



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Campo del conocimiento: Investigación Clínica experimental en salud

Campo disciplinario: Bioquímica clínica en el área de genómica aplicada a la salud

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE MUTACIONES
EN EL GEN *MYH7* ASOCIADAS A CARDIOMIOPATÍA
HIPERTRÓFICA EN PACIENTES MEXICANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRIA EN INVESTIGACION CLINICA EXPERIMENTAL EN SALUD.

CAMPO BIOQUIMICA CLINICA EN ELÁREA DE GENÓMICA APLICADA A LA SALUD

PRESENTA:

VALERIA GUZMÁN OLVERA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Sandra Rosas Madrigal

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad universitaria, Cd. De Mex. Octubre 2018



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.

Agradecimientos

En primer lugar, a Dios y a nuestro señor Jesucristo por darme la vida y las bendiciones necesarias para lograr mis metas.

Al INMEGEN por abrirme las puertas, permitirme realizar mi investigación y ser la sede de mis estudios de posgrado.

A mis tutores, Alessandra Carnevale Cantoní, Arturo Rojo Domínguez y Sandra Rosas Madrígala por su paciencia, disposición y sobre todo por compartirme sus conocimientos para llevar a cabo la presente investigación.

A mis padres y hermano, que han estado conmigo a lo largo de toda mi vida aconsejándome y dándome motivos para seguir superándome.

A mis amigos, Lorena Campos, Elina Silva, Ana Galán y Diana Mendiola que estuvieron conmigo a lo largo de mis estudios escuchándome, apoyándome y levantándome cuando más lo necesitaba.

Dedicatorias

La presente tesis se la dedico a mi familia, que gracias a sus consejos y palabras de aliento crecí como persona. A mis padres y hermano porque gracias a su apoyo, confianza y amor pude lograr mis objetivos como persona y estudiante.

Específicamente a mi padre, Mario A. Guzmán, por darme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome. Es mi motivación y espero algún día poder ser la gran persona exitosa que es ahora; A mi madre, Elsa Olvera, porque siempre está ahí para mí, escuchándome y aconsejándome, gracias a sus enseñanzas ha hecho de mí una mejor persona; finalmente a mi hermano, Luis Alberto, por estar siempre presente, cuidarme y brindándome aliento para seguir adelante.

ÍNDICE

MARCO TEÓRICO	6
1.0 EL CORAZÓN	6
1.1 GENERALIDADES	6
1.2 CÁMARAS CARDIACAS	6
1.3 CAPAS DEL CORAZÓN	7
1.4 CARDIOMIOCITOS.....	7
1.5 SARCÓMERO	8
1.5 PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA CONTRACCIÓN	9
1.5.1 α -ACTINA, COMPLEJO DE TROPONINA Y TROPOMIOSINA EN LA CONTRACCIÓN	9
1.5.2 β -MIOSINA	10
2.0 CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN CARDIACA	12
2.1 MECÁNICA DEL CICLO CARDIACO	12
2.2 MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN CARDIACA.....	13
2.3 MECANISMO DE LA RELAJACIÓN CARDIACA.....	14
3.0 CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA	16
3.1 DEFINICIÓN	16
3.2 DIAGNÓSTICO	16
3.2.1 CUADRO CLÍNICO.....	16
3.2.2 ESTUDIOS DE GABINETE.....	17
3.2.2.1 ECOCARDIOGRAMA	17
3.2.2.2 ELECTROCARDIOGRAMA.....	18
3.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	18
3.4 ETIOLOGÍA	18
3.4.1 GENES REPORTADOS COMO CAUSALES	19
3.5 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS	19
3.5.1 MUTACIONES EN <i>MYH7</i>	20
3.6 FISIOPATOLOGÍA.....	21
4.0 MODELADO POR HOMOLOGÍA	23
ANTECEDENTES DIRECTOS	24
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
ANÁLISIS GENÉTICO	26
EXTRACCIÓN DE ADN.....	26
CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD GENÓMICA.....	27
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	28
SECUENCIACIÓN SANGER	29

DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD O BENIGNIDAD DE VARIANTES.....	29
MODELO <i>IN SILICO</i>	33
MODELADO POR HOMOLOGÍA.....	33
BÚSQUEDA DE ESTRUCTURA PROTÉINICA CON MAYOR SIMILITUD	33
ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	34
MODELADO DE MUTANTES.....	36
ANÁLISIS DE MODELOS.....	37
CAMBIOS EN LAS INTERACCIONES.....	37
CAMBIOS EN ENERGÍA.....	37
RESULTADOS	39
ANÁLISIS GENÉTICO	39
TIPO DE HERENCIA.....	39
ANÁLISIS DE COSEGREGACIÓN	40
PATOGENICIDAD/BENIGNIDAD DE VARIANTES	46
MODELO <i>IN SILICO</i>	48
MODELOS SILVESTRES Y VARIANTES.....	48
ANÁLISIS DE MODELOS.....	50
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIÓN	57
BIBLIOGRAFÍA.....	59
MATERIAL SUPLEMENTARIO	68

MARCO TEÓRICO

1.0 EL CORAZÓN

1.1 GENERALIDADES

El corazón es el órgano principal del sistema circulatorio. Su función es recibir sangre baja en oxígeno (por medio de la circulación pulmonar) para posteriormente bombearla hacia los pulmones donde se oxigena y es distribuida hacia todo el cuerpo. Se localiza en el lado izquierdo del tórax, entre los pulmones y el esternón (Katz, 2011). Tiene una forma cónica y mide 12 cm de largo, 9 de ancho y 6 de espesor. En adultos, presenta un peso de 280-340 gramos en hombres y 230-280 gramos en mujeres adultas (Lewis, 2016).

1.2 CÁMARAS CARDIACAS

En su interior, el corazón se compone de 4 cámaras: dos superiores llamadas aurículas derecha e izquierda y dos inferiores denominadas ventrículos derecho e izquierdo (Figura 1). La aurícula derecha se separa de la izquierda por un tabique denominado septum o tabique interauricular (Opie, 2004). El ventrículo derecho e izquierdo son también separados por un septum llamado tabique interventricular que presenta un grosor de 12 mm (Arrese, 2001). Entre la aurícula y ventrículo derecho, existe una válvula llamada tricúspide que controla el flujo de sangre entre ambas cámaras y del lado izquierdo del corazón, entre la aurícula y ventrículo izquierdo se encuentra la válvula mitral (Opie, 2004).

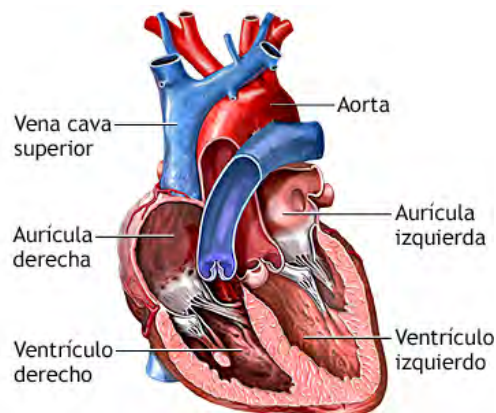


Figura 1. Imagen representativa de las cámaras del corazón, así como las venas principales de transporte de sangre (Zieve, 2018).

El flujo de sangre inicia su recorrido en la desembocadura de las venas cavas (superior e inferior) que transportan sangre carboxilada hacia la aurícula derecha, pasa al ventrículo derecho por medio de la válvula tricúspide y el flujo continua, a través de la válvula pulmonar, hacia el pulmón por las arterias pulmonares para oxigenarse; regresa al corazón a la aurícula izquierda y mediante la válvula mitral pasa al ventrículo izquierdo y finalmente, atraviesa la válvula aórtica hacia la aorta, quien la distribuye hacia todo el cuerpo (Opie, 2004).

1.3 CAPAS DEL CORAZÓN

El corazón se encuentra formado por tres capas: pericardio, endocardio y miocardio (Figura 2). El pericardio es una capa de doble pared que cubre al corazón por toda su superficie externa. La pared exterior del pericardio se denomina pericardio fibroso y tiene la función de mantener al corazón entre el diafragma y el esternón. La capa interna se denomina pericardio seroso el cual se subdivide en una capa parietal, que rodea el pericardio fibroso; y una capa visceral o epicardio que produce un líquido lubricante para evitar fricciones en cada bombeo del corazón. El endocardio es una capa de endotelio que rodea las cámaras cardiacas, es la continuación de los revestimientos de los vasos sanguíneos que salen y entran del corazón (Marieb, 2008). El miocardio es el músculo encargado de la parte contráctil del corazón (Ganong, 2013). El grosor del miocardio es más grueso en los ventrículos, principalmente en el ventrículo izquierdo debido a que bombea la sangre a todo el organismo (Marieb, 2008).

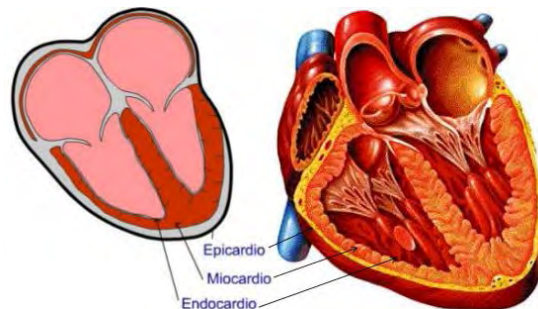


Figura 2. Esquema que muestra las capas que componen al corazón (Ganong, 2013)

1.4 CARDIOMIOCITOS

El miocardio está conformado por células especializadas llamadas cardiomiocitos. Son células cilíndricas y multinucleadas que miden entre 15-100 μm de largo. Poseen carácter estriado y se disponen en forma de “pantalón”, es decir, se dividen y se vuelven a unir varias veces (Figura 3A). Al conjuntarse unas con otras forman uniones permeables y comunicantes conocidas como uniones estrechas que permiten una difusión libre de los iones permitiendo que los potenciales de acción viajen de una célula miocárdica a la siguiente a través de los discos intercalares. Por lo anterior, se forma un sincitio celular en donde las células están interconectadas de tal forma que cuando se

excita una de estas células el potencial de acción se extiende a todas ellas saltando de una célula a otra a través de las interconexiones celulares (Ramírez, 2009).

Los cardiomiocitos se encuentran delimitadas por una membrana plasmática llamada sarcolema; el citoplasma recibe el nombre de sarcoplasma; contiene un retículo sarcoplásmico (retículo endoplásmico) y junto con invaginaciones provenientes del sarcolema, llamadas túbulos T, regulan la entrada del Ca^{+2} durante el proceso de relajación y contracción muscular. En su interior, el cardiomiocito se encuentra organizado en miofilamentos, una estructura con forma tubular de 1-2 μm de diámetro y dentro de él se encuentran las miofibrillas, lugar de la unidad fundamental de la contracción muscular: el sarcómero (Figura 3B).

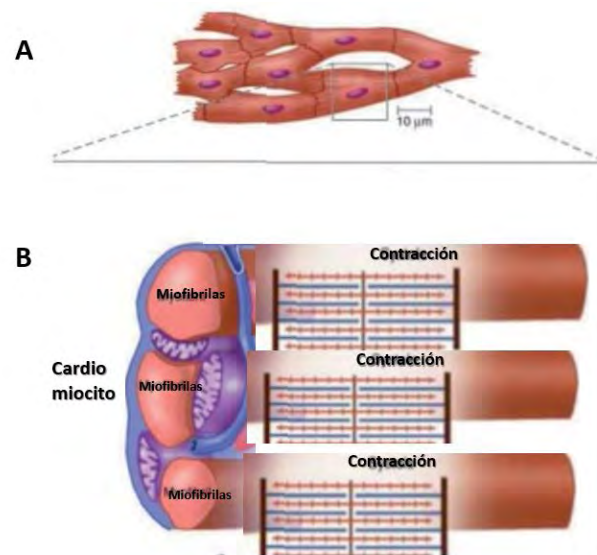


Figura 3. Organización del cardiomiocito. En la figura A se muestra la organización en pantalón de los cardiomiocitos. En la figura B se muestra un acercamiento de miofibrillas en contracción (Ramírez, 2009).

1.5 SARCÓMERO

El sarcómero tiene una longitud de 2.2 μm el cual está delimitado por una zona llamada línea o discos Z y en el centro se encuentra la banda M. Los filamentos que conforman el sarcómero se organizan en filamentos gruesos (banda A) y en filamentos delgados (banda I). Los discos Z están compuestos por proteínas llamadas: actinina, proteína C de unión a miosina, teletonina, proteína LIM, tropomodulina, CAPZ, miopaladín, miozenin-2, nebulina y cofilina; La banda M se encuentra conformada por la proteína titina; la banda A esta compuesta por filamentos de β -miosina y la banda I se compone por filamentos de α -actina, tropomiosina y un complejo de troponina conformado por tres proteínas: T, I, C (Figura 4) (Alberts, 2015).

Las proteínas del disco Z hacen función de andamiaje organizando del sarcómero horizontalmente. Tropomodulina y CAPZ, codificadas por los genes *TMOD1* y *CAPZ* respectivamente, unen cada

extremo del filamento de actina al disco Z y evitan su despolarización; la proteína C de unión a miosina, codificada por el gen *MYBPC3*, se encarga de regular la posición de la interacción de la actina-miosina uniéndolas en sentido transversal, sin ella hay una pérdida del alineamiento con el disco Z (López, 2004); teletonina, codificada por el gen *TCAP*, funciona como proteína de anclaje para la proteína titina (Morten, 2009); la proteína LIM, codificada por el gen *MLP* o *CSR3*, realiza interacciones proteína-proteína y puede formar dímeros, trímeros o tetrámeros con más proteínas como con teletonina, actina, cofilina y calcineurina; miozenina-2 (codificada por el gen *MYO22*) es una fosfatasa involucrada en la modulación del Ca^{+2} y junto con obscurina, codificada por el gen *OBSCN*, controlan interacciones con el retículo sarcoplásmico; miopaladín, codificada por el gen *MYPN*, hace comunicación entre el sarcómero y el núcleo, por lo tanto, se dice que está involucrada en el control de la expresión de génica. En la banda M, la titina, codificada por el gen *TTN*, es una proteína enorme con un peso de 3000 kDa, cubre la mitad del sarcómero extiéndose desde la línea M hasta el disco Z. Su función es mantener los filamentos de β -miosina centrados en el sarcómero (Morten, 2009).

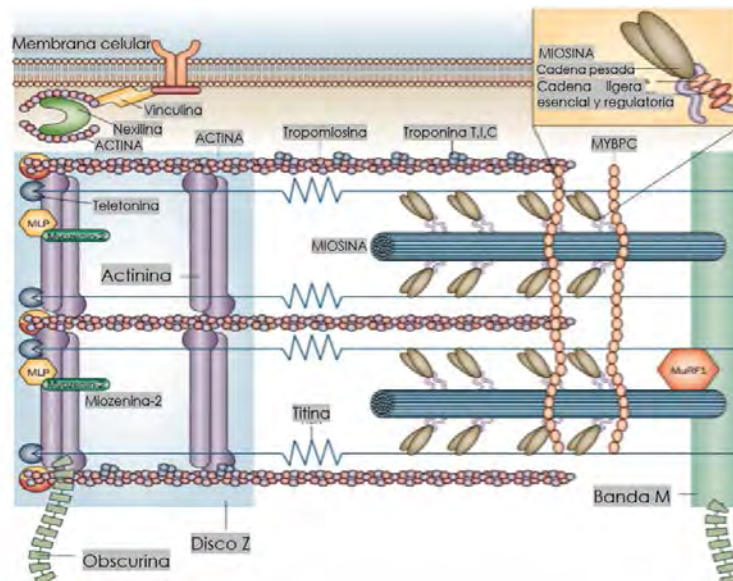


Figura 4. Imagen ilustrativa de las proteínas del sarcómero y su localización (Frey, 2012).

