoja de recolección de datos.

Preparación de bibliotecas Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) y secuenciación.

La búsqueda de mutaciones se llevó a cabo mediante secuenciación de nueva generación, secuenciando simultáneamente los 31 genes seleccionados con la plataforma Ion Torrent. El DNA se aisló de sangre periférica usando el DNeasy Blood Kit (Qiagen, Velencia, CA, USA).

Los 31 genes fueron: *ABCC9, ACTC1, ACTN2, ANKRD1, CRYAB, CSRP3, DES, EYA4, ILK, LAMA4, LDB3, LMNA, MYBPC3, MUYH6, MYH7, MYPN, PDLIM3, PLN, PSEN1, PSEN2, RBM20, SCN5A, SGCD, TCAP, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN* y *VCL*.

Se diseñó un kit de amplificación (Ampliseq) con el conjunto de primers para amplificar los 31 genes en amplicones de un tamaño menor o igual a 200pb. Se amplificaron simultáneamente todos los amplicones en un termociclador Bio-Rad MyCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 0.5 mM primer adelante, 0.5 mM primer reverso y 50 ng de DNA genómico. Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: 95° C por 15 minutos, seguida por una temperatura una temperatura de 94° C por 15 segundos, 60° C por 30 segundos y 72° C por 15 segundos, con una disminución de 0.5° C de la temperatura de cada ciclo durante ocho ciclos. Después de completar el programa, 30 ciclos adicionales se realizaron subsecuentemente (94° C por 15 s, 55° C por 30 s, y 72° C por 15 s), terminado con 10 minutos de extensión a 72° C.

Los amplicones se purificaron usando el Kit de perlas magnéticas, de acuerdo a las instrucciones de manufactura. La concentración del Amplicon se determinó usando el fluorómetro Qubit (reactivos para cuantificar). Los amplicones purificados se mezclaron en concentraciones equimolares.

Se construyeron bibliotecas (con el kit Ion Fragment Library (Life Technologies)) siguiendo las instrucciones en la Unidad de secuenciación para secuenciar mediante el equipo Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) de Life Technologies.

Brevemente, 50 ng de amplicones y adaptadores Ion Torrent P1 y A se ligaron usando DNA ligasa. Siguiendo la purificación perla AMPure (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), los productos adaptador-ligando se tradujeron y amplificaron en un total de 10 ciclos. La biblioteca resultante se purificó usando perla AMPure (Beckman Coulter) y la concentración y medida se determinó usando un Agilent BioAnalyzer DNA High-Sensitivity LabChip (Agilent Technologies). Una muestra de emulsión PCR, rompimiento de emulsión, y enriquecimiento se realizó usando el Ion Xpress Template Kit, de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Brevemente, una concentración

inicial de una copia de plantilla de DNA / Ion Sphere Particles (ISPs) se sumó a la mezcla de emulsión principal de PCR y la emulsión generada se usó en IKA DT-20 (Life Technologies). Siguiendo, ISPs se recuperó y enriqueció para usarse en perla Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (Life Technologies). El ISP enriquecido se confirmó usando el fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies), y la muestra se preparó por secuenciación usando el Ion Sequencing Kit. La muestra completa se cargó en un chip Ion 314 y secuenció en el PGM por 65 ciclos.

Control de calidad: se controló el tamaño y la concentración de las bibliotecas en un chip de Agilent.

a) Plan de presentación de la información.

Con los datos obtenidos no fue posible aplicar una prueba estadística, se utilizaron tablas y árboles genealógicos para presentar los resultados.

b) Plan de descripción y análisis de la información.

El proceso bioinformático que se llevó a cabo para la obtención de los resultados, fue un sistema que se organizó cuidadosamente integrando diversos programas y descartando otros que no mostraron su utilidad. Se analizó individuo por individuo, en un proceso que se sometió a diferentes pruebas y se fue variando el orden en el que se utilizaron los diferentes programas bioinformáticos y bases de datos hasta establecer un diagrama de flujo que permitiera obtener la mayor información, sin que se perdieran detalles. A continuación se describe el proceso de análisis.

Al concluir la secuenciación, el aparato Ion Torrent, ofrece los datos de las corridas en formatos Variant Call Format (VCF), BAM, BAM.BAI y TBI, además de diversos documentos que permiten valorar la calidad de la secuenciación, como se muestra en los siguientes esquema, que ofrecen visualmente la seguridad de que el análisis posterior será confiable.

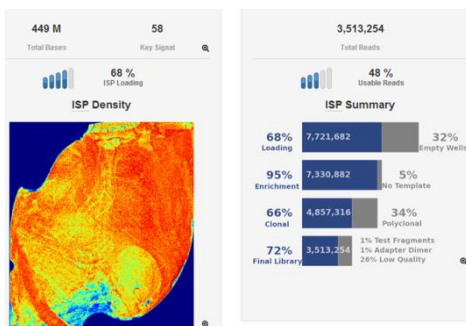


Fig. 1 Izquierda: Ocupación del Chip sometido a Ion Torrent, es mayor del 60%. Derecha: Total de lecturas leídas, que son superiores al 60%, lo cual indica una buena calidad de la secuenciación.

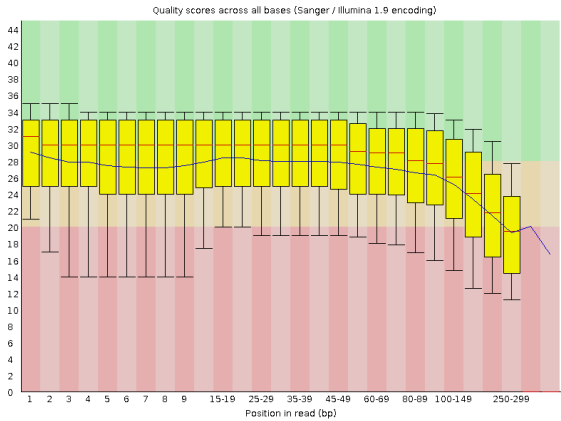


Fig. 2. En esta figura se grafican los puntajes de

calidad que se obtuvieron de todas las bases que se secuenciaron, cuya media debe estar en el área verde para ser útil; al final siempre se espera que por el decaimiento de la enzima haya una pérdida de calidad, lo cual no afecta si la mayoría de las lecturas están dentro de los parámetros esperados.

Verificada la calidad se analizó el formato VCF, que almacena las variaciones en las secuencias de los genes que se estudiaron en cada una de las muestras; cada uno de estos archivos se leyó por programas como Ion Reporter, Golden Helix, Variant Effect Predictor (VEP) y finalmente por SureCall, aunque este último presentó problemas y se descartó. El VEP se utilizó finalmente como único programa para el proceso de optimización de señal, llamado de bases, alineamiento de secuencia y análisis de variantes.

This mutation is predicted to be possibly damaging with a score of 0.883 (sensitivity: 0.82, specificity: 0.94)

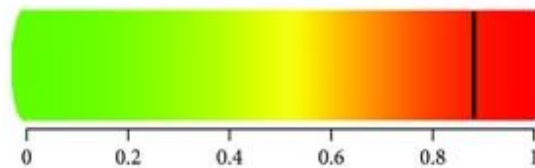


Fig. 3. Muestra el resultado del Programa Polyphen que indica que una variante es probablemente patológica.

El VEP permitió revisar todas las variantes de cada paciente a través de los programas: Consecuencia, Clin_Sig (semejante a ClinVar), Sift y Polyphen; y si al menos uno de estos reportaba que una variante era probablemente patológica o patológica, el siguiente paso fue dirigirse a la página de NCBI. En NCBI se buscó información de la variante, principalmente en las bases de dbSNP, ClinVar, PubMed, OMIM y proyecto de 1000 genomas y sólo consideramos para la siguiente etapa las variantes que se encontraban en regiones codificantes y/o que se conocen como patológicas o que se predicen como probables patológicas, aun siendo no codificantes. Las

variantes seleccionadas, con el uso de los formatos VCF, BAM y BAM.BAI se verificaron en su calidad mediante el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) y Tablet, pero principalmente IGV.

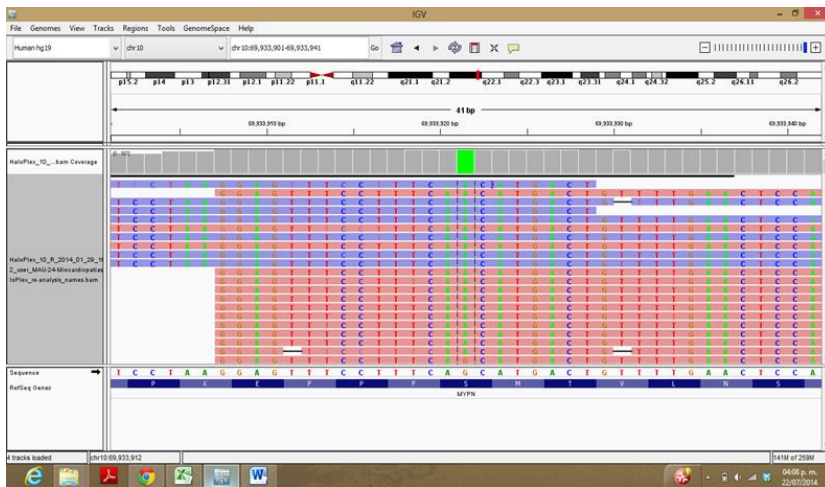


Fig. 4. Representación de los

resultados arrojados por el IGV para una variante con buena calidad. Los criterios para determinar si es de buena o mala calidad fueron los siguientes: profundidad, ubicación del cambio de la base (preferentemente no debe ser la última base leída), que se encuentre el cambio en las dos direcciones (hacia adelante y reversa), calidad de mapeo mayor de 90, calidad phred mayor de 20 y conteo total de bases.