1.5 PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA CONTRACCIÓN

1.5.1 α -ACTINA, COMPLEJO DE TROPONINA Y TROPOMIOSIONA EN LA CONTRACCIÓN

En el sarcómero, la α -actina, codificada por el gen *ACTC1*, se encuentra asociada con la proteína tropomiosina (codificada por el gen *TPM1*) y un complejo de proteínas de troponina compuesto por tres polipéptidos: troponina T, I y C (codificados por los genes *TNNT2*, *TNNI3* y *TNNC1* respectivamente), las cuales son llamados de acuerdo a su función: la troponina T, corresponde al

polipéptido con el sitio de unión a tropomiosina; la troponina I tiene actividad inhibitoria y troponina C tiene sitios de unión al Ca^{+2} (Figura 5A).

La tropomiosina se encuentra alrededor de todo el filamento de actina en forma de hélice. Al encontrarse enrollada sobre la actina bloquea el sitio de unión de la miosina, por lo tanto, en ausencia de Ca^{+2} no se puede realizar la contracción muscular. Cuando existe una señal nerviosa se inicia un potencial de acción que activa los canales de Ca^{+2} presentes en los túbulos T, permitiendo su entrada hacia el sarcoplasma y da inicio a la contracción muscular. El Ca^{+2} se une a su sitio de unión en la troponina C, lo cual induce a un cambio de conformación en la tropomiosina (Figura 5B), dejando libre el sitio de unión de la actina con la miosina.

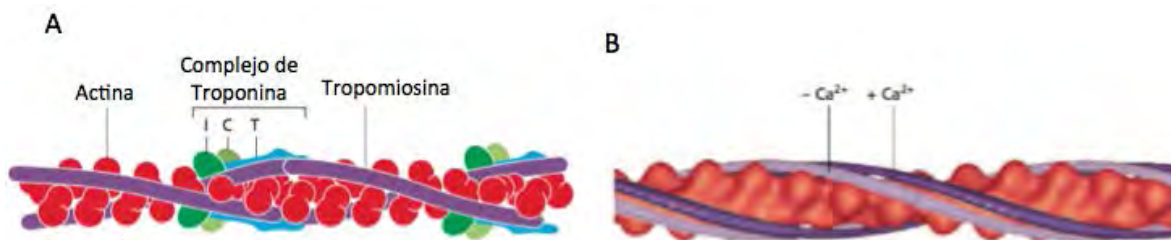


Figura 5. Actina, complejo de troponina y tropomiosina. En la figura A se muestra la ubicación de las proteínas asociadas al filamento de actina. En la figura B se representa el cambio de posición de la tropomiosina antes ($-\text{Ca}^{2+}$) y después ($+\text{Ca}^{2+}$) de la unión con el Ca^{2+} (Alberts, 2015).

1.5.2 β -MIOSINA

La proteína β -miosina, es una proteína hexamérica compuesta por dos cadenas ligeras esenciales, codificadas por el gen *MYL2*, dos cadenas ligeras regulatorias, codificadas por el gen *MYL3*, y dos cadenas pesadas codificada por el gen *MYH7* (Figura 6A). *MYH7* se localiza 14q11.2, tiene 40 exones y codifica una proteína de 1935 aminoácidos con un peso de 220 kDa (Ramírez, 2004)

Las cadenas de miosina tienen una perfecta organización dentro del sarcómero encontrando nueve cabezas de miosina cada 42.9 nm, en total, en cada sarcómero se han podido identificar 296 hexámeros de miosina. La cadena pesada de la miosina está compuesta por un extremo amino donde se localiza el dominio motor, el cual genera una cabeza con forma globular y se identifican dos dominios importantes en ella: el sitio de unión a ATP/ADP, también llamado sitio activo, y el dominio de interacción con la actina (Figura 6B). La localización de los residuos que conforman el sitio de unión a ATP/ADP difiere entre autores, sin embargo, la mayoría concuerda en una secuencia corta que va del residuo 178 al 185 conformada por GLY-GLU-SER-GLY-ALA-GLY-LYS (Blankenfeldt, 2006; Colegrave, 2014; NCBI Conserved domains, 2018; UniprotKb, 2018). Los residuos de la secuencia de miosina que tienen interacción con actina también difieren entre autores y son secuencias cortas localizadas en diferentes posiciones de la secuencia primaria, los residuos son del 400-418, 567-578 y 623-646 (Colegrave, 2014; Lorenz, 2010; Thomas, 2002).

Después de la cabeza, de los residuos 707-774, se localiza el “cuello”, el cual, tiene una estructura de α hélice en donde se encuentra el sitio de interacción con las cadenas ligeras (Figura 6B). Dentro

del cuello también se encuentra un dominio denominado “palanca” que tiene la función de intensificar los pequeños movimientos que se generan a través del dominio motor. Los residuos que conforman la palanca son del 781 al 835 (Colegrave, 2014).

La cadena pesada de miosina termina con “la cola”, a partir del residuo número 835 al 1935. Está compuesta por α -hélices súper enrolladas que dimerizan con otras colas de miosina para su correcto ensamblaje en el sarcómero y dar estabilidad al hexámero de miosina (Figura 6C). Para que se lleve a cabo la organización de α -hélice súper enrollada en la cola, se han descrito regiones denominadas dominios “heptad”. Estos dominios consisten en una repetición de aminoácidos nombrados como “*abcdefg*” (Figura 7A), en donde los residuos localizados en las posiciones *a* y *d* son hidrofóbicos y estabilizan interacciones entre la formación de la doble hélice super enrollada de las colas debido a que forman un “núcleo” apolar cuando las dos colas interactúan y los residuos en las posiciones *e* y *g* forman interacciones electrostáticas rodeando el núcleo hidrofóbico (Figura 7B) (Moore, 2011; Colegrave, 2014).

En la cola, se han identificado residuos de interacción con otras proteínas del sarcómero, como el caso de la proteína MYPC3 que interactúa en los residuos 1153 al 1581 y la proteína titina que interactúa en los últimos 113 residuos del extremo carboxilo (Colegrave, 2014).

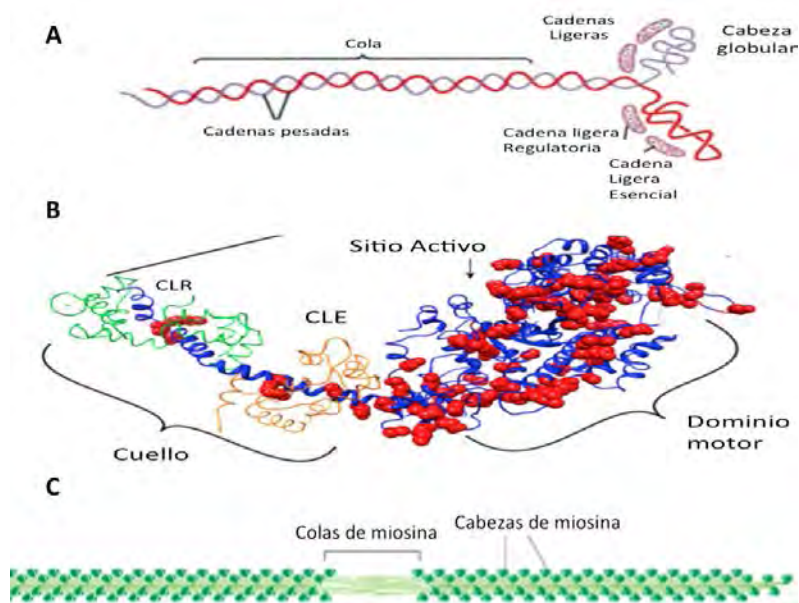


Figura 6. Hexámero de la miosina cardíaca. A) muestra el hexámero de miosina (Hall, 2013). B) muestra la estructura terciaria de la cadena pesada de la miosina y se puede identificar el sitio activo y los sitios de unión a las cadenas ligeras (Frey, 2012). C) β -miosina formando el filamento grueso del sarcómero (Alberts, 2015).

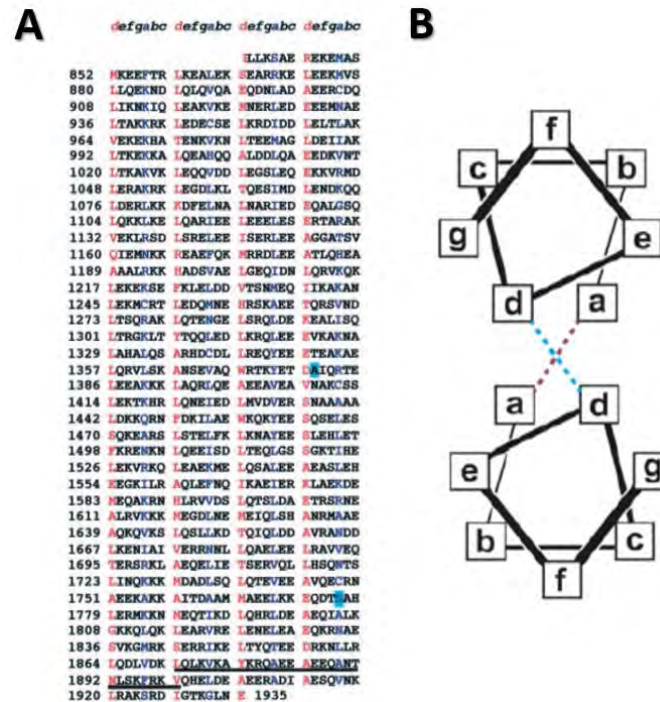


Figura 7. Secuencia e interacciones en los dominios heptad. A) se presenta la secuencia de aminoácidos de la cola de miosina del aminoácido 838 al 1935 y su posición en el dominio heptad al cual corresponde. Los aminoácidos localizados en las posiciones a y d se encuentran de color azul y rojo respectivamente. B) representación de las interacciones que se forman entre las posiciones de los aminoácidos de los dominios heptad para formar la α -hélice súper enrollada, los aminoácidos en las posiciones a y d forman el núcleo hidrofóbico (representado con líneas punteadas azul y roja) y el resto de los aminoácidos forman interacciones electrostáticas rodeando el núcleo hidrofóbico.

2.0 CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN CARDIACA

2.1 MECÁNICA DEL CICLO CARDIACO

El miocardio realiza movimientos involuntarios de contracción (llamado sístole) y de relajación (llamado diástole). En la diástole, las válvulas mitral y tricúspide se abren mientras que las válvulas aórtica y pulmonar se cierran lo que permite que la sangre llene tanto las aurículas como los ventrículos. En la contracción del músculo, disminuye la luz de las venas cava superior, inferior y pulmonares causando un aumento de la presión y permitiendo que la sangre sea bombeada fuera del corazón (Ganong, 2013).

Cuando se lleva a cabo la sístole y diástole, se generan cambios en las presiones y flujos de las cavidades cardiacas para poder expulsar la sangre fuera del corazón. Las presiones máximas ventriculares son 120 mmHg en el ventrículo izquierdo y 25 mmHg en el derecho. El volumen de sangre expulsada en la contracción es de 70 a 90 ml, el porcentaje de volumen de sangre expulsado por el ventrículo izquierdo se conoce como la fracción de expulsión o eyección y lo normal es

cercano a 65%. Este valor es determinante para evaluar el correcto funcionamiento del ventrículo izquierdo (Ganong, 2013).

2.2 MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN CARDIACA

Cuando ocurre el proceso de contracción, el sarcómero sufre un acortamiento. Esta reducción es provocada por un deslizamiento de los filamentos de actina sobre los filamentos de miosina, manteniendo la misma longitud en ambas proteínas (Alberts, 2015; Hall, 2013; Murray, 2010)

La contracción muscular consiste en la unión y desprendimiento de la cabeza globular de la miosina con los filamentos de actina. Este proceso depende del nucleótido ATP o ADP+Pi presente en el sitio activo de la cabeza de miosina. Dichos cambios provocan el movimiento de los filamentos de actina al centro del sarcómero y es cuando se contrae, este movimiento es llamado golpe de potencia.

El proceso se lleva a cabo en 5 pasos (Figura 8):

1. Inicia el ciclo desde el modo relajado. En la cabeza de miosina se encuentra una molécula de ATP, la cual impide la unión entre actina y miosina. En este primer paso, sucede la hidrólisis de ATP hacia ADP+Pi y se mantienen dentro del sitio activo de la cabeza de miosina.
2. El Ca^{+2} entra, se libera el sitio de unión a miosina en el filamento de actina, la cabeza de miosina se une a ella y se forma un complejo de actina-miosina-ADP-Pi.
3. La formación del complejo promueve la liberación del Pi, lo que inicia el “golpe de potencia”. Posteriormente, se libera el ADP y se genera un cambio conformacional (la cabeza de miosina cambia de su posición original de 90° hasta doblarse 45° sobre sí misma), deslizando la actina aproximadamente 10 nm hacia el centro del sarcómero.
4. Otra molécula de ATP se une a la cabeza de miosina y forma un nuevo complejo de actina-miosina-ATP.
5. Cuando existe ATP en la cabeza de miosina, tiene baja afinidad por la actina así que se libera o desprende de la actina. Así vuelve a un estado relajado en el sarcómero.
6. Se repite el ciclo de acuerdo a la demanda de contracción/relajación dentro del sarcómero (Murray, 2010; Spudich, 2016).

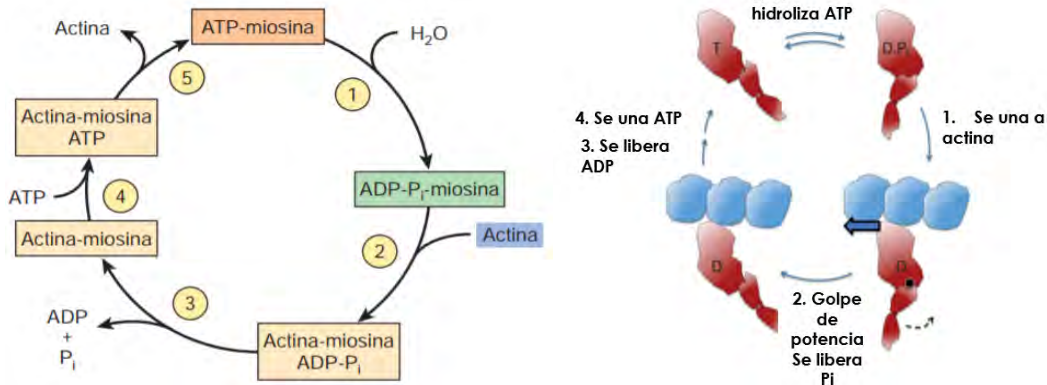


Figura 8. Ciclo de la contracción muscular. Del lado izquierdo, se muestra el ciclo en 6 pasos de forma esquemática. En la imagen de la derecha, se representa de forma gráfica (Spudich, 2016).

2.3 MECANISMO DE LA RELAJACIÓN CARDIACA

Como se mencionó anteriormente, la contracción/relajación muscular está regulada por la presencia o ausencia de calcio en el filamento delgado. Sin embargo, existe otro mecanismo que contribuye al proceso de relajación y consiste en la interacción asimétrica entre dos cabezas de miosina, en una se bloquea el sitio de unión a ATP/ADP y en la otra el sitio de interacción con el filamento de actina (Figura 9) (Wendt, 2001). De esta forma, la miosina es incapaz de llevar a cabo la contracción debido a que los dos sitios necesarios para este proceso están bloqueados (Figura 10). La cabeza de miosina que tiene bloqueado el sitio de interacción con ATP/ADP se denomina “cabeza libre” y la que tiene bloqueada el sitio de interacción con la actina se denomina “cabeza bloqueada” (Hu, 2016).

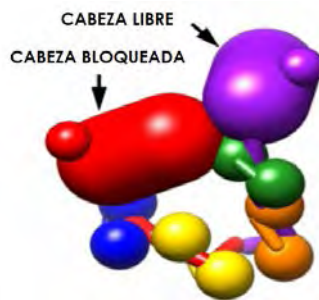


Figura 9. Interacción de dos cabezas de miosina (de color rojo y morado) durante la relajación. Del lado izquierdo se encuentra la miosina denominada bloqueada y del lado derecho la cabeza libre. De color azul y verde se representan las cadenas ligeras esenciales de cada cadena y de amarillo y naranja las cadenas ligeras esenciales regulatorias (Hu, 2016).

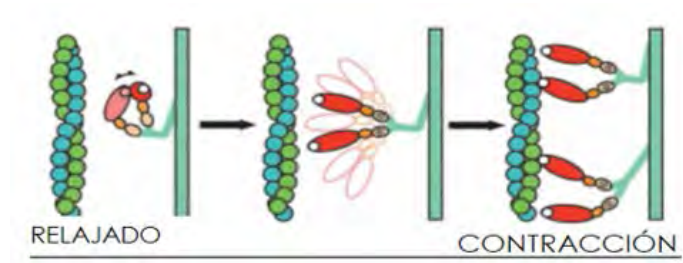


Figura 10. Caricatura de la conformación de la miosina en modo relajado y contraído. Primero se observa la conformación relajada ya que ambas cabezas de miosina están interactuando. Posteriormente, las cabezas se separan y cambian conformación para unirse a actina y tener el sitio activo libre para la hidrólisis del ATP y poder llevarse a cabo la contracción (Wendt, 2001).

3.0 CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA

3.1 DEFINICIÓN

La cardiomiopatía hipertrófica (CMH) se define como una enfermedad caracterizada por un engrosamiento en el ventrículo izquierdo del corazón (Figura 11) (Liew, 2017; Sabater-Molina, 2017). Es una de las principales causas de muerte súbita en personas menores a los 35 años y atletas, con una mortalidad súbita del 0.5-1% anual en la población global (Frey, 2012; E, 2014; Sabater-Molina, 2017). Fue descrita por primera vez en 1957 por el patólogo británico Robert Donald Teare en 8 autopsias de cadáveres con una hipertrofia asimétrica en el corazón, de las cuales, 7 de ellas tuvieron una muerte repentina (Liew, 2017).

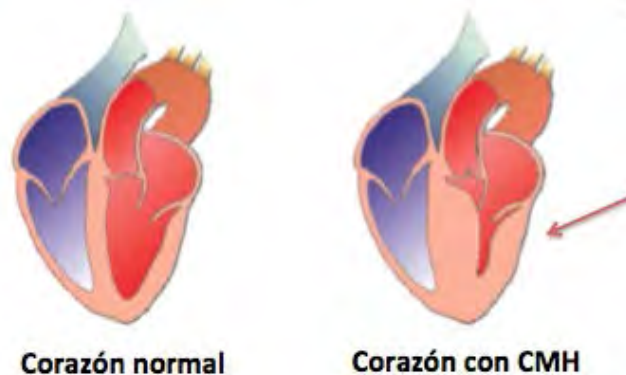


Figura 11. Diferencias morfológicas de un corazón normal y con CMH. Del lado izquierdo podemos observar la morfología de un corazón normal. Del lado derecho, se muestra una representación de un corazón de un paciente con CMH, en donde el miocardio presenta hipertrofia (Rodríguez, 2014)

3.2 DIAGNÓSTICO

3.2.1 CUADRO CLÍNICO

Existen pacientes asintomáticos (60-70%) así como pacientes con una progresión sumamente rápida de la enfermedad (Dumont, 2007), se sabe que sólo el 25% de los pacientes desarrolla síntomas (Rodríguez, 2014). Es importante destacar que el porcentaje de pacientes con síntomas graves aumenta con la edad, siendo probable que los pacientes con una mayor expresión evolucionen con una frecuencia más elevada a una sintomatología incapacitante con el transcurso de los años (Navarro, 2004).

La principal manifestación clínica que se presenta es la muerte súbita (MS). La MS tiene una prevalencia global del 1% anual entre los 12 y los 35 años (Lizalde, 2003) y puede presentarse después de un periodo de ejercicio intenso (Brugada, 1998). La disnea se presenta en el 90% de los pacientes, se define como dificultad respiratoria y puede aparecer en estado de reposo o durante

el esfuerzo físico (López, 2004; Navarro, 2010). La angina de pecho o dolor precordial se presenta en el 70-80% de los pacientes y es causada por un desbalance entre la oferta y la demanda de oxígeno debido a la disminución de la densidad capilar en el miocardio hipertrófico (López, 2004; Marian, 2017). El síncope es el síntoma menos frecuente ya que se observa en el 20% de los pacientes (Navarro, 2004). Se define como una pérdida transitoria de conciencia acompañado con desmayo con recuperación espontánea sin necesidad de intervención médica o farmacológica (Peinado, 2004).

Para poder diagnosticar CMH, además de realizar una historia familiar y clínica, es indispensable realizar estudios que permiten conocer el funcionamiento y fisiología cardiaca.

3.2.2 ESTUDIOS DE GABINETE

3.2.2.1 ECOCARDIOGRAMA

Para el diagnóstico de la CMH, el ecocardiograma aporta valores importantes como dimensiones y volúmenes del ventrículo izquierdo (Navarro, 2004)

- Magnitud, distribución y localización de la hipertrofia ventricular
- Función sistólica ventricular
- Función diastólica ventricular
- Presencia de obstrucción dinámica en el tracto de salida del VI
- Existencia de movimiento anterior sistólico de la válvula mitral
- Descartar patología que pueda dar lugar a hipertrofia ventricular

Para hacer el diagnóstico de CMH, el principal valor a considerar dentro del ecocardiograma es el grosor parietal o el diámetro del septum del ventrículo izquierdo. El valor límite difiere entre autores, sin embargo, la sociedad europea de cardiología junto con la fundación y colegio americano de cardiología (ESC/ACCF, por sus siglas en inglés) acordaron que un valor >15 mm se considera como hipertrofia, y un valor más bajo, a partir de 13mm, cuando en la historia familiar existan casos confirmados de CMH (Liew, 2017).

La función sistólica ventricular también se puede evaluar través de la fracción de acortamiento y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) (Cooley, The Texas Heart Institute, 2015). En la CMH se ve alterada por la disminución del área del VI causada por la hipertrofia. Algunos pacientes, al tener hipertrofia severa en el VI presentan una reducción significativa de la fracción de eyección (Navarro, 2004).

3.2.2.2 ELECTROCARDIOGRAMA

El electrocardiograma (ECG) es otro estudio empleado en CHM. Sin embargo, 35% de los pacientes con CMH y 14% de los pacientes con hipertrofia severa (>30 mm) no presentan criterios electrocardiográficos alterados, por lo que su sensibilidad es limitada (López, 2004).

En el ECG de una persona con CMH se observan alteraciones en la conducción auriculo-ventricular y la onda Q (se considera anormal cuando la onda Q es mayor o igual de 40 milisegundos con una profundidad mayor del 25% de la onda R correspondiente o mayor de 3 mm). La onda Q en la CMH se genera cuando la fuerza eléctrica del septum es tan grande que cancela las fuerzas eléctricas de otras regiones del ventrículo izquierdo y derecho. La fuerza eléctrica inicial de despolarización ventricular se dirige hacia la derecha y genera una pequeña onda Q en las derivaciones I, avL y V5-V6. Los pacientes con estos trastornos de conducción suelen mostrar un cuadro clínico más severo, un mayor grosor en el VI, una mayor extensión de la fibrosis y una menor fracción de eyección del VI (Navarro, 2004).

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

El dato más reciente reporta una prevalencia de 0.16-0.29% (1:625-1:333) en la población global adulta sin distinción geográfica, étnica o sexo. Sin embargo, se menciona que se podría incrementar a una prevalencia global de 0.6% (1:167) dependiendo del grosor del septum considerado como límite para diagnosticar hipertrofia, ya que se han encontrado reportes con un límite de 13 mm y otros de 15 mm (Marian, 2017).

3.4 ETIOLOGÍA

La CMH puede ser de origen primario (genético) o secundario (causada por otra enfermedad). La CMH de origen genético, es causada por mutaciones y se denomina “familiar” cuando existen diferentes individuos enfermos en la familia y es causada por la misma mutación genética. Se toman en cuenta las mutaciones *de novo* (mutaciones que ocurren por primera vez en un individuo en la familia) debido a que posteriormente puede ser transmitido a sus hijos (Elliot, 2008; Marian, 2001).

La CMH de origen secundaria es causada como consecuencia de otra enfermedad de tipo cardiaca como hipertensión y enfermedad valvular (Liew, 2017; Molina, 2017), por síndromes metabólicos como enfermedad de Pompe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Forbe’s, enfermedad de Dannon y otro tipo de síndromes como el síndrome de Noonan, Beckwith-Wiedemann o LEOPARD. Se ha reportado que 2/3 de los pacientes diagnosticados con CMH son de origen familiar, mientras que el resto es de origen secundario (Marian, 2001).

3.4.1 GENES REPORTADOS COMO CAUSALES

El diagnóstico genético es complejo debido a la heterogeneidad genética que presenta la enfermedad. Solo en el 50% de los pacientes se ha encontrado un gen causal de la enfermedad; en el 5% de los casos se han reportado 2 mutaciones independientes, en el 0.8% de los casos se han encontrado hasta 3 mutaciones en genes diferentes por paciente y en un 40% de pacientes no se ha podido identificar una mutación causal (Frey, 2012; Cirino, 2017). Dentro de las mutaciones reportadas, el 50-60% corresponden a mutaciones en las proteínas del sarcómero (Cirino, 2017; Roma-Rodriguez, 2014) y el resto se distribuye en genes metabólicos como *GLA* (α -galactosidasa), *LAPMP2* (glicoproteína 2 asociada a la membrana lisosomal) y *PRKAG2* (proteína cinasa gamma asociada activada por AMP-5) (Frey, 2012).

Existen controversias sobre la frecuencia de mutaciones causales en los genes sarcoméricos, sin embargo, los genes que ocupan los dos primeros lugares son *MYH7* y *MYBPC3* (Cirino, 2017; Liew, 2017). El gen *MYH7* presenta una frecuencia de 40% (Tabla 1) (Cirino, 2017). Actualmente la base de datos de OMIM "Online mendelian inheritance in man" ha reportado 1352 variantes en el gen *MYH7* asociadas a CMH (OMIM, OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man, 2018).

Tabla 1. Reportes de frecuencia reportados por Cirino y cols. 2017

Nombre de la proteína	Gen	Frecuencia en %
β -miosina	<i>MYH7</i>	40
Proteína C de unión a miosina	<i>MYBPC3</i>	40
Troponina T	<i>TMMT2</i>	5
Troponina I	<i>TNNI3</i>	5
Tropomiosina	<i>TPM1</i>	2
Cadena ligera regulatoria de miosina	<i>MYL2</i>	desconocido
Cadena ligera esencial de miosina	<i>MYL3</i>	1
α -actinina	<i>ACTC1</i>	desconocido
Proteína rica en cisteína y glicina	<i>CRP3</i>	desconocido
α -actinin-2	<i>ACTN2</i>	desconocido
Miosina-6	<i>MYH6</i>	desconocido
Teletonina	<i>TCAP</i>	desconocido
Troponina C	<i>TNNC1</i>	desconocido
Fosfolamban cardiaca	<i>PLN</i>	desconocido
Miozenin-2	<i>MYOZ2</i>	desconocido
Nexilina	<i>NEXN</i>	desconocido

3.5 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

CMH es una enfermedad autosómica dominante, con penetrancia incompleta y expresividad variable (Frey, 2012). El término penetrancia o penetrancia completa se refiere a la proporción de

personas portadoras del gen mutado que presentan el fenotipo asociado. Cuando se presentan casos de individuos portadores del gen mutado sin manifestar el fenotipo, se dice que la enfermedad tiene penetrancia incompleta. La penetrancia incompleta se puede presentar por una combinación de factores genéticos, ambientales o estilo de vida. La expresividad variable, se refiere al rango de diferentes signos síntomas que pueden presentar por individuos con una enfermedad aun teniendo la misma causa genética (Genetics home reference, 2018). En la CMH, por cada familia que presentan la misma mutación, existen casos de expresividad variable en diferencias en edad de inicio de la enfermedad, gravedad del cuadro clínico e incluso hasta en el grosor del septum (Frey, 2012).

3.5.1 MUTACIONES EN *MYH7*

A nivel estructural, las mutaciones en el gen *MYH7* tienen mayor prevalencia en la cabeza motora de la proteína y en la palanca, provocando afectos principalmente el sitio activo de la ATP/ADP, el sitio de interacción actina-miosina y el sitio de unión con las cadenas ligeras, por lo que se ve afectada la actividad enzimática y contráctil de la proteína (Moore, 2011). En la Figura 12A se muestran algunas variantes reportadas, el sitio donde se ubican y la función de la proteína que se podría ver afectado.

A nivel fisiopatológico, cada variante está involucrada en una manifestación diferente de la enfermedad, por ejemplo, la variante V606M ha presentado una supervivencia normal en los pacientes portadores y sin hipertrofia, en contraste, un corazón con la variante R453C presentó hipertrofia y se reportó que el portador murió de muerte súbita (Figura 12B). (Blankenburg, 2014).