Fig. 5. Representación de los

resultados arrojados por el IGV para una variante con mala calidad. Aquí se observa una baja profundidad, aunque la calidad de mapeo y de phred son óptimos, la posición señalada está muy desplazada al final de la lectura, es decir no cumple con los criterios mínimos necesarios y no debe aceptarse para posteriores estudios.

Las variantes que tuvieron mala calidad en diferentes rubros ya no se consideraron para estudios posteriores, exceptuando que se tratara de una mutación ya descrita. Las mutaciones ya reportadas y las variantes cuya predicción funcional las colocaba como patológicas y

probablemente patológicas se corroboraron mediante secuenciación capilar y se corrieron en el programa BLAST para verificar si la secuencia era correcta o la isoforma de la proteína tenía predilección por algún tejido, en particular cardíaco.

Los análisis de la secuenciación capilar se llevaron a cabo de manera visual con electroferogramas, esto nos permitió validar los datos de las variantes o mutaciones.

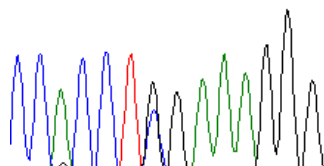
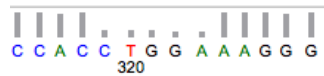


Fig. 6. Electroferograma de un segmento del gen *TMPO*, que muestra la doble señal correspondiente a la posición 320, donde hay una T en lugar de una C.

Cuando se identificó una variante diferente no descrita, se buscó si cosegregaba con la enfermedad en la familia, en los casos en que fue posible.

En el siguiente esquema de resume la secuencia del análisis bioinformático utilizado en este trabajo.

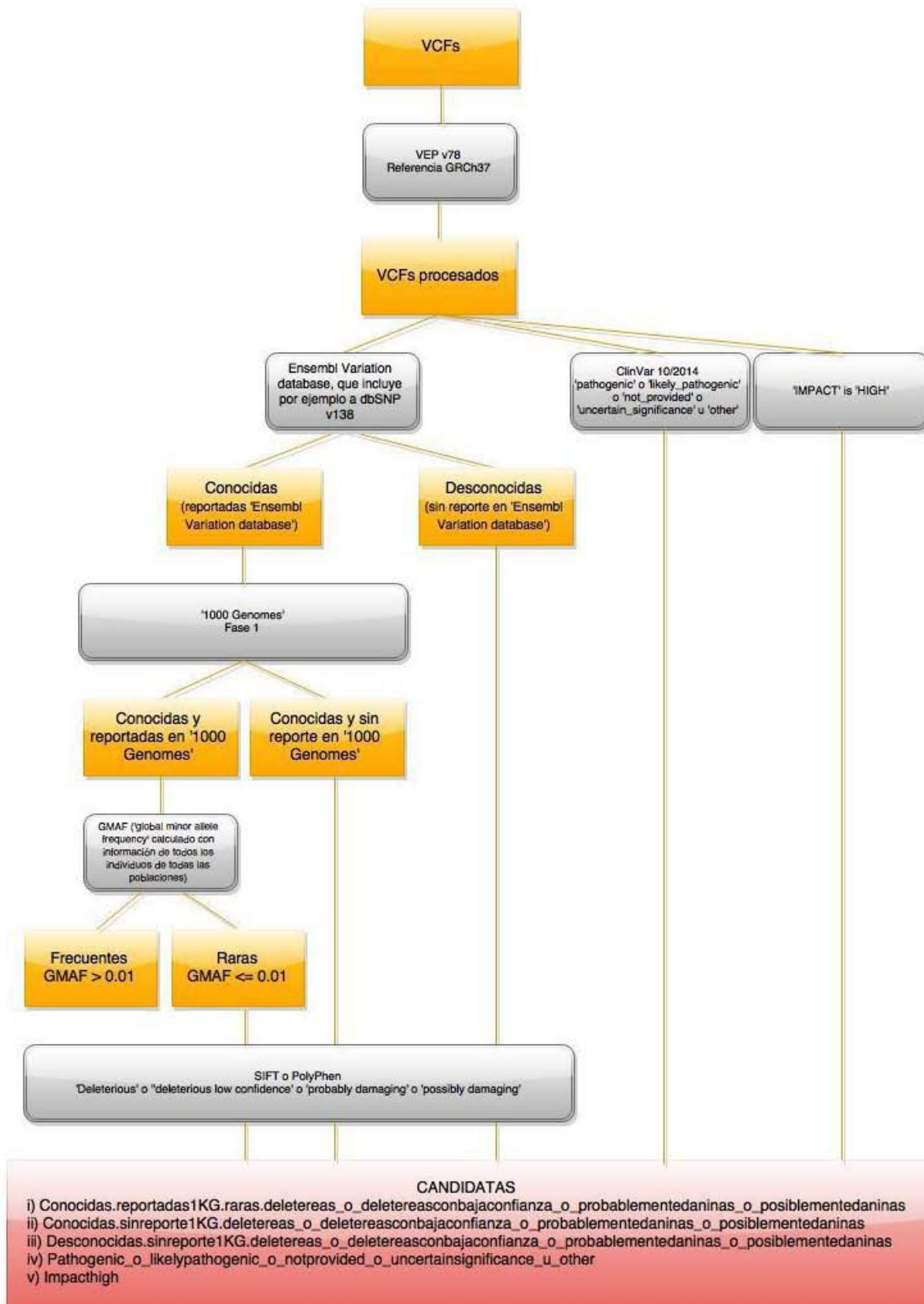


Fig. 7. Análisis bioinformático.

c) Aspectos éticos.

Se tomaron en cuenta las recomendaciones del Comité de Ética y del de Bioseguridad para todas las actividades y se obtuvo la firma del consentimiento informado en todos los casos.

En el anexo se encuentra el ejemplo del consentimiento informado.

RESULTADOS

El presente trabajo, como se presenta en la parte metodológica, tuvo diferentes etapas, durante la parte clínica, que comprendió de marzo del 2013 a marzo del 2014, se revisaron en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, un total de 600 expedientes clínicos de pacientes que tenían el diagnóstico de algún tipo de cardiomiopatía, de los cuales se atendieron 400 y sólo 51 cumplieron con los criterios de selección para Cardiomiopatía Dilatada Familiar o Idiopática.

Secuenciamos mediante Ion Torrent las muestras de 28 individuos, de los cuales 22 eran casos índice y seis eran familiares de los mismos. Presentamos los resultados de estos casos.

Los casos índice presentaron las siguientes características:

Por interrogatorio directo se realizó a cada paciente un árbol genealógico, con lo que se pudo observar de manera esquemática y sumando los resultados de su estudio molecular, que 9 casos eran esporádicos o idiopáticos, es decir que no tenían antecedentes familiares de muerte súbita o de CMD, y se habían descartado otras causas de CMD, los otros 12 se clasificaron como casos familiares o hereditarios, de los cuales sólo dos, presentaron un patrón de herencia autosómico recesivo y 11 autosómico dominante.

En cuanto al género, ocho fueron mujeres y 14 fueron varones, de las mujeres tres tuvieron diagnóstico de CMD esporádico y cinco diagnóstico de CMD familiar o hereditario; de los varones, siete fueron esporádicos y siete hereditarios.

Como se describe en la literatura médica, la forma de inicio es variable y en ocasiones confusa, lo que ocasionó que en ocho pacientes el diagnóstico inicial fuera otro: enfermedad isquémica cardíaca en dos, insuficiencia cardíaca congestiva en tres, enfermedad respiratoria superior en dos, uno como gastroenteritis probablemente infecciosa y uno como enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los síntomas y signos característicos de CMD al inicio de la enfermedad fueron muy constantes y las dificultades diagnósticas se debieron principalmente a las combinaciones atípicas de los síntomas. En la tabla tres se encuentra la relación de los síntomas más frecuentes.

Tabla 3. Relación de los principales síntomas al inicio del cuadro clínico de CMD y el número de pacientes que los presentaron.

Síntomas.	Número de pacientes con CMD que los presentaron.
Disnea	21
Dolor Torácico	5
Síncope	3
Ortopnea	11
Disnea paroxística nocturna	10
Edema de extremidades inferiores	13
Palpitaciones	8
Astenia y Adinamia	10

Como se puede observar la gran mayoría de los pacientes inició la sintomatología con disnea de esfuerzos que frecuentemente se acompañó de edema de extremidades inferiores, ortopnea, disnea paroxística nocturna y astenia y adinamia. En la tabla cuatro se muestran los datos clínicos más relevantes de los 22 casos índice.

Tabla 4. Relación de datos clínicos con cada caso de CMD.