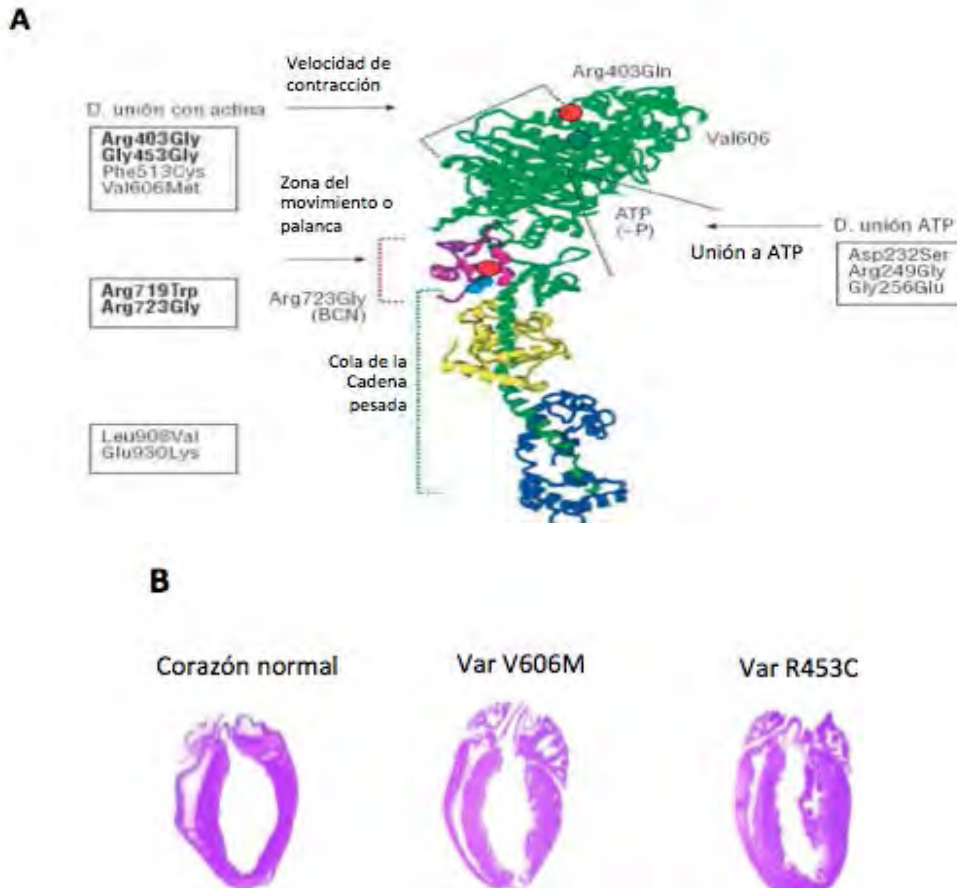


Figura 12. Heterogeneidad de las variantes génicas reportadas en el gen MYH7. A) Muestra el hexámero de miosina y la ubicación de algunas mutaciones reportadas dentro de la cadena pesada. De acuerdo a la localización, se presenta la función o dominio de la proteína que pudiese afectar la variante. Obtenida de López et al, 2004. B) Comparación histológica entre un corazón normal y 2 variantes encontrados en pacientes con CMH (Blankenburg, 2014).

3.6 FISIOPATOLOGÍA

En la CMH, se observa la hipertrofia principalmente dentro del septum de manera asimétrica, es decir, no todos los segmentos del ventrículo izquierdo están engrosados en la misma proporción. La hipertrofia del miocardio va desde los 13 mm hasta 60 mm de espesor en casos extremos (Chavez, 2003; E, 2014; Frey, 2012; Lizalde, 2003).

El corazón presenta desorganización de células cardiacas y fibrosis. Los cardiomiocitos muestran aumento de diámetro, desorganización de la miofibrilla y necrosis debido al estrés (Marian A. J., 2017). Para poder mantener la anatomía del miocardio por la reducción del número de cardiomiocitos, existe una acumulación de fibroblastos, los cuales, carecen de actividad contráctil, provocando un aumento de células cardiacas y causando hipertrofia (Rodríguez, 2014). Este desarreglo celular se ha observado en el 95% de los pacientes que han padecido muerte súbita (Chavez, 2003; Marian, 2017; Lizalde, 2003).

Hasta la fecha no se conoce al 100% la relación entre las mutaciones en proteínas sarcoméricas y la generación de la hipertrofia. Sin embargo, existen teorías o hipótesis que tratan de explicar este fenómeno a través de las diferentes funciones que se afectan en la célula cardíaca:

1. Perturbaciones en el ciclo del calcio

Se ha observado que los canales de calcio en el ventrículo izquierdo no regulan la entrada de Ca^{+2} correctamente. Se ha reportado que podría existir un aumento de calcio en el citosol en respuesta al déficit de fuerza en el cardiomiocito. Además, el calcio es también un estímulo que activa cascadas de señales intracelulares que conducen a la síntesis de proteínas y diferenciación celular causando hipertrofia (Navarro, 2004).

2. En respuesta al déficit contráctil y energético

En respuesta al déficit contráctil generado por las mutaciones se activan vías de señalización intracelulares y factores tróficos para activar la maquinaria transcripcional, expresión de genes, síntesis de proteínas y aumento en el número de sarcómeros (Navarro, 2004).

3. En respuesta al déficit energético

En el cardiomiocito existe un consumo anormal de energía debido al aumento compensador de la producción de fuerza por parte de la miosina, lo cual, da un consumo excesivo de energía, el cual es detectado por los sensores metabólicos del ATP y cuando hay un consumo excesivo de energía se lleva a la depresión energética y muere el miocito causando fibrosis. (Navarro, 2004).

4. Incremento en la fibrosis cardíaca

La fibrosis, se presenta por el reemplazamiento de cardiomiocitos que sufren apoptosis (Frey, 2012).

5. Alteraciones biomecánicas (estrés)

El sarcómero, además de realizar la contracción, tiene la función de mediar el estrés mecánico del cardiomiocito. Tiene un sensor localizado en la banda M y discos Z y se ha reportado que mutaciones en proteínas de dichas zonas generan un desarreglo en dicho sensor del estrés generando hipertrofia compensatoria. (Frey, 2012).

4.0 MODELADO POR HOMOLOGÍA

Conocer la estructura de una proteína es crucial para entender su función biológica y existen diferentes metodologías experimentales para poder determinarlas (Fiser, 2003). Hasta la fecha, se han resuelto más de 130,000 estructuras proteicas por técnicas de cristalografía, resonancia magnética y microscopía electrónica (Young, 2018). Sin embargo, con los avances de nueva secuenciación, este número se considera como una fracción pequeña debido a que cada vez es más fácil conocer la secuencia de una proteína. Se calcula que aproximadamente se ha podido resolver la estructura de al menos una proteína dentro de cada familia de proteínas, por lo que, usando otras técnicas como el modelado de proteínas es posible generar un modelo representativo de una proteína que aún no tiene una estructura resuelta (Fiser, 2003).

El modelado de proteínas es una técnica predictiva que permite obtener una aproximación de la estructura atómica y espacial de una cadena polipeptídica o de proteínas. Existen dos tipos: uno llamado modelado por homología (MPH), en donde se toma como base estructuras ya conocidas de proteínas relacionadas o con mayor homología (llamada moldes o templado). El segundo tipo de modelado se llama “*ab initio*” o ensamblaje “*de novo*” y esta técnica se utiliza cuando no hay templados disponibles.

Las aplicaciones del MPH son (Baker, 2001; Fiser, 2003):

- Predicción de ligandos y actividades catalíticas
- “Docking” de macromoléculas o de interacciones entre proteínas
- Diseñar quimeras
- Encontrar dominios funcionales o motivos importantes en una proteína
- Diseñar mutaciones dirigidas para probar hipótesis sobre la función o predecir el análisis del efecto de mutaciones.
- Modelar la especificidad de un sustrato
- Predicción de epítopes antigénicos
- Simulaciones de acoplamiento proteína-proteína
- Inferir el potencial electrostático alrededor de una proteína
- Ensamblaje de una alineación de secuencia-estructura
- Planeación de nuevos experimentos

Realizar un MPH consiste en los siguientes pasos:

- 1) Encontrar la estructura proteica con mayor similitud a la proteína problema
- 2) Alinear ambas secuencias
- 3) Construir el modelo
- 4) Evaluar el modelo

ANTECEDENTES DIRECTOS

A partir del análisis de secuenciación masiva de 28 pacientes, diagnosticados con CMH, se seleccionaron 9 casos (Tabla 2), los cuales presentaron un cambio en un solo nucleótido diferente en el gen *MYH7*.

Tabla 2. Cambio y posición de nucleótido, de aminoácido y el rs.

	Cambio y posición de nt*	Cambio y posición de aa*	rs
1	c.1567 A>G	N479S	rs727504236
2	c.2286 C>T	R719W	rs121913637
3	c.2352 G>C	G741R	rs121913632
4	c.2620 G>A	A797T	rs3218716
5	c.2525 G>A	S842N	rs397516154
6	c.2913 G>A	D928N	rs727503252
7	c.3280 G>C	R1050P	rs759579652
8	c.4183 C>T	T1351M	rs370403289
9	c.4260 G>A	A1379T	rs397516202

*nt, nucleótido; aa, aminoácido

Las 9 variantes se volvieron objeto de estudio del presente proyecto.

JUSTIFICACIÓN

La cardiomiopatía hipertrófica constituye la enfermedad cardíaca de tipo genético más frecuente en el mundo, con una mortalidad anual global de 0.5-1% en jóvenes menores a 35 años, donde el gen más frecuentemente mutado es *MYH7*. La caracterización de las mutaciones en este gen hasta el momento es muy pobre. Su estudio ayudará a asociar el cambio de estructura en la proteína con la generación de la hipertrofia y el desarrollo de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Las variantes génicas identificadas en el gen *MYH7* en pacientes mexicanos con cardiomiopatía hipertrófica cosegregarán en los familiares afectados y provocarán cambios estructurales en la cadena pesada de la β -miosina.

OBJETIVO GENERAL

Realizar estudios de segregación de las variantes en el gen *MYH7* en los familiares sanos y enfermos del caso índice en estudio, así como un análisis predictivo *in silico* de los efectos que cada variante tiene sobre la estructura de la proteína.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la forma de herencia de la CMH en cada familia mediante análisis de la genealogía.
2. Realizar el análisis de cosegregación de las variantes en estudio en cada familia.
3. Identificar, en un modelo *in silico*, el papel que tiene cada aminoácido en estudio en su forma nativa.
4. Para cada mutación, analizar la consecuencia del cambio de aminoácido en la estructura o función de la proteína en el modelo *in silico*.
5. Establecer una posible correlación entre los cambios estructurales en la proteína generados por las variantes en el gen y el cuadro clínico de los pacientes con el objetivo de determinar la causalidad de la enfermedad.

METODOLOGÍA

ANÁLISIS GENÉTICO

Para poder realizar los estudios de cosegregación de cada familia en estudio, se estudiaron a los familiares de primer grado de cada caso índice; una vez firmado el consentimiento informado, se recolectaron muestras de sangre de cada uno de ellos.

SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS

Cada muestra obtenida se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (rpm) por 30 minutos en la centrifuga Beckman Coulter™, Allegra 25R Centrifuge para poder separar los leucocitos. La sangre se separa en tres fases: en glóbulos rojos al fondo del tubo (debido a que tienen una mayor densidad), glóbulos blancos o leucitos en la parte media y sobrenadante llamado plasma.

EXTRACCIÓN DE ADN

Posteriormente, se extrajo el ADN de los leucocitos utilizando el estuche comercial QIAamp DNA Blood Midi kit (100) siguiendo el protocolo que se presentan a continuación: (Qiagen, 2015).

1. Se añadieron 200 µl de proteasa a la muestra (la proteasa se reconstituyó con 5.5 ml de agua grado biología molecular).
2. Se añadieron 2.4 ml de tampón “AL Lysis” y se mezcló invirtiendo el tubo 15 veces seguido de una agitación vigorosa por un minuto.
3. Se incubó por 10 minutos a 70°C.
4. Se agregó 2 ml de etanol (96-100%) y se mezcló invirtiendo el tubo 10 veces, seguido de una agitación vigorosa
5. Se agregó la mitad de la solución del paso anterior en una columna QIamp Midi y se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. Este paso se repitió hasta que se agregó todo el contenido del paso 4.
6. Se removió el filtrado
7. Se añadieron 2ml de tampón “AW1” en la columna y se centrifugó a 5000 rpm por 1 minuto.
8. Se removió el filtrado
9. Se añadieron 2ml de tampón “AW2” en la columna y se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos (El tampón se preparó previamente con 190 ml de etanol antes del uso)
10. Se cambió a columna a un tubo nuevo/limpio y se desechó todo el filtrado
11. Al pellet se agregaron 300 µl de agua grado biología molecular, se incubó por 5 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 2 minutos.
12. El ADN se guardó en congelación hasta su uso.

CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD GENÓMICA

Una vez aislado el ADN, se midió la concentración con el equipo NanoDrop One de ThermoFisher SCIENTIFIC. El NanoDrop es un espectrofotómetro de espectro (220-750 nm) que mide concentraciones desde 1 µl de muestra en ng/µl. El espectrofotómetro mide la cantidad de luz que pasa a través de una longitud de onda específica, la cantidad de luz absorbida por el medio es proporcional a la concentración del soluto presente (en este caso el ADN). El software calcula automáticamente la concentración de los ácidos nucleicos con una longitud de onda de 260nm (absorbancia el ADN) (Scientific-NanoDrop-One). Adicionalmente, el nanodrop calcula la pureza de cada muestra midiendo la absorbancia a 280 (absorbancia del ARN y proteínas) y 230 nm (absorbancia de carbohidratos, fenoles) y obtiene la relación 260/280, 260/230. Los valores normales de pureza oscilan entre 2 y 2-2.20 respectivamente (Thermo-Scientific, T042-TECHNICAL BULLETIN).

Posteriormente, se evaluó la integridad del ADN por medio de la electroforesis en gel de agarosa.

Durante el proceso de electroforesis, se aplica una corriente eléctrica en una cámara con electrodos positivos y negativos en sus extremos, el ADN al tener carga negativa migrará hacia el electrodo positivo y los fragmentos cortos logran atravesar más rápidamente o migrar más al fondo del gel a diferencia de los fragmentos largos que se tardan más y migran menos; la posición en donde se detiene el fragmento se llama banda. En la cámara de electroforesis, se añade una solución llamada tampón de corrimiento. Esta solución debe ser de la misma composición y pH con la que se preparó el gel. La función del tampón es ser un medio para la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene el pH sin variaciones mientras se realiza el corrimiento. Para el caso de los ácidos nucleicos se puede utilizar TBE (Tris, Borato, EDTA) o TAE (Tris, ácido acético, EDTA) como buffer de corrimiento (Mora, 2016).

Para poder saber el tamaño del fragmento, existe un marcador de peso molecular que se utiliza como estándar de referencia. El marcador de peso molecular es un bacteriófago o plásmido que fue sometido a corte con enzimas de restricción y generó fragmentos de diversos tamaños conocidos; al terminar la electroforesis con la posición de las bandas del marcador, se puede saber el tamaño aproximado de cada fragmento (Mora, 2016).

Para poder visualizar la posición de las bandas dentro del gel se necesita agregar a la muestra una sustancia que se inserta entre las bases del ADN llamado agente intercalante. Esta sustancia contiene un fluoróforo que al ser excitado con luz ultravioleta emite fluorescencia. Entonces, el último paso de la electroforesis es “revelar” el gel en un transiluminador, el cual es un equipo que transmite luz del espectro ultravioleta a una longitud de onda a 302 nm.

Para el caso de la integridad genómica de cada muestra, se realizó un gel al 0.8% de agarosa con TAE 1X; como intercalante del ADN se utilizó “RedGel™ Nucleid acid Gel stain, 10,000X in wáter” de la marca BIOTUM, diluido a una concentración de 1X; como marcador de peso molecular se utilizó “GeneRuler 100 BP” de Thermo Scientific con una concentración de 0.1 ng/µl y se corrió el gel por 45 minutos a 50 V en la cámara de electroforesis de AccesoLab, MY GEL mini™ ACCURIS INSTRUMENTS. Para revelar el gel se utilizó el transiluminador CHEMIDOC MP de la marca BIO-RAD, Modelo Universal Hood III.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* para la múltiple obtención (amplificación) de fragmentos específicos de ADN (Asuar, 2014); fue inventada por Kary Mullis, quien fue ganador del premio nobel de Química en 1993 (Poza, 2001). Esta técnica está basada en el proceso de síntesis que tiene el ADN dentro de una célula a partir de un templado de ADN donde se desnaturaliza, se unen oligonucleótidos para que la polimerasa añada los nucleótidos siguientes y se obtienen dos cadenas de ADN de doble hebra a partir de una.

La técnica de PCR se realiza con los siguientes componentes: una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*; un buffer que provee a la Taq polimerasa las condiciones que necesita para funcionar como cierto pH, cantidades de magnesio en forma de $MgCl^{+2}$ y KCl; oligonucleótidos, pequeños fragmentos de ADN (de 20-25 nucleótidos) que son complementarios (5'-3') en los extremos de la secuencia de ADN que nos interesa y deoxinucleótidos fosfato (DNTPs).

La técnica de PCR consta de 3 pasos:

1. Desnaturalización: por medio del aumento de temperatura, la hebra de doble cadena que forma el ADN se separa en dos. En este paso se utilizan temperaturas entre 93 a 97 °C
2. Alineamiento/Hibridación: en este paso, se baja un poco la temperatura para que los oligonucleótidos complementarios a la secuencia molde de ADN se hibriden y se unan al extremo 3' que flanquea al fragmento de interés; sucede a temperaturas entre 50 y 65 °C.
3. Elongación/extensión: se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento final de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' → 3' por la enzima Taq polimerasa, la cual incorpora los DNTPs presentes en el medio siguiendo la cadena molde. (Poza, 2001)

Durante la PCR, estos 3 pasos se repiten y a cada repetición se le conoce como ciclo. En el primer ciclo, se sintetizarán los primeros fragmentos a partir del ADN genómico. Estos fragmentos no tendrán el tamaño esperado ya que la taq copiará hasta donde le sea posible; después en el segundo ciclo, los oligonucleótidos, además de unirse al ADN genómico, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo. De esta forma por cada ciclo aumentará el número de fragmentos del tamaño de interés (Asuar, 2014); entonces, por cada ciclo se obtiene una cantidad de ADN de 2^n (n es el número de ciclos), por lo que la amplificación se realiza en forma exponencial (Poza, 2001).

En el presente proyecto, se realizó la PCR en el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700. Las concentraciones de los componentes fueron: Taq polimerasa con concentración de 5 U/ μ L de Dream Taq Thermo Fisher Labs, se añadió 0.25 μ L por reacción para tener una concentración final de 1.25 U/ μ L; DNTPs con concentración inicial de 10 mM, se añadió 1 μ L por reacción para tener una concentración final de 0.04mM; el tampón para PCR se utilizó a una concentración de 10x, se añadieron 5 μ L; el ADN de cada muestra se agregó de acuerdo a la concentración de cada uno para alcanzar 1000 ng/ μ L; los oligonucleótidos (Tabla 3) se diluyeron a 100 mM cada uno (los oligonucleótidos utilizados fueron previamente diseñados y validados en el

proyecto que antecede al presente); y finalmente, se agregó agua Milli Q para completar 50 µL de volumen final por reacción.

El termociclador se programó para hacer un PCR con las siguientes condiciones:

1. Pre-ciclo a 94°C por 5 minutos
2. 40 ciclos de: 95°C por 30 segundos, T_m °C de cada par de oligonucleótido por 30 segundos (Tabla 3), 72°C por 30 segundos.
3. 72°C por 7 minutos
4. 4°C por tiempo infinito

Tabla 3. Datos de los oligonucleótidos utilizados

# identificador de CI	Oligonucleótido sentido (Derecho 5´-3´)	Oligonucleótido anti-sentido (Reverso 5´-3´)	T _m °C	Tamaño de fragmento (pb)
rs727504236	CCTCCATGTGTCCACTTTCA	CTGGGAGTGGGAGAACAATC	59.5	659
rs121913637	AGGGGTACGAGGGAAAGAGA	GGTTCAAGACCTGGCTCTGT	59.7	945
rs121913632	CATGACTAGGGAGGGGTACG	CAGTGACAAAGCCAGGATCA	59.6	719
rs3218716	TACAAGTTTGGCCACACCAA	CCCTGTGACTGCAGTGTGTT	63	575
rs397516154	GTCAGCTCTTTCCCTCTGC	GTTTCCCGCTTCTCTGAGG	59.7	679
rs727503252	CATAAGTGCTTGGCATCAGC	AGGACCTTACCCCTGAACA	59.8	784
rs759579652	TCATTCCCACTGAGTGCTTA	AGAATACGGCTTTGGGGTTT	59.6	614
rs370403289	TGCGCTATGGACATTGAGGA	AGGCCAAGGGATGATGTTGA	62.7	611
rs397516202	TGCGCTATGGACATTGAGGA	AGGCCAAGGGATGATGTTGA	62.7	611

Una vez terminada la amplificación se realizó un gel de agarosa al 1% (con los mismos equipos y reactivos antes mencionados) para comprobar que se haya amplificado el fragmento esperado (tabla 3).

SECUENCIACIÓN SANGER

Las muestras fueron secuenciadas por la metodología llamada “Secuenciación SANGER”. Este proceso se llevó a cabo en la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica. El electroferograma de cada muestra se analizó con la versión gratuita del programa CHROMAS v.2.6.4 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD O BENIGNIDAD DE VARIANTES

Para determinar la patogenicidad de cada variante en estudio, se utilizó la guía: “Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology” (Sue Richards Chair, 2015). En el documento se añaden tres tablas: una para evaluar la patogenicidad de las variantes (Tabla 4), otra para evaluar la benignidad (Tabla 5) y una tabla final (Tabla 6) en donde de acuerdo con el puntaje obtenido se determina si la variante en estudio es patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto, probablemente benigna o benigna.

La tabla de patogenicidad (Tabla 4) está dividida en cuatro secciones las cuales son: evidencias muy fuertes de patogenicidad, evidencia fuerte, evidencia moderada y evidencias que sugieren patogenicidad. Cada sección tiene diversos criterios que en conjunto ayudan a determinar o negar patogenicidad. Cada variante en estudio se cuestionó y analizó en cada criterio, en caso de cumplir el criterio se le asignó el valor de 1 y en caso de no cumplir se le asignó valor de 0.

La tabla de benignidad (Tabla 5), está dividida en tres secciones: “stand-alone” o evidencia que por sí sola es de una variante benigna, evidencia fuerte y evidencia que sugiere que la variante puede ser benigna. Igualmente, cada sección tiene criterios de evaluación en donde si la variante analizada cumple el criterio se le asignó valor de 1 y en caso de que no, se le asignó valor de 0.

Finalmente, con ayuda de la tabla 6 se tomó la decisión final para determinar dentro de cuál de las 5 categorías se encuentra cada variante. El proceso consistió en sumar el puntaje por cada sección dentro de las tablas de patogenicidad y benignidad y de acuerdo a cada condición establecida en la tabla se categorizaron.

Tabla 4. Criterios para clasificar variantes patogénicas

Criterios para clasificar variantes patogénicas		
Clasificación	Sigla	Definición del criterio
Muy fuerte	PVS1	Variantes nonsense, causan un cambio en el marco de lectura, son canónicas +/-, se encuentra en sitios de corte alternativo, en un codón de inicio o que causan delección de exones en un gen donde la pérdida de función es conocido como causante de enfermedad
Fuerte	PS1	Ya se reportó el cambio de aminoácido (aa) previamente, pero causado por otro cambio de nucleótido. Ej. Val>Leu causado por el cambio de nucleótido G>C y ahora se observa el mismo cambio de aa causado por el cambio G>T
	PS2	Variante <i>de novo</i> y se confirmó maternidad/paternidad
	PS3	Estudios <i>in vivo</i> o <i>in silico</i> que soporten un efecto dañino en el gen
	PS4	La prevalencia de la variante en individuos afectados es significativa comparada con la prevalencia en controles.
Moderada	PM1	La variante se localiza en un "hot spot" o en un dominio funcional importante (ejemplo: en un sitio activo de una enzima)
	PM2	Ausente en controles en las bases de datos de: Exome Sequencing project, 1000 genomas y ExAC
	PM3	En desordenes recesivos: detectada en <i>trans</i> con una variante patogénica
	PM4	Cambia la longitud de la proteína debido a indels
	PM5	Cambio en la secuencia de aa en una posición donde ya se había reportado otro cambio de aminoácido previamente. Ejemplo: R156H ya se reportó y ahora se observa R156C
	PM6	Variante <i>de novo</i> sin confirmar maternidad/paternidad
Sugiere	PP1	Existe cosegregación de la variante con la enfermedad
	PP2	Variante missense en un gen que tiene baja tasa de variación missense y donde las variantes missense son un mecanismo común de enfermedad.
	PP3	Múltiples algoritmos computacionales presentan evidencia de un efecto deletéreo en el gen o producto del gen (conservación, evolución, impacto en procesamiento alternativo etc.)
	PP4	El fenotipo del paciente o la historia familiar es altamente específico para una enfermedad con una etiología genética.
	PP5	Evidencia refutable reciente de que la variante es patogénica pero la evidencia no se ha comprobado en estudios de laboratorios.

La tabla fue traducida al español excepto las siglas que significan: PVS1, “pathogenic very strong” (patogénica muy fuerte); PS1-4, “pathogenic strong” (patogénica fuerte); PM1-6, “pathogenic moderate” (moderadamente patogénica) y PP1-5, “pathogenic supporting” (se sugiere como patogénica).

Tabla 5. Criterios para clasificar variantes benignas

Criterios para clasificar variantes benignas		
Clasificación	Sigla	Definición del criterio
Stand alone	BA1	Frecuencia alélica en Exome Sequencing Project, 1000 genomas y ExAC sea >5%
Fuerte	BS1	Frecuencia alélica más grande que lo esperado en la enfermedad
	BS2	Observada en pacientes sanos en enfermedades con alta penetrancia
	BS3	Estudios in vivo o en silico que muestren evidencien de que no existe efecto dañino en la función de la proteína
Sugiere	BS4	Falta de cosegregación
	BP1	Variante missense en un gen donde las variantes son conocidas de causar enfermedad
	BP2	Observada en <i>trans</i> con una variante patogénica
	BP3	Indels en una región repetitiva que no se conoce su función
	BP4	Múltiples algoritmos computacionales sugieran que no existe impacto en el gen o producto del gen (conservación evolutiva, procesamiento alternativo, etc.)
	BP5	Variante encontrada en un caso con otra forma alternativa molecular de causar la enfermedad
	BP6	Evidencia reciente de que la variante es benigna pero la evidencia no se ha comprobado en estudios de laboratorio
	BP7	Variante silenciosa o sinónima

La tabla fue traducida al español excepto las siglas que significan: BA1, “stand alone of benign” (benigna por sí sola); BS1-4, “strong benign” (fuertemente benigna) y BP1-7, “supporting benign” (se sugiere como benigna).

Tabla 6. Reglas para clasificar las variantes en una categoría

Reglas combinando los criterios para clasificar las variantes	
PATOGÉNICA	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 punto en PVS1 y <ol style="list-style-type: none"> a) ≥ 1 punto en PS1-4 o b) ≥ 2 puntos en PM1-PM6 o c) 1 punto en PM1-PM6 y 1 punto en PP1-PP5 o d) ≥ 2 puntos en PP1-PP5 2. ≥ 2 puntos en PS1-PS4 3. 1 punto en PS1-PS4 <ol style="list-style-type: none"> a) ≥ 3 puntos en PM1-PM6 o b) 2 puntos en PM1-PM6 y ≥ 2 puntos en PP1-PP5 c) 1 punto en PM1-PM6 y ≥ 4 puntos en PP1-PP5
PROBABLEMENTE PATOGÉNICA	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 punto en PVS1 y 1 punto en PM1-PM6 o 2. 1 punto en PS1-PS4 y 1-2 puntos en PM1-PM6 o 3. 1 punto en PS1-PS4 y ≥ 2 puntos en PP1-PP5 o 4. ≥ 3 puntos en PM1-PM6 o 5. 2 puntos en PM1-PM6 y ≥ 2 puntos en PP1-PP5 o 6. 1 punto en PM1-PM6 y ≥ 4 puntos en PP1-PP5
VUS (variante de significado incierto)	Las variantes serán clasificadas en esta categoría si no cumplen los criterios de benigna/patogénica o son contradictorias
PROBABLEMENTE BENIGNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 punto en BS1-BS4 y un punto en BP1-BP7 o 2. ≥ 2 puntos en BP1-BP7
BENIGNA	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 punto en BA1 o 2. ≥ 2 puntos en BS1-BS4

MODELO *IN SILICO*

MODELADO POR HOMOLOGÍA

BÚSQUEDA DE ESTRUCTURA PROTEÍNICA CON MAYOR SIMILITUD

Para estudiar el efecto de las mutaciones sobre la miosina de humano, se requiere contar con la estructura de esta proteína. Se buscó la existencia de la estructura de miosina en la base de datos Protein Data Bank (PDB, rcsb.org). La PDB es una base de datos pública en donde se encuentran todas las estructuras proteínicas que se han resuelto estructuralmente. Por medio de la herramienta “Basic Local Aligment Tool Protein” (BLASTP, por sus siglas en inglés, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se buscó en la base PDB la estructura experimental de una proteína con mayor similitud a la miosina humana. BLASTP además de calcular el porcentaje de similitud (*ident*), calcula el porcentaje de cobertura (*query cover*), el cual es un valor que representa el número de aminoácidos de la secuencia problema que están presentes en la secuencia molde. Ambos valores fueron los criterios de selección para escoger el molde.

Para la búsqueda en BLAST se utilizó la secuencia de miosina humana con un ID de NP_000248.2, la cual se obtuvo de la base de datos de NCBI.

Debido a que la cadena pesada de la miosina presenta múltiples interacciones, el análisis de las variantes se realizó en cuatro modelos diferentes y se seleccionó una estructura molde para cada condición con base en las interacciones y proteínas presentes en el modelo a evaluar (Tabla 7). En el modelo 1 se evaluaron los cambios de interacciones en el hexámero de miosina, en el modelo 2 se evaluaron los cambios de interacciones entre la cabeza de miosina y la actina, en los modelos 3 y 4 se evaluaron los cambios entre el sitio activo del ATP y ADP respectivamente con la cabeza de miosina.

Tabla 7. Características de los moldes utilizados en cada modelo.