Paciente	Sexo	Edad I/A	DV	DS	%FE	Arr	NYHA	Familiar Idiopático	Datos Adicionales	GI
1	M	73/77	AV	Si	20	Si	I	F	DCI	
2	F	64/74	VI	Si	45	Si	I	I	DCI	
3	F	37/53	AV	Si	27		I	I		TNNT2
4	M	35/39	AV	Si	20		II	I		
5	F	53/60	VI	Si	16		I	I		TTN
6	M	17/21	AV	Si	27		I	I		
7	F	13/20	AV	Si	35		I	F	Muerte	MYBPC3
8	M	50/58	AV	Si	18		I	I		MYBPC3
9	M	20/23	AV	Si	40		I	I		RBM20 TTN, ACTN2
10	M	29/32	AV	Si	20	Si	IV	F	DCI, Muerte	TMPO LMNA
11	M	50/59	AV	Si	33	Si	I	F	DCI, Muerte Súbita	SCN5A
12	M	51/59	AV	Si	20	Si	I	I	DCI	
13	F	33/63	VI	Si	15		I	F		
14	M	15/21	AV	Si	32		I	F	Trasplante Corazón	TMPO
15	M	21/26	AV	Si	25		I	I		TTN
16	F	31/40	AV	Si	27		I	F		TMPO, MYPN
17	M	59/63	VI	Si	47		I	F		
18	M	31/48	AV	Si	26	Si	I	F	DCI	
19	M	31/33	AV	Si	22	Si	I	F	DCI	CSRP3 TNNT2
20	M	31/33	AV	Si	25		I	F		

21	F	12/58	VI	Si	40	Si	I	F	DCI
22	F	52/62	AV	Si	20		I	F	TMPO

Sexo: M=Masculino, F= Femenino, Edad: I = de inicio, A = actual, DV= Dilatación ventricular, VI= Ventrículo Izquierdo, AV= Ambos Ventriculos, DS = Disfunción Sistólica, %FE = Fracción de eyección, Arr = Arritmia, NYHA = Clasificación Funcional NYHA; I, F = Idiopático, Familiar, DCI= Desfibrilador Cardiovertidor Implantable, GI = Gen Involucrado.

De los datos que se muestran en la tabla, resalta la edad de inicio que es variable entre 12 años y 73, sin embargo el promedio fue de 39.5 años para los casos idiopáticos y 35.3 para los casos familiares, y solo 3/22 iniciaron la sintomatología después de los 55 años. De los 22 pacientes 17 (77%) presentó dilatación de ambos ventrículos y todos tuvieron disfunción sistólica. A pesar del tratamiento y de que la clasificación NYHA señaló que 20 de los 22 pacientes tenían clasificación I, la fracción de eyección (%FE) se encontró igual o mayor a 40% únicamente en cuatro pacientes. También se observa que una tercera parte de los casos presentaba arritmias y habían sido tratados con desfibrilador cardiovertidor implantable (DCI). Durante el estudio tres pacientes fallecieron, dos por insuficiencia cardiaca terminal y uno por muerte súbita.

En las siguientes figuras se presentan los árboles genealógicos de cada uno de los 22 casos índice que fueron estudiados.



Fig. 8. Simbología utilizada en los árboles genealógicos.

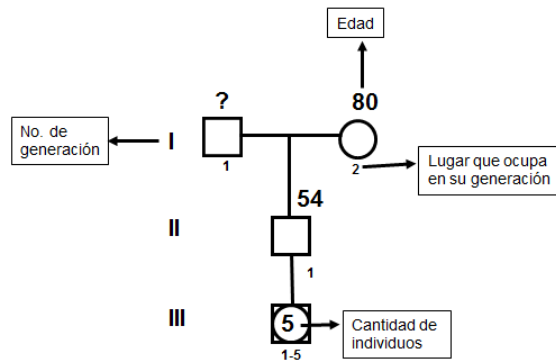
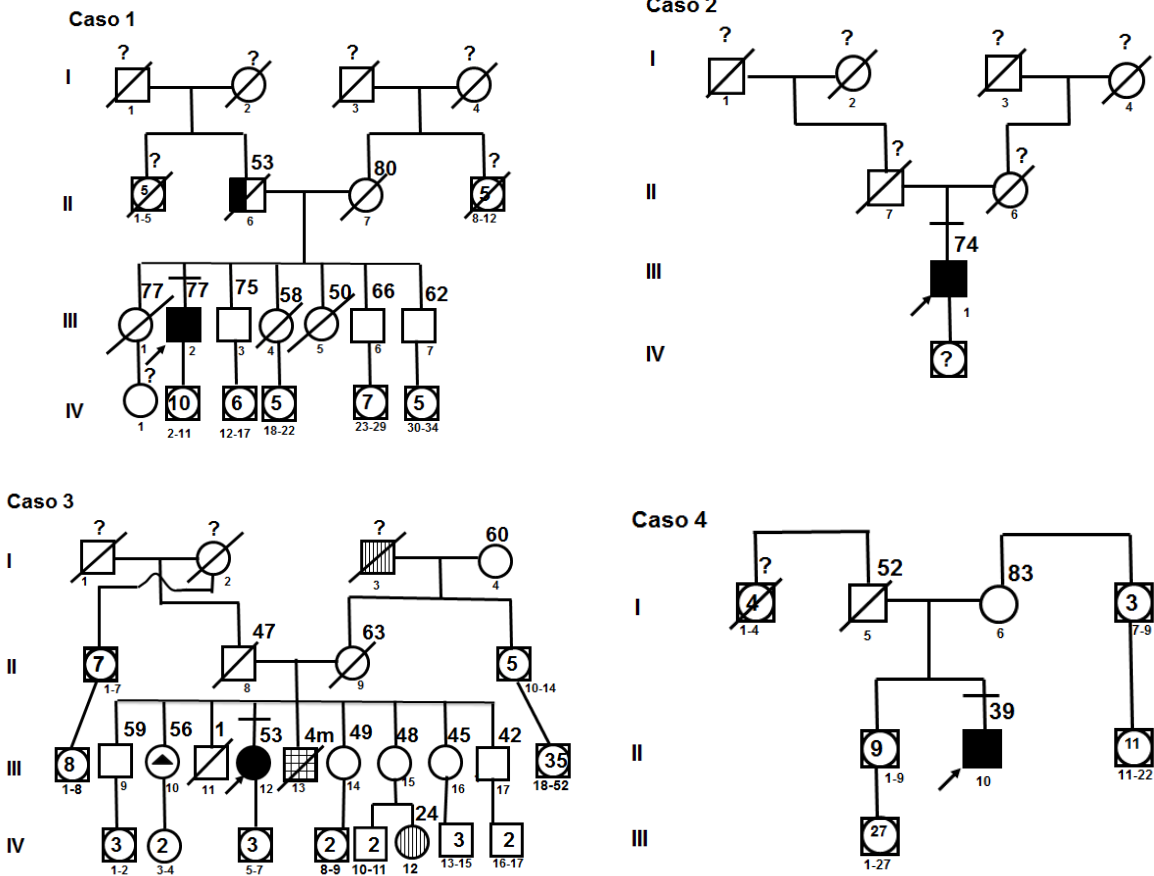
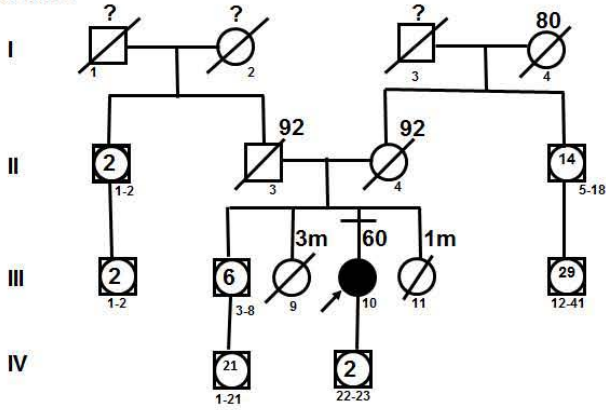


Fig. 9. Ejemplo de cómo entender la estructura de un árbol genealógico.

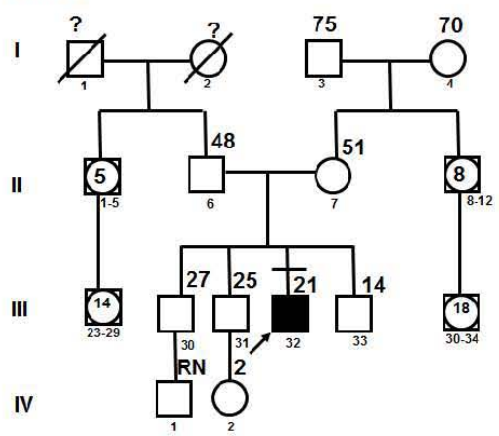
Árboles Genealógicos de los casos con CMD Familiar e idiopática.