Modelo para evaluar cambios en:	ID PDB (molde) y resolución	Interacciones entre proteínas presente	Especie	% cov/ident
1. Interacciones entre el hexámero de miosina humana	1I84; 20 Å.	Hexámero de miosina: 2 CP, 2 CLE y 2 CLR	Pollo	65/48
2. Interacciones entre la cabeza de miosina con actina	5H53; 5.2 Å.	CP y actina	Conejo	43/80
3. Interacciones entre la cabeza de miosina y el sitio activo del ATP	1KQM; 3 Å	CP con un análogo del ATP llamado ANP en su sitio activo.	Molusco	--
4. Interacciones entre la cabeza de miosina y el sitio activo del ADP	5N6A; 3.1 Å	CP con ADP en su sitio activo.	Humano	42/96

CP: cadena pesada; CLE: cadena ligera esencial; CLR: cadena ligera regulatoria

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Al alinear dos secuencias lo que se busca es tener el mayor número de aminoácidos idénticos entre ellas. Cuando las secuencias que se alinean no son totalmente idénticas, se introducen “espacios” o inserciones/delecciones (indels) para que los aminoácidos puedan coincidir paralelamente en la misma posición, esto sucede generalmente en secuencias con un porcentaje de identidad <40% (Fiser, 2003).

Los indels generados en un alineamiento pueden afectar la estructura proteínica al momento de generar el modelo debido a que interrumpen la trayectoria de la cadena principal y de las estructuras de tipo hélice α y hebra β (Moreira, 2008). Si es necesario se deben ajustar los indels de forma manual, evitando que se localicen en estructuras antes mencionadas para no repercutir en la estructura nativa de la proteína problema (Fiser, 2003).

En cada modelo de miosina humana, se alinearon las secuencias y se revisó la existencia de indels, en donde hubo, se localizaron y se realizó un rearrreglo estructural evitando que estuvieran en α -hélices α y asas (conocidos también como loops).

CONSTRUCCIÓN DEL MODELO

Para la construcción del modelo de miosina humana se trabajó con el programa de modelado molecular llamado “Molecular Operating Environment” v.7 (MOE, por sus siglas en inglés). MOE es un programa computacional que permite realizar aplicaciones biológicas como visualizar y analizar una proteína y su interfase, “docking” de interacciones proteína-proteína, analizar propiedades de proteínas, ingeniería de proteínas, exploración de rotámeros y mutaciones, analizar y editar secuencias y realizar modelados moleculares (Chemical-Computing-Group, 2017).

Los modelos de PBD contienen coordenadas cartesianas, obtenidas experimentalmente, de cada átomo de los aminoácidos presentes en la secuencia de la proteína, el programa MOE ubica la posición de cada uno y obtiene una imagen tridimensional de la secuencia (Moreira, 2008). Cuando la proteína que se analiza está compuesta por más de una proteína (dímeros, trímeros, hexámeros, etc.) se presenta la secuencia de cada proteína por separado (llamadas cadenas) y en la representación tridimensional se ensamblan todas las cadenas para formar la estructura completa.

La creación de un MPH está dividida en 2 secciones con parámetros modificables para crear el modelo de acuerdo con las necesidades o características con la cual se desea el modelo final. En general, lo que se busca es la construcción de un nuevo modelo a partir del alineamiento entre la secuencia de la proteína problema y la estructura de la proteína molde.

La primera sección es llamada “modelos y moldes” y “loop dictionary”. Aquí se seleccionan las cadenas que se van a cambiar a partir de la cadena molde. También, permite seleccionar cadenas como “ambiente”, en donde en términos del MPH, se define como moléculas presentes ajenas a la proteína como solventes, ligandos o interacciones cuaternarias, las cuales deben tomarse en cuenta al momento de hacer el modelo para asemejarlo lo más posible a lo real (Fiser, 2003). Al seleccionar cadenas como ambiente, significa que su secuencia de aminoácidos no se va a cambiar por otra, pero la posición de cada átomo (y por consecuencia de cada aminoácido) se va a respetar y se harán presentes durante la creación del modelado y la nueva estructura tridimensional se formará en torno a ellas.

En la siguiente tabla (Tabla 8) se menciona por cada condición las secuencias molde que se cambiaron y las secuencias que se seleccionaron como ambiente.

Tabla 8. Secuencias molde de cada condición y la secuencia por la que se cambió, las secuencias que se tomaron como ambiente.

Tipo de modelo	Secuencia molde	Secuencia por la que se cambio	Secuencia tomada como ambiente.
1	CPM pollo 1	CP humana NP_000248.2	CLR pollo
	CPM pollo 2		
	CLE pollo 1	CLE humana NP_000249.1	
	CLE pollo 2		
2	CPM conejo	CP humana NP_000248.2	Secuencia actina
3	CPM molusco	CP humana NP_000248.2	ANP
4	Ya es de humano, no se hizo MPH		

CPM: cadena pesada de miosina; CLE: cadena ligera esencial; CLR: cadena ligera regulatoria

Adicionalmente en esta sección, se encuentra una opción para escoger cuantos modelos diferentes se desean crear. Al momento de empezar a crear un modelo, lo primero que se construye es la trayectoria de la cadena principal (N, C- α , C, O, C- β) y posteriormente las cadenas laterales. Para poder construir y colocar las cadenas laterales, existen bibliotecas de rotámeros que incluyen, para cada aminoácido, una lista de las combinaciones de ángulos diedros que se observan con más frecuencia en la naturaleza y en cada posición se introduce el rotámero para que todas las cadenas

laterales puedan acomodarse en la estructura del modelo (Davey, 2015); y eso es lo que hace diferente a cada modelo que se genera, ya que cada uno contiene diferentes posiciones de rotámeros.

Al final, MOE realiza un modelo adicional llamado “modelo refinado”, que consiste en seleccionar el mejor modelo de todos los anteriores y realiza un proceso de “minimización de energía”. Este proceso es muy importante porque al momento de agregar rotámeros, la cadena principal se ve modificada, lo cual, afecta el empaquetamiento de las cadenas laterales y se alteran los ángulos de torsión, se generan errores estereoquímicos, impedimentos estéricos e interacciones desfavorables. En la minimización de la energía se modifican los rotámeros de tal forma que se eviten los “choques estéricos” en las coordenadas del modelo (Davey, 2015).

En el modelado de las 4 condiciones de miosina se utilizaron las bibliotecas de rotámeros que contiene el paquete de MOE y por cada condición se pidió que se realizaran 15 modelos y el mejor de ellos se refinó por minimización de energía (el modelo 16) y fue el que se tomó como modelo final.

La siguiente sección es llamada “refinamiento del modelo”. En esta sección se establecen los parámetros de “RMS gradient” y el campo de fuerza con el cual se creará el MPH. El “RMS gradient” es la abreviatura de las palabras en inglés “root-mean square” el cual, calcula la raíz de la desviación cuadrática media entre posiciones de 2 átomos de dos estructuras diferentes y da una correlación entre la similitud estructural de dos proteínas (Baker, 2001; Zemla, 2003). En otras palabras, este valor mide el número total de átomos cuya distancia entre la estructura del molde y la que se está modelando se encuentran bajo un cierto límite de distancia establecido. Para que un MPH se considere preciso, deben de tener un valor de RMS $<1 \text{ \AA}$ (Baker, 2001). En el caso del MPH de cada condición, se calcula este valor entre cada átomo del molde y su correspondiente en el modelo que se está creando y se ajustó a un valor de RMS de 0.02.

El campo de fuerza se utiliza para realizar cálculos de energía que pretenden capturar las interacciones interatómicas que son responsables de la estabilidad de una proteína. La energía que proporciona es la potencial y se calcula a través de la sumatoria de la energía provocada por las interacciones no covalentes (suma total de energía electrostática y de van der Waals VDW) y covalentes (suma total de energía de enlace, energía de ángulo y energía diédrica) (Leach, 2001).

Existen diferentes campos de fuerza en MOE y el utilizado para realizar cada MPH fue CHARMM27, el cual, se encuentra parametrizado para proteínas que se encuentran en interacción con DNA, RNA o lípidos.

MODELADO DE MUTANTES

El programa MOE permite la creación de mutaciones de cambio de aminoácidos en la secuencia de una proteína. Esta opción permite crear un modelo tridimensional para evaluar y predecir los cambios que dicha mutación esté generando.

Una vez que se obtuvo el modelo final para cada condición (se consideró como modelo silvestre WT), se creó un MPH de cada variante, tomando ahora como modelo molde el modelo silvestre.

Para la condición 1, el hexámero de miosina, se realizaron 6 de las 9 mutantes (N479S, R719W, G741R, A797T, S842N y D928N) debido a que la secuencia molde sólo está resuelta hasta el aminoácido 942. Para las condiciones 2, 3 y 4 se realizaron modelos de las 3 mutantes que están en la cabeza (N479S, R719W, G741R).

ANÁLISIS DE MODELOS

CAMBIOS EN LAS INTERACCIONES

Para medir los cambios de interacciones en la proteína, se utilizó un programa en línea llamado PDBsum (www.ebi.ac.uk/pdbsum), el cual, es una base de datos pública que analiza molecularmente estructuras presentes en la base de datos de PDB o modelos con formato “.pdb”. PDBsum calcula el área de contacto en Å² que existen entre estructuras proteínicas, el número de interacciones electrostáticas, de van der Waals (VDW) y puentes de hidrógeno presentes en esa superficie de contacto.

Para saber el efecto que genera cada variante, se midieron dichos parámetros en el modelo silvestre y en cada mutante. En la figura 13 se muestra como ejemplo la comparación entre el modelo silvestre (hexámero de miosina) y el modelo con la variante N471S. En él, se representa, en forma de círculos, las dos cabezas globulares, el área de interacción entre ellas y el número de interacciones presentes. Posteriormente, se muestra cada aminoácido que hace contacto entre las cabezas y además el tipo de enlace. Se realizó lo mismo para cada variante. Por medio del programa de Microsoft Office Excel se calculó el cambio (delta Δ) entre el modelo silvestre y cada variante.

CAMBIOS EN ENERGÍA

Para complementar el análisis de los cambios generados por las variantes, también se calculó el valor total de la energía en cada tipo de interacción entre dos cadenas. Este valor se puede calcular a través de MOE en una función llamada “potential energy”. De esta forma, en una opción que llama “SLV command” se calcula la energía presente en las interacciones de VDW y electrostáticas entre las interacciones de dos cadenas.

Nuevamente se calcularon dichos valores en el modelo WT y en cada variante y se calculó el porcentaje de cambio en Excel.

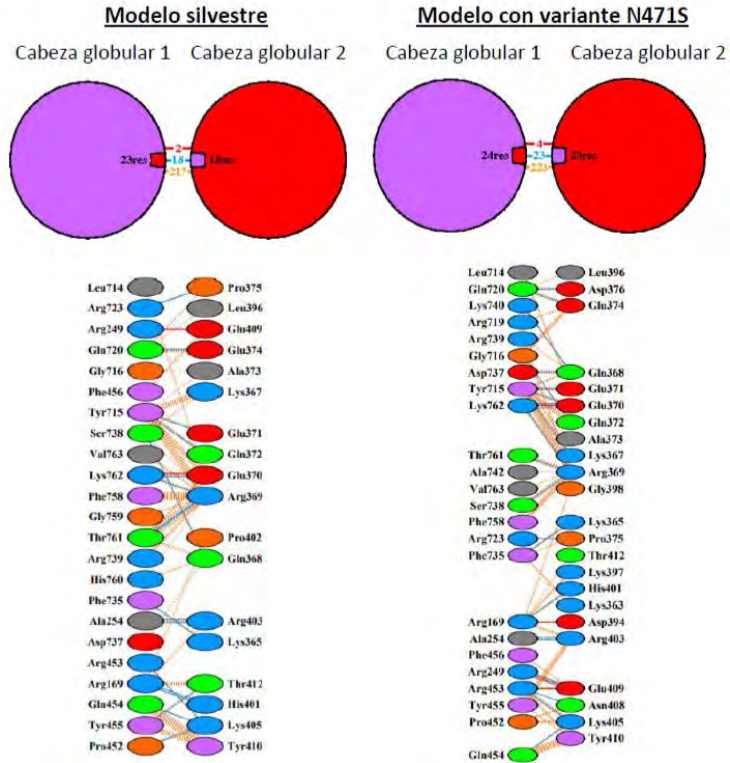


Figura 13. Comparación de área y número de interacciones entre modelo silvestre y la variante N479S. De color rojo se representan los puentes electrostáticos, en amarillo los puentes de disulfuro, en azul los puentes de hidrógeno y en naranja las interacciones de Van der Waals.

RESULTADOS

ANÁLISIS GENÉTICO

En la tabla 9 se presentan los datos clínicos de los 9 casos índice (CI) y familiares diagnosticados con CMH. Todos los individuos tienen un grosor del septum mayor de lo normal (>12 mm), las familias 5 y 8 presentan hipertrofia severa con un grosor de 29 mm a excepción del CI de la familia 3 que presenta un grosor de 9.9 mm menor a lo normal. Adicionalmente los CI de las familias 1, 6 y 9 presentan arritmias.

Tabla 9. Tabla de datos clínicos de cada individuo diagnosticado con CMH

Familia variante	CI/ o familiar	Edad dx/ actual	Ecocardiograma		ECG
			Grosor septum (mm)	%FEVI	Arritmia
1.N479S	CI	66/71	27	62	Si
2.R719W	CI	29/33	24	79	No
3.G741R	CI	06/47	9.9	31	No
	II-1	50/65	24	73	No
	II-6	45/49	14	66	No
4.A797T	CI	55/59	22	48	No
5.S842N	CI	04/64	29	55	No
6.D928N	CI	52/67	19	76	Si
7.R1050P	CI	64/72	23	64	Si
8.T1351M	CI	15/23	29	70	No
9.A1379T	CI	02/43	21	50	No
	III-1	14/12	13	63	No

ECG: electrocardiograma; CI: caso índice; FEVI: fracción de eyección; DAI: desfibrilador automático implantable; CI: caso índice; dx: diagnóstico.

TIPO DE HERENCIA

En la tabla 10 se encuentra el tipo de herencia de cada familia de acuerdo a la presencia o ausencia de la variante en los familiares analizados. La familia 1 es un caso único por lo que no se puede determinar el tipo de herencia, las familias 2, 3, 4, 5, 6 y 7 son casos familiares con un tipo de herencia autosómico dominante.