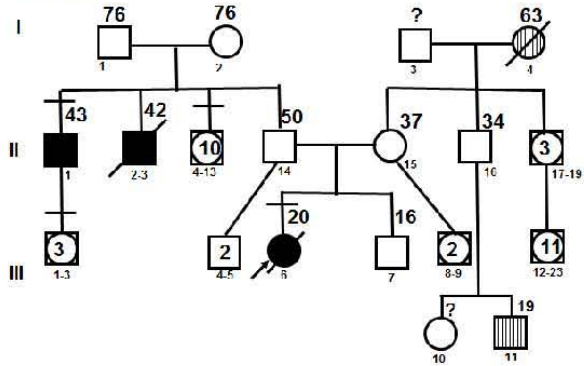
Caso 5



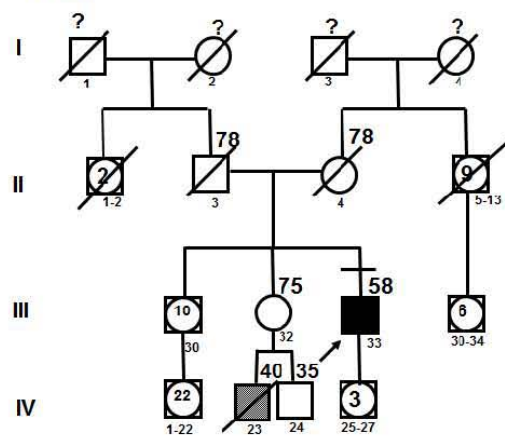
Caso 6



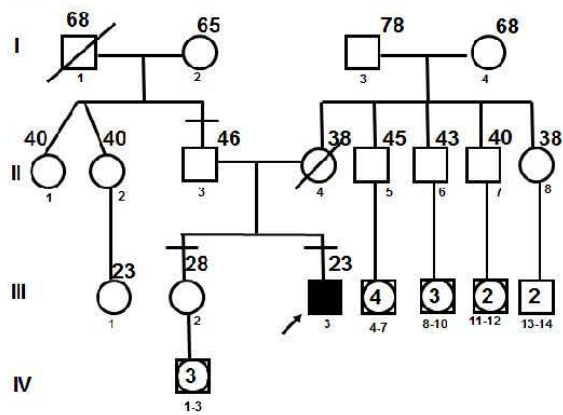
Caso 7



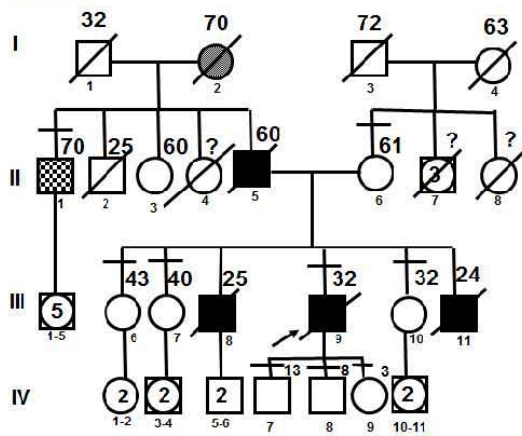
Caso 8



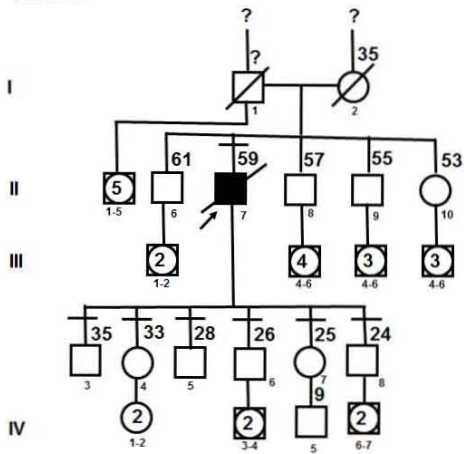
Caso 9



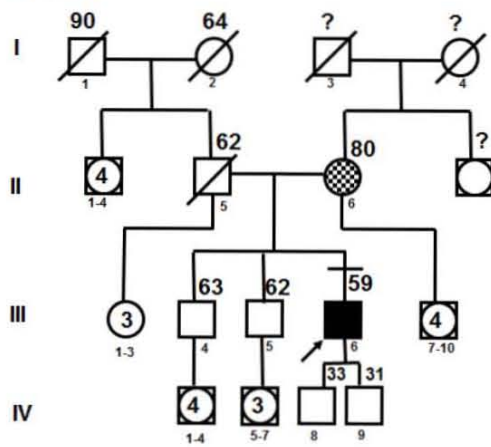
Caso 10



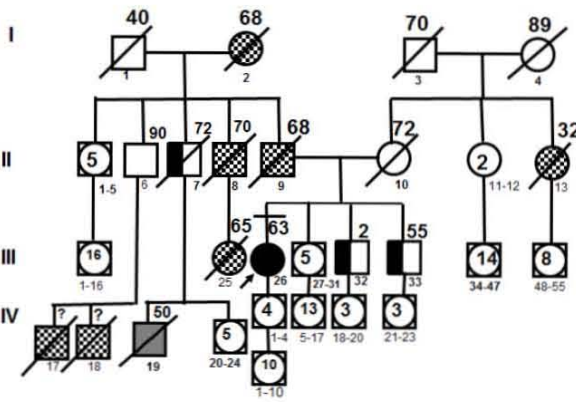
Caso 11



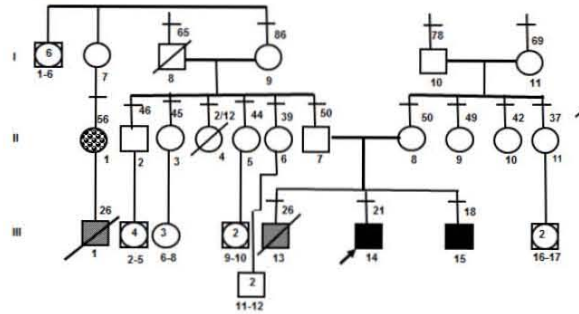
Caso 12



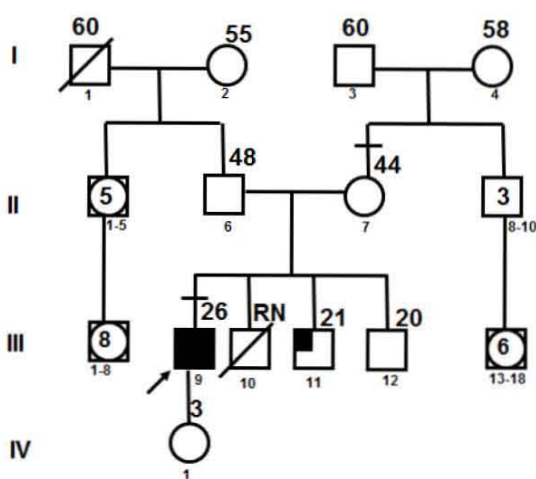
Caso 13



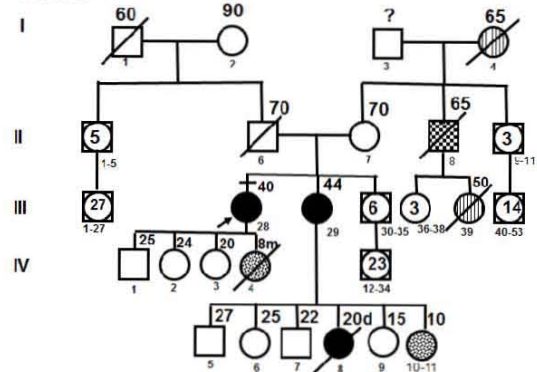
Caso 14



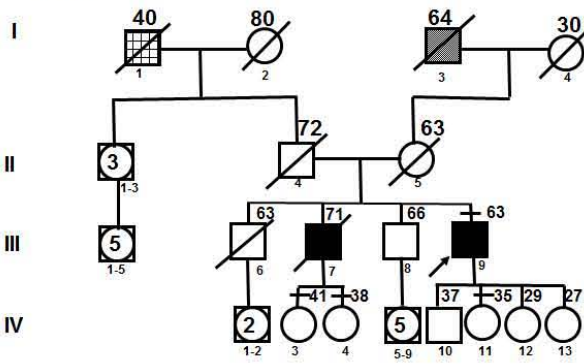
Caso 15



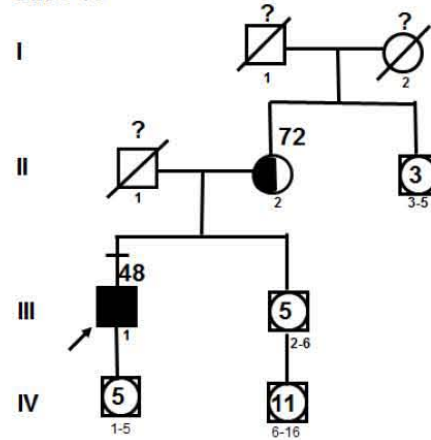
Caso 16



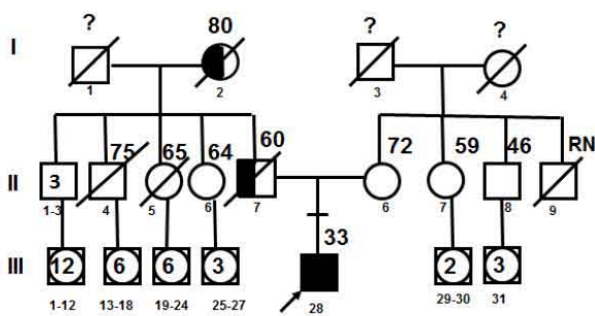
Caso 17



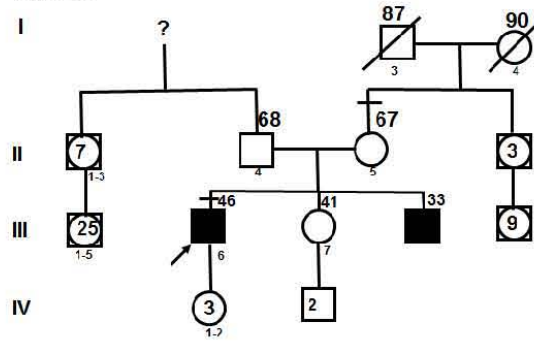
Caso 18



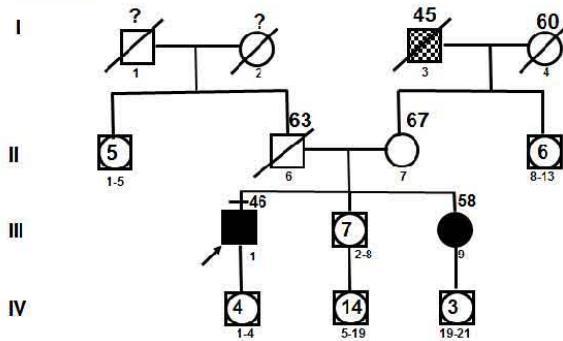
Caso 19



Caso 20



Caso 21



Caso 22

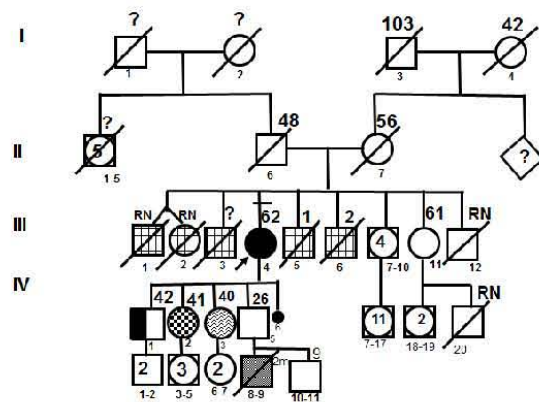


Fig. 9. Árboles Genealógicos de los 22 casos con CMD Familiar e idiopática.

De los 22 pacientes antes citados y cuyos árboles genealógicos se representan arriba, en 12 (54%) se pudo validar mediante secuenciación de Sanger, al menos una mutación conocida o una variante probablemente causal de CMD, la tabla cinco resume esos resultados. De los 12 casos comentados, en 10 (83%) se encontró una mutación con reporte en las bases de datos como causal de CMD, en dos (17%) únicamente variantes con predicción funcional de ser patológicas. De los casos donde se encontró una mutación reportada, en tres estaban además asociadas a una variante con predicción funcional de ser patológicas y en un caso se encontraron dos mutaciones reportadas. De los once casos que tuvieron al menos una mutación reportada, en nueve se había relacionado a CMD y en una a síndrome de Brugada. La misma mutación en *TMPO* se repite en cuatro casos, también la misma mutación del gen *MYBPC3* se repite en dos casos, dos mutaciones diferentes en *TNNT2* se encuentran dos casos y tres variantes diferentes en *TTN* se encuentran en tres casos.

Tabla 5. Mutaciones conocidas y variantes probablemente causales de CMD en 12 pacientes.

Caso Familiar Idiopático	Gen	Posición Genómica Intron o exón	Mutación Reportada y fenotipo asociado a	dbSNP	Cambio de Aminoácido	Frecuencia en 1000 Genomas M/PT	PolyPhen	Sift	ClinSig	Cons
3 F	TNNT2	Exón c.650_652delAGA	Indel CMD	rs45578238	p.Lys217Ile	SD	----	----	Pat	----
6 I	TTN	Exón c.4328T>C	NR	rs142317580	L1443P	3%/0.3%	Pat	Pb Pat	---	----
7 F	MYBPC3	Exón c.2992C>G	Mut Puntual CMD	rs11570112	Gln998Ter	4%/0.06%	Pat	Pb Pat	Pat	----
8 F	MYBPC3	Exón c.2992C>G	Mut Puntual CMD	rs11570112	Gln998Ter	4%/0.06%	Pat	Pb Pat	Pat	----
9 I	RMB20	Exón	Mut Puntual CMD	Rs267607003	PRO638LEU	-----	Pb Pat	Pat	Pat	----
	TTN	Exón c.45053C>T	NR	rs72677221	p.Ala12450Val	0.78%/0.18%	Pb Pat	----	---	----
	ACTN2	Exón c.2205G>A	NR	NR	R662Q	SD	Pb Pat	Benig	---	----
10 F	TMPO	Intrón 2306C>T	Mut Puntual CMD	rs17028450	R690C	10%/1%	Benig	Pat	Pat	----
	LMNA	Exón 1541C/A	NR	NR	Ser431* Stop	SD	----	----	---	Codón de paro
11 I	SCN5A	Exón 5848G>T	Mut Puntual Brugada	rs41315493	V1950L	3%/0.84%	Benig	Benig	Pat	----
14 F	TMPO	Intrón 2306C>T	Point mut CMD	rs17028450	R690C	10%/1%	Benig	Pat	Pat	----
15 F	TTN	Intrón c.4328T>C	NR	rs142317580	L1443P	3%/0.3%	Pat	Pb Pat	---	----
16 F	TMPO	Intrón 2306C>T	Mut Puntual CMD	rs17028450	R690C	10%/1%	Benig	Pat	Pat	----
	MYPN	Exón 3591A>G	NR	rs201975081	M1035V	0.7%/0.02%	Benig	Pat	---	----

19 F	CSRP3	Exón 10T>C	Mut Puntual CMD	rs45550635	W4R	0%/0.18%	Pb Pat	Pat	Pat	----
	TNNT2	Exón 451C>T	Mut Puntual CMD	rs74315379	Arg151Trp	0%/0.06%	Pb Pat	Pat	Pat	----
22 F	TMPO	Intrón 2306C>T	Mut Puntual CMD	rs17028450	R690C	10%/1%	Benigna	Pat	Pat	----

F= Familiar, I = Idiopático, Pat = Patológica, Probable patológica = Pb Pat, Benig = Benigno, CMD = Cardiomiopatía Dilatada, NR = Variante No Reportada previamente, Mut = Mutación, M/PT = México-Americanos/Promedio de todas las poblaciones, SD = Sin datos en 1000 Genomas, Cons = Consecuencia

En la tabla anterior observamos en la primera columna el número que corresponde al caso índice, en la columna tres se describe la patología asociada a la variante, es decir si se sabe que causa CMD, Brugada o se trata de una variante no reportada previamente; en la columna siete se comparan las variantes con lo reportado en el proyecto de los 1000 genomas, la primera cifra corresponde a la frecuencia en los mexico-americanos y la segunda a la frecuencia promedio de todas las poblaciones; este dato no se encuentra cuando la variante es nueva. Finalmente en las últimas cuatro columnas colocamos el reporte de Sift, Polyphen, ClinSig y Consecuencia (se refiere al efecto que produce el cambio en una secuencia dada), para destacar el motivo que nos llevó a identificarlas y estudiarlas con mayor detalle.

Destacan por su complejidad los resultados de algunos casos que describiremos más a detalle con los siguientes árboles genealógicos.

Árboles Genealógicos de cuatro casos con CMD Familiar, relacionados con las mutaciones y variantes que se encontraron.

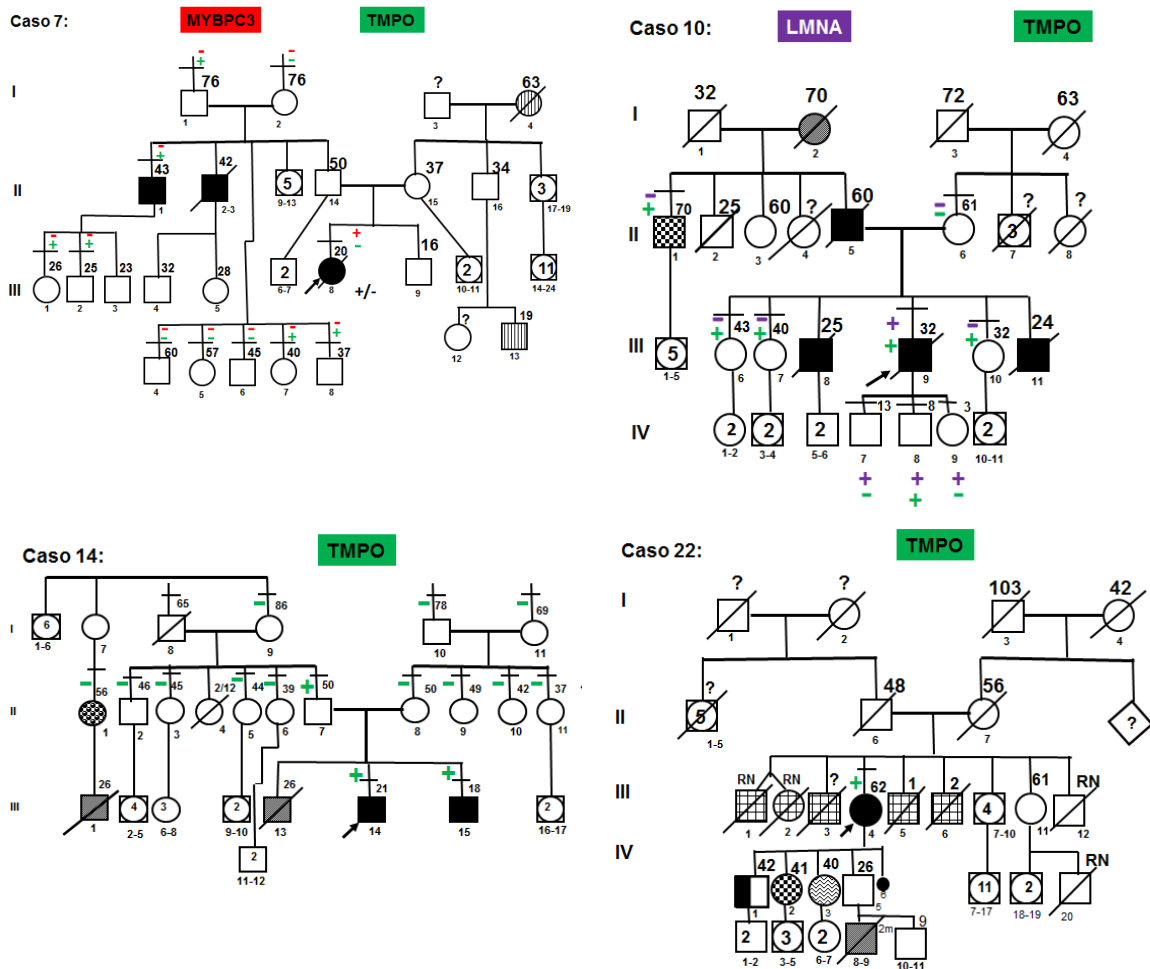


Fig. 10. Árboles Genealógicos de cuatro casos con CMD Familiar, y las mutaciones y variantes que se encontraron.