Tabla 10. Tipo de Herencia

Familia	Mutación caso único/familiar	Tipo de herencia	Cosegregación
1	Caso único	-	-
2	Familiar	AD	-
3	Familiar	AD	Si
4	Familiar	AD	-
5	Familiar	AD	-
6	Familiar	AD	-
7	Familiar	AD	Sí
8	Familiar	AD	--
9	Familiar	AD	Si

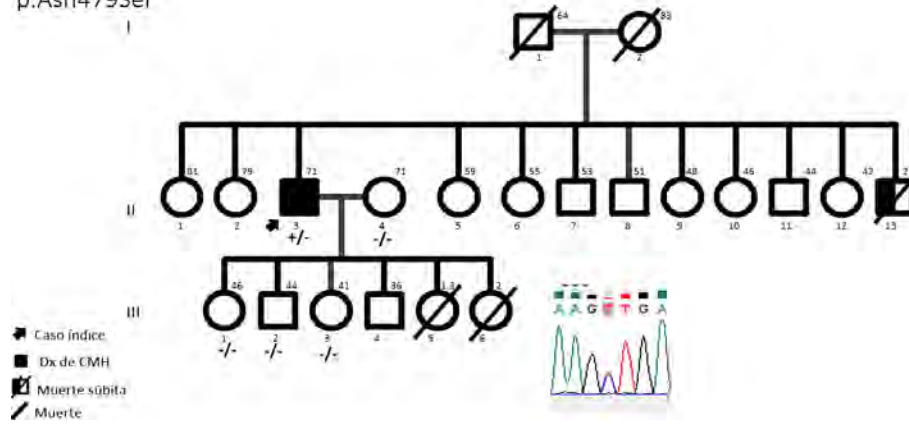
AD: autosómica dominante

ANÁLISIS DE COSEGREGACIÓN

Los resultados del análisis molecular y estudios de ecocardiografía se muestran a continuación. Cada uno de los 9 casos índice (CI) han sido diagnosticados con CMH y son portadores en estado heterocigoto de una variante diferente en el gen *MYH7*, lo cual genera un cambio de aminoácido en la cadena pesada de β -miosina. Los datos de localización de nucleótido y aminoácido de cada variante, encontrada por familia, se localizan en la esquina superior izquierda de la genealogía familiar. Cada familiar analizado por secuenciación SANGER presenta la siguiente simbología: “+/-” portadores heterocigotos y “-/-” individuos negativos a portar la variante. Se analizó molecularmente a cada esposo/a de cada CI como control negativo debido a que, al no ser familiares, no tienen probabilidad de portar la variante.

Familia 1

rs727504236
g.12020A>G
p.Asn479Ser

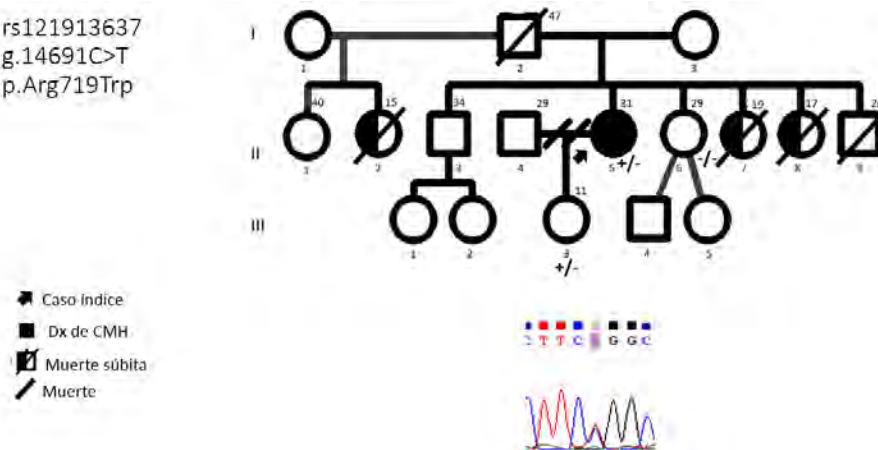


Familia 1. Árbol genealógico

Como antecedentes familiares relacionados con la CMH, existe un caso de muerte súbita en un familiar a los 2 años. No existen datos suficientes para concluir si existe o no cosegregación. Se necesitaría encontrar un portador y enfermo de CHM en los hijos y hace falta el estudio de ecocardiograma de cada familiar analizado para conocer el estado clínico.

Familia 2

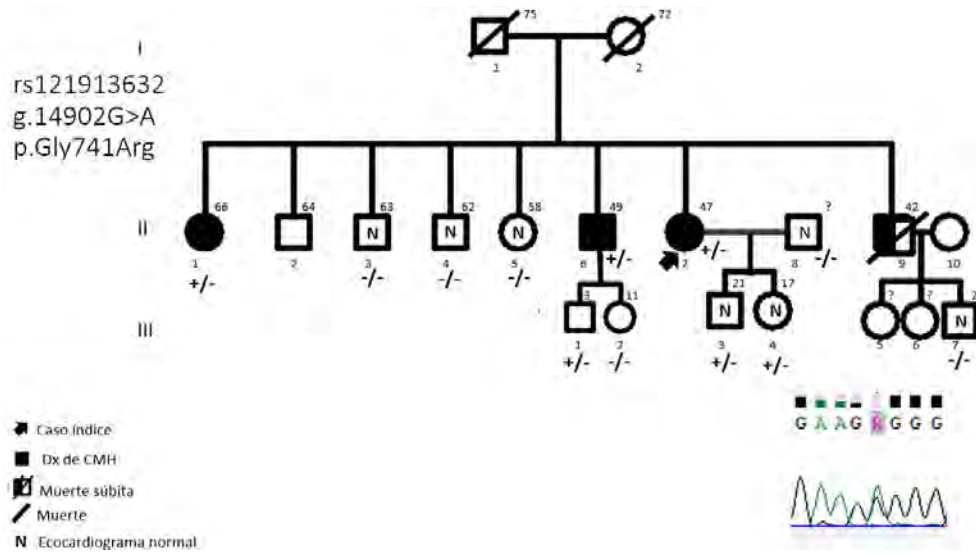
rs121913637
g.14691C>T
p.Arg719Trp



Familia 2. Árbol genealógico

La familia 2 presenta tres casos de muerte súbita en mujeres jóvenes, eso explica porque al caso índice se le colocó un DAI sin presentar arritmias. La variante se heredó en la hija del CI, sin embargo, hace falta estudio ecocardiográfico para completar el análisis de cosegregación. Es importante recordar la expresividad variable que tiene la enfermedad explica porque hasta el momento la hija del CI es asintomática, pudiendo presentar la enfermedad y alguna sintomatología en edad más avanzada. Se recomienda mantenerse bajo observación médica. También, puede ser un caso de penetrancia incompleta.

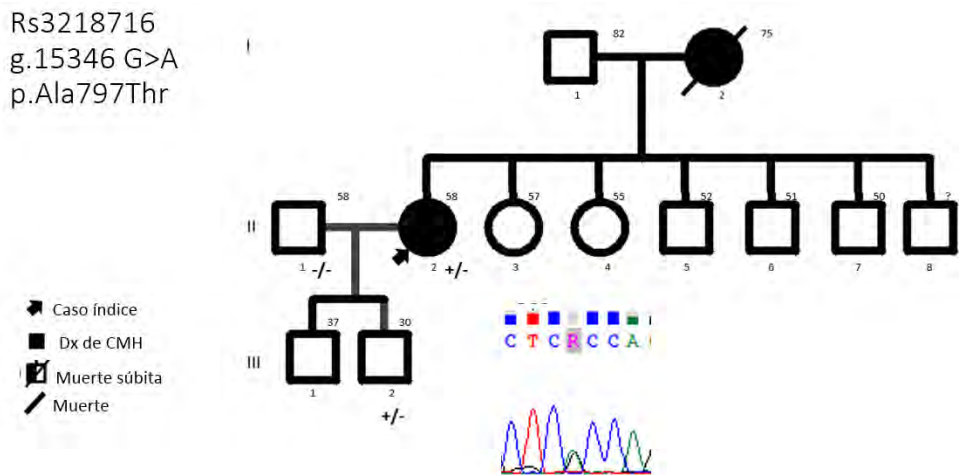
Familia 3



Familia 3. Árbol genealógico

En la familia 3 existe cosegregación, la variante se encuentra presente en individuos diagnosticados con CMH y ausente en los adultos sanos. Los hijos del CI resultaron ser clínicamente normales, sin embargo, por ser portadores de la variante y debido a la expresividad variable de la enfermedad podría desarrollar posteriormente la enfermedad. El caso índice ahora presenta dilatación con un grosor de septum de 9.9 mm.

Familia 4

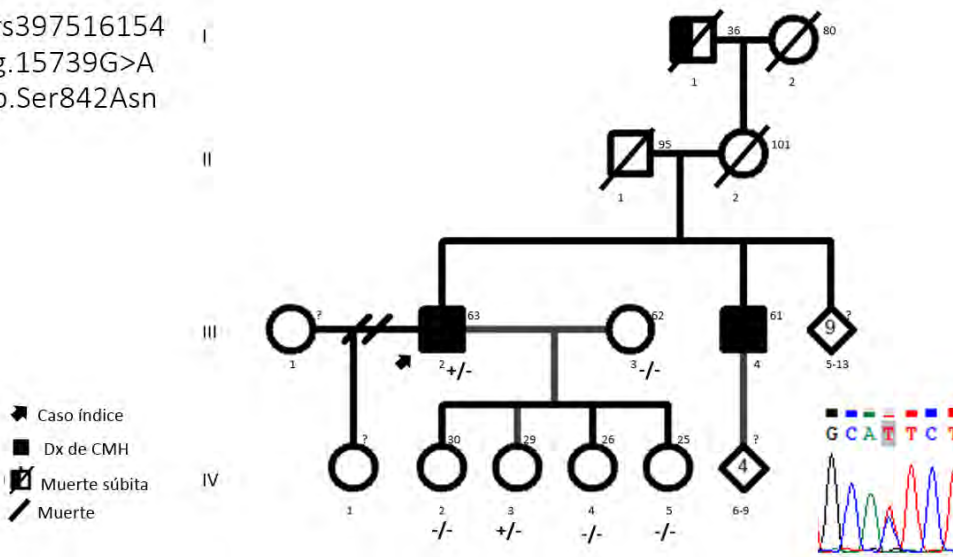


Familia 4. Árbol genealógico

Como antecedente familiar, la madre (fallecida) del CI fue diagnosticado CHM. La variante fue heredada en el hijo del CI, sin embargo, falta el estudio ecocardiográfico para confirmar la cosegregación.

Familia 5

rs397516154
g.15739G>A
p.Ser842Asn

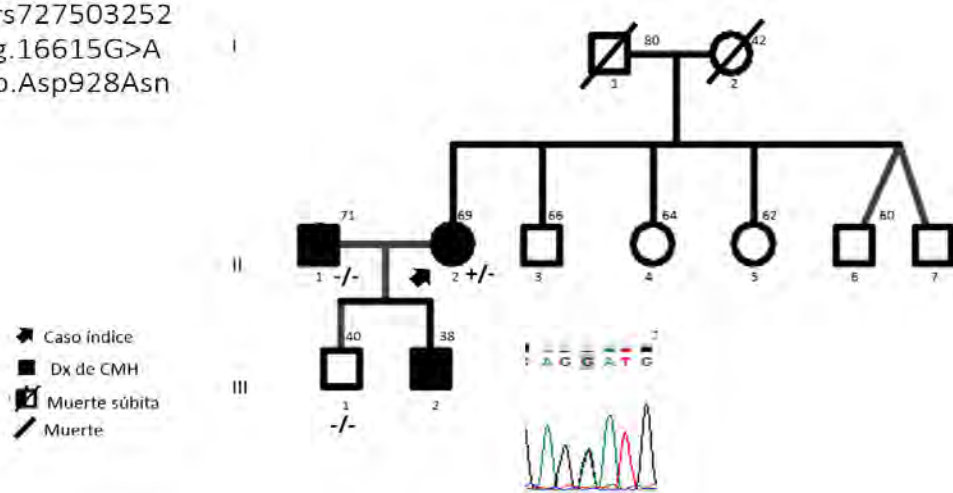


Familia 5. Árbol genealógico

Como antecedentes familiares de CMH, el abuelo del CI falleció por muerte súbita y el hermano del CI presenta CMH. La variante se heredó en una de las 4 hijas analizadas. Para confirmar cosegregación falta el estudio ecocardiográfico de ellas, esperando encontrar diagnóstico de CMH en la hija portadora de la variante y un diagnóstico normal en las no portadoras.

Familia 6

rs727503252
g.16615G>A
p.Asp928Asn

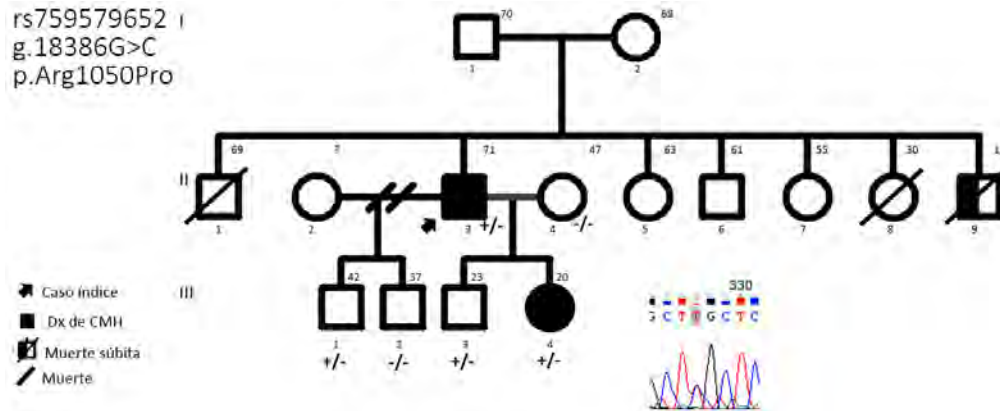


Familia 6. Árbol genealógico

No existen antecedentes familiares relacionados con CMH. El esposo del CI fue diagnosticado con CMH y es negativo a portar la variante del CI, lo cual era un resultado esperado debido a que al no ser familiar del CI posiblemente ha de tener una variante diferente. El hijo mayor del CI es negativo

a la variante. Para completar el análisis de cosegregación hace falta el estudio ecocardiográfico del hijo negativo a la variante y el estudio molecular del hijo menor que ya fue diagnosticado con CMH.

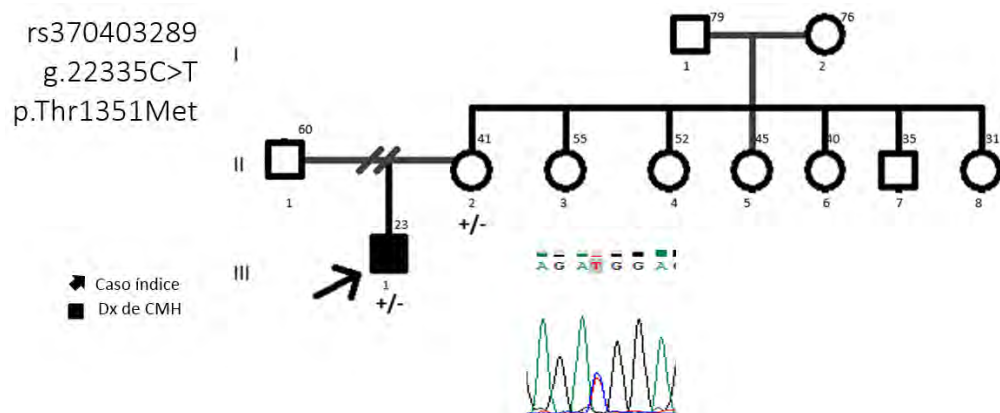
Familia 7



Familia 7. Árbol genealógico

Existe un antecedente de muerte súbita en un hermano del CI a los 19 años, lo cual explica porque al CI se le colocó un DAI sin presentar arritmias. La variante se heredó en 3 de los 4 hijos analizados, uno de ellos fue diagnosticado con CMH, lo cual puede sugerir cosegregación.