En la figura 10, caso 7 observamos el árbol genealógico con las mutaciones encontradas en esta familia, el caso índice es una joven que portaba una mutación en *MYBPC3*, que es una mutación puntual previamente reportada por ser causal de CMD, su tío paterno no comparte esta, pero si es portador de una variante en *TMPO*, que en un artículo fue reportada como causal de CMD. La probando no es portadora de la variante en *TMPO*; participaron otros cinco tíos y dos primos paternos aparentemente sanos y entre estos, cuatro fueron portadores de la variante en *TMPO* y ninguno en *MYBPC3*.

En la figura 10 también observamos el árbol genealógico del caso 10, donde el caso índice es un masculino de 32 años, cuya evolución fue muy grave y falleció, fue portador de una mutación puntual en el gen *LMNA*, que no se reportó en los programas de predicción funcional pero en “Consecuencia de la secuencia”, esta mutación confiere un codón de paro y por tanto una proteína de lámina truncada con 431 aminoácidos (normalmente va de 607-656) dependiendo de la isoforma; también porta la variante en *TMPO*. Sus tres hijos son portadores de la misma mutación de *LMNA* y sólo uno de la *TMPO*. Ni una de sus hermanas ni su tío tienen la mutación en *LMNA* y todos portan la variante en *TMPO*; cabe mencionar que sus hermanas y tío clínicamente y por estudios adicionales no tienen CMD y sus hijos menores de 15 años por el momento tampoco presentan datos de CMD. Dos hermanos del caso índice fallecieron a los 24 y 25 años y el padre a los 60, todos con diagnóstico de CMD.

En la figura 10, el árbol genealógico del caso 14 corresponde a una familia autosómico dominante, donde sólo se encontró la misma variante en *TMPO* en dos hermanos afectados y el padre de ellos, clínicamente sano; la prima hermana del padre del caso índice, que tiene arritmia y a su vez tuvo un hijo con muerte súbita, es negativa para esta variante.

El caso 22, cuyo árbol genealógico podemos ver en la figura 10 la caso índice con CMD porta la variante comentada en *TMPO*, y tiene el antecedente de múltiples muertes súbitas a edades tempranas en su familia, además de un hijo con probable CMD.

DISCUSIÓN.

En este estudio se establecieron criterios de selección estrictos para permitir que sólo se estudiaran los casos realmente idiopáticos o familiares y cabe mencionar que algunas familias no pudieron estudiarse por diferentes motivos.

Los resultados permitieron identificar al menos una mutación conocida o variante probablemente patológica en 12 de los 22 casos, que constituyen el 54% de la muestra, lo cual es un porcentaje aceptable si consideramos que en otros estudios incluso con más pacientes se ha reportado una frecuencia de detección que va del 11 al 20% (10), esto quizá por nuestra selección cuidadosa y por el número de genes que secuenciamos. En nueve casos se encontró al menos una variante que ha sido relacionada a CMD, y en un caso una que se ha encontrado en el Síndrome de Brugada.

De los nueve casos mencionados, en cuatro de ellos se encontró una variante en *TMPO*, en dos de estos como única variante. La variante en *TMPO* ha sido reportada en un artículo como probablemente causal en dos hermanos afectados, y los estudios funcionales en ratón mostraron que afectaba la función de la proteína en un 75%. Esta proteína, también denominada LAP2, es una proteína que se asocia a lámina e interactúa con ella (18). Por otra parte, la variante se describe en 1000 genomas con una frecuencia de 11% en mexicanos, de 14% en peruanos y de 1% en la población total. En nuestro trabajo se encontró en cuatro casos índice afectados y en 11 familiares no afectados. Es probable, por lo tanto, que la presencia de esta variante en el gen *TMPO* no explique el cuadro clínico por sí sola y que se trate de una variante modificadora, como particularmente observamos en el caso 10, donde la encontramos asociada a una mutación en *LMNA* (lámina), y podría relacionarse a la grave evolución y muerte temprana de los tres hermanos afectados por CMD (19).

Otra familia donde se encontró la variante en *TMPO* es la del caso 14, donde hay tres hermanos afectados, uno fallecido a los 21 años y el caso índice que ameritó trasplante cardiaco a los 21 años. Consideramos que en esta familia debe haber otra mutación que explique la presentación del padecimiento, por lo cual se someterán a otros estudios genómicos, como microarreglos para realizar análisis de ligamiento y secuenciación masiva en otra plataforma.

Otra variante que podría ser más modificadora que causal es el *CSRP3*, al menos se ha reportado como tal en la bibliografía, está la observamos en el caso 19, donde el paciente tiene además otra mutación reportada en *TNNT2*, el paciente tiene una fracción de eyección de 22 y sintomáticamente evoluciona estable, no precisamente más grave como podría esperarse (20).

El caso 10 es parte de una familia con CMD Familiar, parecía resolverse al encontrar que la probando era portadora de una mutación reportada causal de CMD en *MYBPC3*, no obstante un tío con el mismo padecimiento que ella no es portador de esta mutación, pero si tiene la mutación comentada en *TMPO* que la probando no tiene, por lo cual no podemos considerar resuelto el caso y habrá que realizar otros estudios.

El caso 11 podría ser un ejemplo de la expresividad variable que manifiestan las mutaciones relacionadas a enfermedades cardiovasculares, ya que la mutación que tiene el paciente se ha visto sólo en el Síndrome de Brugada, y el problema relacionado a un trastorno de conducción en este paciente fue la muerte súbita; se han reportado casos donde una misma mutación puede causar diferentes fenotipos que pueden ir desde una cardiomiopatía arritmogénica, cardiomiopatía hipertrófica y hasta CMD en una misma familia (8). Otro ejemplo semejante es el caso 22, donde clínicamente se trata de una familia con una canalopatía, pero la caso índice tiene sólo CMD, y hasta este momento únicamente encontramos que es portadora de *TMPO*, faltan hacer otros estudios en estas familias.

Estas familias ilustran lo complejo que es el diagnóstico molecular de la CMD de causa genética, es evidente en nuestros resultados la heterogeneidad genética que es característica de esta enfermedad y habrá que ampliar el estudio y utilizar otras plataformas y abordajes antes de establecer una plataforma de diagnóstico molecular para CMD en nuestra población.

Este es que es el primer estudio genómico de CMD idiopática o familiar que se lleva a cabo en nuestro país, es un proyecto que continua avanzando con más casos y los resultados aún no marcan una tendencia de mutaciones más frecuentes ya que la muestra es aún pequeña.

A los familiares de los casos índice afectados, que ahora se saben portadores, se le ha dado asesoramiento genético y se han ingresado al Instituto Nacional de Cardiología para su seguimiento, con lo cual se espera incidir positivamente en su morbimortalidad, y mejorar su calidad de vida, así como reducir los costos de su atención médica y de sus posibles complicaciones.

Bibliografía:

1. Hariharan Raju, Corinna Alberg and col. Inherited cardiomyopathies. 2011. *BJM*; 343.
2. Akinori Kimura, MD, PhD. Contribution of Genetic Factors of the Pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy. 2011. *Official Journal of the Japanese Circulation Society*; 75: 1756-1765.
3. Siva B. Mohan, Miriam Parker and col. Idiopathic dilated cardiomyopathy: A common but mystifying cause of heart failure. 2002. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, Vol. 69.
4. Polakit t., Melissa A., and col. Inherited Cardiomyopathies Molecular Genetics and Clinical Genetic testing in the Postgenomic Era. 2013. *The Journal of Molecular Diagnostic*. Vol. 15, No. 2: 158-170.
5. Luisa M., Chiara R. and col. Familial Dilated Cardiomyopathy: Evidence for Genetic and Phenotypic Heterogeneity. 1999. *Journal of the American College of Cardiology*.
6. Daniel Jacoby and William J. McKenna. Genetics of inherited cardiomyopathy. (2012). *European Heart Journal* 33, 296-304.
7. Hershberger R., Morales A. and col. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: A review for genetics professionals. 2010. *Genetics In Medicine*. Vol. 12, No. 11.
8. Serio A., Narula N. and col. Familial Dilated Cardiomyopathy. 2012. *Herz*. 37: 822-829.
9. L., Katharine M. Sharpe and col. Homozygosity Mapping and Exome Sequencing Reveal *GATAD1* Mutation in Autosomal Recessive Dilated Cardiomyopathy. 2011. *Jeanne American Heart Association*.
10. Karin Y., Ingrid A., Maarten P. and col. Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: overview of 10 years' experience. 2013. *European Journal of Heart Failure*. 15, 628-636.
11. Waldmüller S., Erdmann J. and col. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure. 2011. *European Journal of Heart Failure* 13, 1185-1192.
12. Hershberger R., Siegfried J. and col. Clinical and Genetic Issues in Familial Dilated Cardiomyopathy. 2011. *National Institutes of Health*.
13. María G. Colombo, Nicoletta B. and col. Clinical Utility of genetic test for inherited hypertrophic and dilated cardiomyopathies. 2008. *Cardiovascular Ultrasound*, 6:12.
14. Orozco L., Carnevale A. and col. Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G-A). 2000. *Human Genetic* 106:360-365.
15. José Manuel Fragoso, José Manuel Rodríguez-Pérez and col. β 1-adrenergic receptor gene polymorphisms in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. 2006 Jun. *Exp Mol Pathol*. 80(3):279-82.
16. Elsa Silva Oropeza y Carmen Navarrete Cadena. New phenotype of familial dilated cardiomyopathy and conduction disorders. 2003. *American Heart Journal*.

17. Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM and col. MHC class II genes in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. 2007. *Exp Mol Pathol*. Feb;82(1):49-52.
18. Matthew-Taylor R.G., Dobromir-Slavov, and col. Thymopoietin (Lamina-Associated Polypeptide 2) Gene Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy. 2005. *Human Mutation* 26 (6), 566-574.
19. Roberta-Roncarati, Chiara-Viviani and col. Doubly heterozygous LMNA and TTN mutations revealed by exome sequencing in a severe form of dilated cardiomyopathy. 2013. *European Journal of Human Genetics* 21, 1105–1111.
20. Christian-Geier, Katja-Gehmlich and col. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. 2008. *Human Molecular Genetics*, 2008, Vol. 17, No. 18.

ANEXOS.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto:

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LA CARDIOMIOPATIA DILATADA FAMILIAR EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS DIAGNÓSTICADOS CON CARDIOMIOPATÍA DILATADA IDIOPÁTICA O FAMILIAR.

Invitación a participar y descripción del proyecto

Estimado Sr. (a), se le hace una cordial invitación a participar en el proyecto con el título mencionado.

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este formato, pregunte y hable de este proyecto a familiares, amigos y también si prefiere a su médico de confianza.

Objetivos del estudio

El propósito es identificar las mutaciones en los genes descritos como causales de Cardiomiopatía Dilatada Familiar mediante secuenciación de segunda generación, en pacientes mexicanos diagnosticados con Cardiomiopatía Dilatada familiar o idiopática en el Instituto Nacional de Cardiología y buscar correlaciones fenotipo-genotipo.

Descripción de la investigación

Colecta de muestras y de información médica

- Se le tomará una muestra de sangre de 10 ml. (equivalente a dos cucharadas) de una vena de su brazo.
- También se colectará información de su expediente clínico que incluirá su edad, diagnóstico, historial de enfermedades, tratamientos médicos y respuesta a tratamientos.

¿Cómo se manejarán mis muestras y registros médicos?

- Los tejidos, muestras de sangre y registros médicos serán marcados con un código (codificados) para su seguimiento y con el fin de mantener la confidencialidad.
- Solamente la Dra. Alessandra Carnevale investigadora del Instituto Nacional de Medicina Genómica y el Dr. Gilberto Vargas Alarcón investigador del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, responsables del proyecto tendrán la información que permita asociar este código con su nombre y sus datos personales.
- Todos los datos iniciales serán depositados en una base de datos segura, donde nadie que no esté autorizado podrá tener acceso a su información.
- Solamente un reducido grupo de investigadores y médicos autorizados, que se han comprometido a proteger los datos de los participantes en el estudio, tendrán acceso a la base de datos.

¿A dónde irán mis muestras e información?

- Las muestras codificadas, es decir, no identificadas por nombre, serán procesadas en el Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez para extraer su material genético (DNA). Una vez procesadas las muestras, estas serán separadas en dos partes, una de ellas será guardada en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y otra en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, los cuales cuentan con el equipo y el personal capacitado para mantener el resguardo de sus muestras y de su información personal.
- Sólo en caso de ser requerido, enviaríamos una fracción limitada de su material genético (ADN) a algún país que cuente con la tecnología para realizar algunos análisis, para los que no contamos en México con la tecnología necesaria. Este material siempre tendrá seguimiento por uno o más de los investigadores mexicanos asociados al estudio.
- Haremos todos los esfuerzos posibles para mantener sus datos confidenciales. Solo un grupo pequeño de investigadores tendrán acceso a los datos. Estos investigadores firmarán una carta de confidencialidad que los obliga a mantener sus datos resguardados y a no divulgar su información personal.

¿En dónde se depositarán los resultados de los análisis del estudio?

- Los resultados del estudio serán analizados por los investigadores participantes y se publicarán en artículos científicos para que otros investigadores y médicos tengan acceso a la información que les será útil en el diagnóstico y tratamiento de otros pacientes con esta enfermedad. En ningún caso se podrá identificar a ninguno de los o las pacientes del estudio.
- Los datos particulares como nombre o dirección, **no** estarán disponibles.
- Los datos codificados de su expediente clínico estarán disponibles solamente a otros investigadores interesados que hayan recibido aprobación por parte de los responsables del estudio y nunca con fines comerciales.

¿Seré contactado(a) de nuevo en el futuro?

- Si se requiere obtener información adicional acerca de su estado de salud, una persona del Instituto Nacional de Medicina Genómica o del Instituto Nacional de Cardiología, lo contactará para realizarle un cuestionario acerca de su estado de salud.

¿Tiene algún costo participar en el estudio? ¿Se me pagará por participar?

- No tiene ningún costo su participación en el estudio.
- No recibirá ningún pago, ni incentivos por la participación en el estudio.
- Las muestras de tejido y su información serán utilizadas únicamente para fines de investigación y en ningún momento serán utilizadas con fines comerciales.
- Se le darán los resultados de las pruebas de laboratorio y exámenes de gabinete que se le lleguen a realizar dentro del proyecto.
- El uso de su muestra puede dar como resultado invenciones y descubrimientos que pueden convertirse en la base de nuevos procedimientos de diagnóstico o de agentes terapéuticos. En algunos casos, estas invenciones y descubrimientos pueden tener un valor comercial y pueden ser patentados para desarrollar nuevos productos médicos que estarían disponibles comercialmente. Sin embargo, no existe ningún plan para que los donadores de muestras se beneficien de estas ganancias.

¿Cuáles son los beneficios que obtengo por participar en el estudio?

- El beneficio más importante por su participación en el estudio es que se pueda identificar si su enfermedad, la Cardiomiopatía Dilatada, se debe a una causa genética que se pueda diagnosticar con técnicas moleculares. En ese caso, se podrá estudiar a sus familiares cercanos aunque no tengan síntomas de la enfermedad y saber si tienen la misma alteración, para poder darles seguimiento con el fin de que reciban la atención más oportuna y se eviten las complicaciones. Además, su participación aportará nuevos

conocimientos sobre esta enfermedad y ayudará a otros pacientes afectados por la misma en México.

- Usted recibirá un reporte personal acerca de la alteración genética que se encuentre en su muestra cuando, a través de esta investigación tengamos resultados validados y certeros.

¿Cuáles son los riesgos posibles a los que me enfrento por participar en el estudio?

- La toma de muestra de sangre tiene riesgos mínimos asociados a cualquier recolección de sangre, tales como una ligera molestia en el sitio donde ésta se obtiene, comezón, sangrado leve, hematoma (moretón), mareo; y en raras ocasiones una infección. Por esta razón, la toma de muestra se hará con equipo totalmente nuevo y esterilizado y será realizado por personas capacitadas para ello.

¿Dónde se almacenará mi muestra?

- Su muestra de sangre y ADN serán resguardadas en los biorepositorios del Instituto Nacional de Medicina Genómica y del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
- La muestra podrá ser utilizada para futuros estudios de cualquier enfermedad importante, incluyendo estudios genéticos y podrán ser compartidas con otros laboratorios de investigación que estudien la cardiomiopatía dilatada u otra enfermedad relacionada con la misma. Las muestras serán guardadas indefinidamente.
- Toda la información identificable acerca de sus datos personales será eliminada del espécimen, ya que su muestra y datos serán identificados por un código. Se mantendrá confidencialidad sobre la información de su historial clínico.

¿Puedo retirar mis muestras del estudio?

- Una vez que sus muestras e información haya sido codificada y analizada, o depositada en las bases de datos, no será posible retirar sus muestras y datos del estudio. Por razones de bioseguridad su muestra no le puede ser devuelta bajo ninguna circunstancia.
- Usted es libre de decidir si desea participar o no en este estudio de investigación. Si decide no participar esto no afectará su relación con los médicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez ni con el Instituto Nacional de Medicina Genómica. Si decide participar, puede cambiar de opinión y retirarse del estudio en el momento que lo decida. En este caso, por disposición legal, además de sus muestras de sangre, el ADN y todos los datos clínicos ligados a la muestra recabada para este estudio serán destruidos.

¿Dónde puedo acudir si requiero mayor información acerca del estudio?

Fue necesario utilizar lenguaje técnico en este formato de consentimiento informado. Por favor, solicite que le expliquen cualquier cosa que no entienda y contestaremos todas sus preguntas.

Si tiene preguntas en el futuro acerca de este proyecto o si tiene problemas relacionados con el estudio, puede contactar a los investigadores a cargo:

Dra. Alessandra Carnevale Cantoni al teléfono 53 50 19 10, o al correo electrónico acarnevale@inmegen.gob.mx.

Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

Dr. Gilberto Vargas Alarcón al teléfono 55 73 29 11 Ext: 1347, o al correo electrónico gvargas63@yahoo.com.

Subdirección de Investigación Básica y Tecnológica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Dr. Rigoberto Rosendo Gutiérrez, tel. 044 55 91861340, o al correo electrónico rirogu10@hotmail.com

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Su participación es absolutamente voluntaria. La decisión de participar o no en este estudio mediante la donación de su 10 ml de sangre venosa periférica e información médica depende solamente de usted.

Sin importar si usted decide o no participar, su decisión no afectará de ninguna forma el tratamiento médico que usted está recibiendo.

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

Registro: _____ Comentarios: _____

Diagnóstico _____ Fecha: _____

Consentimiento para participar en el estudio:

Para contar con su participación en el estudio titulado **CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LA CARDIOMIOPATIA DILATADA FAMILIAR EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS DIAGNÓSTICADOS CON CARDIOMIOPATÍA DILATADA IDIOPÁTICA O FAMILIAR**, debe usted estar de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria una muestra de sangre de 10 ml, señalados en esta Carta, para este y otros estudios de investigación sobre Cardiomiopatía Dilatada Familiar.

- Estoy de acuerdo en que se colecte información de mi expediente médico para ser utilizado en este y otros estudios de investigación sobre Cardiomiopatía Dilatada Familiar.
- Entiendo que la información médica y genética será codificada y así podrá ser usada para este y para otros estudios de investigación.
- Entiendo que, aunque muy poco probable, existe un pequeño riesgo que mi información genética pueda ser decodificada y usada para identificarme.

- Estoy de acuerdo en que se me contacte en el futuro, si el estudio requiere coleccionar informacion adicional acerca de mi estado de salud o solicitar su aprobacion para el uso de mis muestras en estudios adicionales no relacionados con la investigacion sobre Cardiomiopatia Dilatada Familiar.
- Esta Carta de Consentimiento se esta firmando por triplicado, una se quedara en el Instituto Nacional de Cardiologia Ignacio Chavez, otra se quedara en el Instituto de Medicina Genomica y una sera para mi.

Por favor firme, escriba su nombre y la fecha si esta usted de acuerdo con lo anterior.

Nombre del participante y firma del participante	Fecha
--	-------

Nombre, firma y direccion del testigo 1 (relacion con el paciente)	Fecha
--	-------

Nombre, firma y direccion del testigo 2 (relacion con el paciente)	Fecha
--	-------

Nombre y firma del Investigador	Fecha
---------------------------------	-------

Carta de asentimiento informado del menor (o incapaz), para aprobar la obtención de muestras biológicas
México, Distrito Federal, a _____

Yo, _____, con número de registro _____ y _____ de edad, manifiesto que:

Se me ha explicado y he leído el documento sobre Consentimiento Informado, que también leyeron mis papás (tutores o representante legal). Se me explicó el propósito del estudio y el beneficio que podría tener, también se me explicaron las posibles dificultades (riesgos) que podrían presentarse.

He recibido la explicación de mi médico tratante y/o investigador del proyecto, así como apoyo de mis padres y/o tutores, y en todo momento se me ha preguntado mi opinión y se ha respetado mi decisión.

Entiendo que la información médica que proporcione y la toma de muestras de sangre es voluntaria y que puedo negarme en cualquier momento y, aun empezado el estudio me puedo retirar del proyecto. Fui informado de las medidas que se tomarán para proteger mi salud y la confidencialidad de mi información.

Por lo tanto, otorgo mi asentimiento para participar en el proyecto de investigación en los términos referidos en el Consentimiento Informado.

Nombre

Fecha

(Firma del menor de edad, y huella dactilar impresa)

Nombre y firma del padre o tutor

Nombre y firma de la madre o tutora

Nombre y firma investigador

HOJAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Fecha	
-------	--

<i>Nombre</i>				<i>Registro o número de paciente</i>	
<i>Género</i>		<i>Edad</i>		<i>Ocupación</i>	
<i>Estado Civil</i>		<i>Cama</i>		<i>Escolaridad</i>	
<i>Dirección</i>				<i>Fecha de nacimiento</i>	
<i>Religión</i>				<i>Lugar de nacimiento</i>	
<i>Origen étnico</i>				<i>Teléfono</i>	
<i>e-mail</i>				<i>Teléfono celular.</i>	

Tipo de Interrogatorio:

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

ARBOL GENEALÓGICO.

ANTECEDENTES PERSONALES

Marca con una cruz los cuadros en los que el paciente conteste afirmativamente si padece o si está expuesto a alguno de los siguientes puntos, al final especifica lo que se pide en las líneas si es requerido:

Antecedentes de isquemia:

- Enfermedad coronaria ____ , infarto del miocardio ____ , otros: _____

Exposición a tóxicos:

- Alcohol ____ , Exposición a metales ____ , Humo de leña ____ , Medicamentos ____ , Drogas ____ , tabaquismo ____
- Especificar tiempo de exposición y cantidad: _____

- Atender con especial énfasis los siguientes: cobalto, plomo, cadmio, mercurio, agentes cromoterapéuticos, antraciclinas (p. ej: doxirubicina y daunorrubicina), trastuzumab, cocaína, simpaticomiméticos.
- Trastornos Metabólicos:
- Alimentación: Deficiente ____ , Balanceada ____ , Hiperproteica ____ , Hipercalórica ____ , Hipocalórica ____ .
- Especificar con especial énfasis en deficiencia de alimentos ricos en tiamina, selenio y carnitina:

Trastornos endocrinos:

- Hipotiroidismo ____ , Acromegalias ____ , Tirotoxicosis ____ , Enfermedad de Cushing ____ , Feocromocitoma ____ .
- Especificar tiempo de evolución, tratamiento y estado actual;

Enfermedades infecciosas:

- Infecciones de larga evolución ____ .
- Especificar, con especial énfasis en infecciones por enterovirus, influenza, VIH, rickettsia, micobacterias, hongos, toxoplasmosis, triquinosis y enfermedad de Chagas.

Enfermedades inflamatorias:

- Hipersensibilidad a la miocarditis ____ , Enfermedades infiltrativas ____ , Sarcoidosis ____ , Amiloidosis ____ .
- Especificar: _____

Describir:

- Vivienda: Hacinamiento: Si ____ No ____ , Bien ventilada: Si ____ No ____ , Zoonosis: Si ____ No ____
Especificar si se requiere: _____

- Combe: Si ____ No ____ . En caso de ser afirmativa, especifique: _____
- Esquema de vacunación: con énfasis a enterovirus e influenza: _____
- Enfermedades de transmisión sexual: _____
- Enfermedades crónico-degenerativas: _____

Estado mental, trastorno psiquiátrico: _____

Otras enfermedades: _____

ANTECEDENTES GINECOLÓGICOS Y OBSTÉTRICOS

Describir:

- Menarca: edad _____
- Ritmo: _____
- Fecha de la última menstruación: _____
- Gestas: __ , partos: __ , abortos: __ , cesáreas: __ ,
- Menopausia: edad _____ , Síndrome climatérico: Sí _____ No _____
- Método de planificación familiar utilizado: _____

RESUMEN DEL CASO Y PADECIMIENTO ACTUAL

Edad de inicio: _____, diagnóstico inicial: _____

Síntomas Iniciales:

Evolución: curso asintomático y estable: _____, curso inestable y sintomático: _____, Tórpida: _____, Grave: _____.

Estado actual:

Clasificación NYHA: _____ Otros datos _____

INTERROGATORIO POR APARATOS Y SISTEMAS

SÍNTOMAS GENERALES

1. Indicar X, en caso de presentar alguno de los siguientes, o no en caso de no presentarlos:
 Asintomático __, disnea de esfuerzo __, fatiga __, Angina __, Presincope __ y cuantas veces __, síncope __ y cuantas veces __,
 Palpitaciones __, disnea paroxística nocturna __, vértigo __, mareo __, Dolor torácico __, ortostasis __

Otros síntomas:

Anorexia, fiebre, escalofríos, malestar general, sudores nocturnos, pérdida de peso o ganancia de peso, polidipsia, poliuria, intolerancia al frío o calor, aumento del diámetro craneal, crecimiento de extremidades, mal hidratación de la piel, hiperhidrosis, hiper o hipoactividad, debilidad, dolor óseo, dolor muscular, deformaciones osteoarticulares, artralgias, tos, esputo, epistaxis, hemoptisis, cianosis, alteraciones de la libido, preferencia sexual, número de parejas sexuales (con o sin protección).

Especificar:

EXPLORACIÓN FÍSICA

Talla:	Peso: kg	FC: x min	FR: x min
Temp:	IMC:	TA:	

DATOS RELEVANTES DE LA EXPLORACIÓN FÍSICA

Datos de importancia en la primera exploración física:

Datos de importancia en las exploraciones subsiguientes y en la última exploración:

Otros datos de importancia:

EXAMENES DE LABORATORIO

Describir si hay alteraciones en los siguientes estudios:

BH:

QS:

PFH:

Electrolitos séricos:

EGO:

PFT:

Pruebas serológicas virales (*Virus Coxsackie A y B o echovirus*).

Otras pruebas de laboratorio complementarias:

GABINETE:

Marcar con una X si presenta alguna de los siguientes datos o especificar en las líneas de abajo sin presenta algo diferente a lo descrito:

ECG:

Poner énfasis en datos de normalidad, defectos de la conducción, arritmias atriales, hipertrofia ventricular, taquicardia supraventricular (p. ej: fibrilación atrial).

--

RX de tórax:

- Cardiomegalia
- Congestion vascular
- Otros: _____

Ecocardiograma:

- Enfermedad cardiac valvular
- Fracción de eyección menor de 40% del ventrículo izquierdo
- Otros: _____

Pruebas de tolerancia al ejercicio:

- Enfermedad arterial coronaria
- Capacidad funcional
- Otros: _____

Angiografía coronaria:

- Enfermedad cardiaca isquémica
- Normal
- Otros: _____

Biopsia endomiocárdica:

- Enfermedad infiltrativa del miocardio (hemocromatosis, amiloidosis) , especificar: _____

- Miocarditis de células gigantes
- Otros: _____

Biopsia de músculo esquelético:

- Distrofia Muscular de Duchenne
- Otros: _____

Pruebas de Genética: _____

Otros: _____

DIAGNOSTICO FINAL

Diagnóstico final descrito en el expediente: _____
Conclusión diagnóstica del investigador: _____