Familia 8



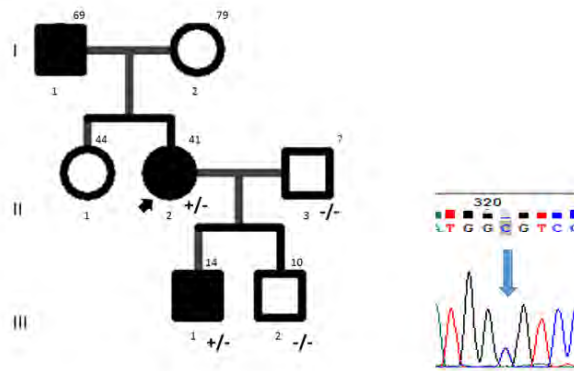
Familia 8. Árbol genealógico

No existen antecedentes familiares de CMH o muerte súbita en la familia. La variante se encontró en la madre del CI. Falta el estudio ecocardiográfico para confirmar cosegregación.

Familia 9

rs397516202
g.22418G>A
p.Ala1379Thr

◄ Caso índice
■ Dx de CMH



Familia 9. Árbol genealógico

Como antecedentes familiares, el padre del CI fue diagnosticado con CMH. El hijo mayor, diagnosticado con CMH es portador de la variante y el hijo menor, aparentemente sano, es negativo. Estos datos pueden sugerir que existe cosegregación.

PATOGENICIDAD/BENIGNIDAD DE VARIANTES

Se analizaron las frecuencias de cada una de las variantes en las bases de datos de ExAC y 1000 genomas, además se verificó la información clínica existente para cada variante en el predictor ClinVar y por 3 predictores funcionales: SIFT, Polyphen y Mutation taster. Los resultados se muestran en la tabla 11. De las 9 variantes solo A797T presentó una frecuencia en individuos sanos del 1%, lo cual sugiere que se trata de un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido). El predictor clínico ClinVar, catalogó a las variantes R719W, A797T Y A1379T como patogénicas; las variantes G741R y D928N como probablemente patogénicas y; las variantes N479S, S842N y T1351M como variantes de significado incierto (VUS, por sus siglas en inglés). En los 3 predictores funcionales, existen resultados contradictorios entre ellos, como la variante N479S que Polyphen la reportó como benigna y para SIFT y Mutation Taster es dañina y causante de enfermedad, respectivamente. Lo mismo sucede con la variante T1351M, donde SIFT la reporta como dañina, pero polyphen y Mutation Taster la reportan como benigna y polimorfismo, respectivamente. Las variantes R719W, G741R, S842N, D928N, R1050P y A1379T tienen reporte daño o causante de enfermedad en los 3 predictores y la variante A979T tiene reporte de ser tolerable, benigna y polimorfismo.

Tabla 11. Reportes de frecuencia poblacional, reporte clínico y funcionales de cada variante.

Variante		Datos frecuencia		Predictor clínico	Predictores funcionales		
Familia	Cambio nt/aa	ExAC	1000 genomas	ClinVar	SIFT	Poliphen	Mutation Taster
1	A>G N479S	-	-	Conflictos para definir patogenicidad	Dañina	Benigna	Causante de enfermedad
2	C>T R719W	-	-	Patogénica	Dañina	Probablemente dañina	Causante de enfermedad
3	G>A G741R	-	-	Probablemente patogénica para CMH familiar	Dañina	Probablemente dañina	Causante de enfermedad
4	G>A A797T	Latinos: 1 (8.64e-5)	Mex C:99% T:1%	Patogénica/ Probablemente patogénica	Tolerable	Benigna	Polimorfismo
5	G>A S842N	-	-	VUS	Dañina	Posiblemente dañina	Causante de enfermedad
6	G>A D928N	-	-	Probablemente patogénica	Dañina	Posiblemente dañina	Causante de enfermedad
7	C>G R1050P	-	-	-	Dañina	Probablemente dañina	Causante de enfermedad
8	C>T T1351M	-	-	VUS	Dañina	Benigna	Polimorfismo
9	C>T A1379T	-	-	Patogénica/ Probablemente patogénica	Dañina	Probablemente dañina	Causante de enfermedad

Debido a que no existen datos contundentes para poder concluir si las variantes son patogénicas o benignas, se realizó la categorización de cada una por medio de la guía “Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology” como se mencionó en metodología.

En la tabla 12 se muestra el resultado final de patogenicidad y benignidad. Los datos con el puntaje completo de patogenicidad y benignidad se presentan en el apartado de material suplementario (Tabla sup. 1 y 2). De acuerdo a la tabla de puntaje se determinó para cada variante si es patogénica (P), probablemente patogénica (PP), probablemente benigna (PB) o benigna (B). Al final, se compararon ambos resultados de patogenicidad y benignidad. Las variantes patogénicas son N479S, R719W, G741R, D928N, R1050P y A1379T; la variante S842N es probablemente patogénica; A797T es variante de significado incierto y T1351M resultó ser probablemente benigna.

Tabla 12. Resultado de patogenicidad/benignidad de cada variante

	N479S	R719W	G741R	A797T	S842N	D928N	R1050P	T1351M	A1379T
Conclusión P	P	P	P	P	PP	P	P	--	P
Conclusión B	--	--	--	PB	--	--	--	PB	--
FINAL	P	P	P	VUS	PP	P	P	PB	P

P: patógena; PP: probablemente patógena; PB: probablemente benigna; VUS: variante de significado incierto

MODELO *IN SILICO*

Se muestra una figura de los diferentes niveles de organización de la cadena pesada de miosina. Se observan los 40 exones que codifican para la proteína, los dominios de interacción con otras proteínas, la localización de las 9 variantes en estudio y un esquema que muestra la estructura cuaternaria (Figura 14).

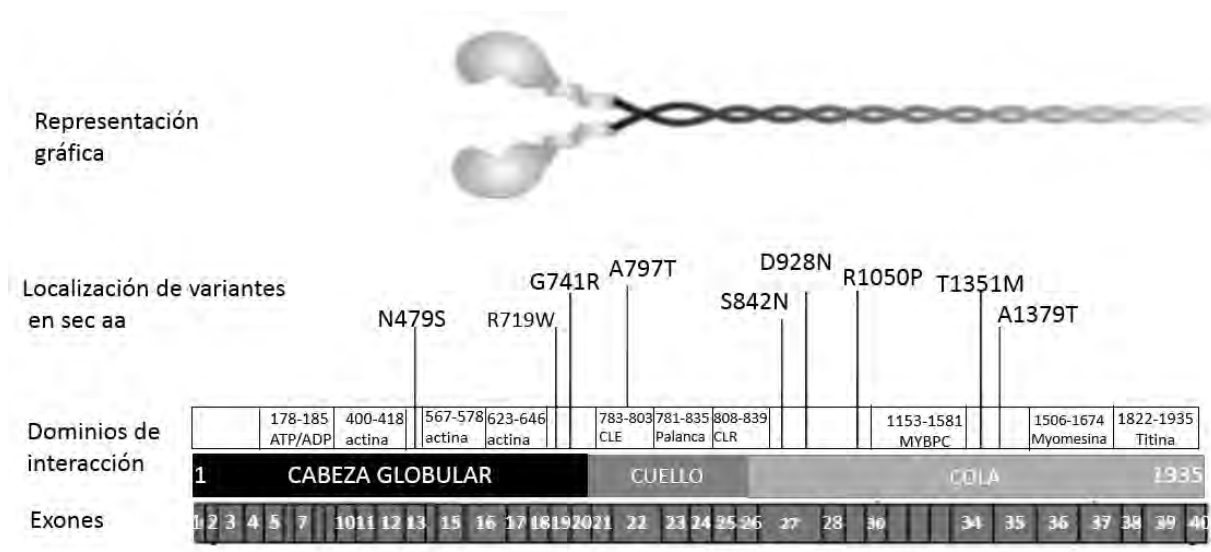


Figura 14. Organización de las cadenas pesadas de miosina desde los exones hasta la estructura terciaria. Se muestran los dominios de interacción con otras proteínas y la localización de las variantes en estudio.

MODELOS SILVESTRES Y VARIANTES

Se realizaron un total de 19 modelos (Tabla 13) de los cuales, 4 son modelos silvestres y presentan diferentes interacciones: el modelo M1 contiene el hexámero de miosina (Figura 15A), el modelo M2 contiene la cabeza globular de miosina en interacción con actina (Figura 15B), el modelo M3 tiene la cabeza globular de miosina con la presencia de la molécula de ATP (Figura 15C) y el modelo M3 tiene la cabeza globular con la molécula de ADP (Figura 15D). 6 modelos son de las variantes N479S, A797T, R719W, S842N, G741R y D928N creados a partir de la estructura M1. Los 9 modelos restantes son de las variantes que se localizan en la cabeza (N479S, R719W, G741R) y fueron

realizados a partir de las estructuras M2, M3 y M4. Las variantes R1050P, T1351M y A1379T no tienen modelo debido a la falta de estructura molde.

Tabla 13. Modelos realizados. Cada renglón corresponde a un modelo silvestre (M1 a M4) con tres o más modelos mutantes (última columna) para un total de 19 modelos estructurales

Modelo	Proteínas presentes	Variantes modeladas
M1	Hexámero de miosina: 2 cadenas pesadas, 2 cadenas ligeras esenciales, 2 cadenas ligeras regulatorias	N479S, A797T, R719W, S842N, G741R, D928N
M2	Una cadena pesada de miosina, actina, una cadena ligera esencial y una cadena ligera regulatoria	N479S, R719W, G741R
M3	Cabeza globular de cadena pesada y molécula de ATP	N479S, R719W, G741R
M4	Cabeza globular de cadena pesada y molécula de ADP	N479S, R719W, G741R

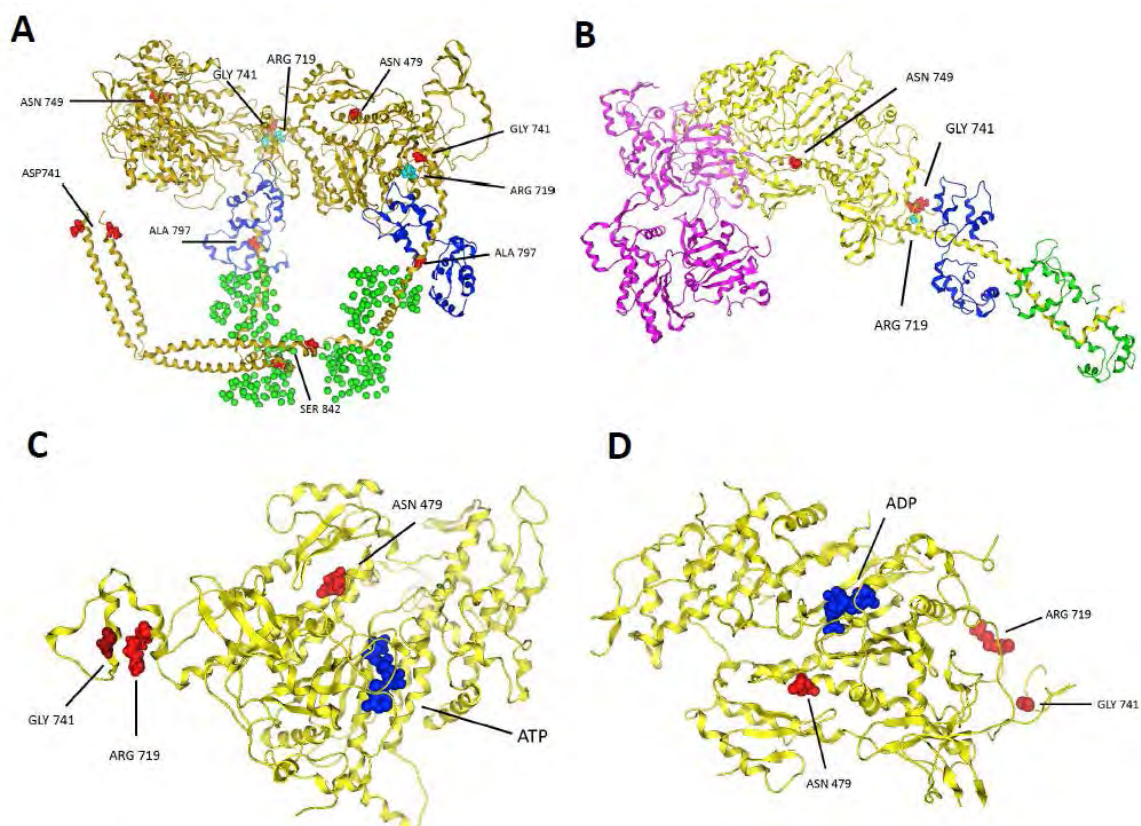


Figura 15. Localización de los residuos que presentan una mutación en cada modelo silvestre. A) M1: hexámero de miosina: dos cadenas pesadas en color amarillo, 2 cadenas ligeras esenciales en color azul y las dos cadenas ligeras regulatorias en color verde. En rojo y turquesa se muestran las variantes. B) M2: actina con miosina: en amarillo la cadena pesada de miosina, en azul la cadena ligera esencial y en verde la cadena ligera regulatoria. C) y D) M3 y M4 respectivamente, en color amarillo se encuentra la cabeza globular de la cadena pesada, en azul la molécula de ATP y ADP respectivamente y en rojo la localización de los residuos.

ANÁLISIS DE MODELOS

En la tabla 14 se presentan, los cambios (Δ) en energía, áreas de contacto y número de interacciones. Los resultados completos de los valores obtenidos se encuentran en la sección de material suplementario.

Tabla 14. Resultados generados para las variantes en cada condición

Modelo de estudio	Variante	Δ Energía kcal/mol	Δ área de contacto Å^2	Δ # interacciones	Resultado del modelo
Hexámero de miosina (M1)	1.N479S	-183	12	6	Aumenta la interacción entre las dos cabezas globulares de cada cadena pesada
	2.R719W	-204	12	17	
	3.G741R	-143	-3	19	
	4.A797T	-123	6	14	Aumentan las interacciones entre la cadena pesada y la cadena ligera esencial
	5.S842N	20	-8	-11	Disminuye la interacción entre cadenas pesadas en cola
	6.D928N	-174	-8	-50	Aumenta la interacción entre las cadenas pesadas en la cola
Cabeza globular de la CP con actina (M2)	1.N479S	-66.7	7.6	7.6	Aumenta la interacción de la cabeza globular con la actina
	2.R719W	-71.8	8.2	8.9	
	3.G741R	-68.7	13.6	16	
Cabeza globular de la CP con molécula ATP (M3)	1.N479S	-538.3	--	1	Aumenta la interacción de la cabeza globular con el ATP
	2.R719W	-557.3	--	4	
	3.G741R	-543.1	--	-8	
Cabeza globular de la CP con molécula ADP (M4)	1.N479S	-20	--	-8	Sin cambios detectados
	2.R719W	-5.8	--	-8	
	3.G741R	-17.8	--	-10	

CP: cadena pesada

Cambios en interacciones entre el hexámero de miosina

Las variantes N479S, R719W y A797T que se encuentran en la cabeza aumentan la interacción entre las dos cadenas pesadas (ver figura 16 A, B y C, respectivamente). La variante A797T, aumenta la interacción con la cadena ligera regulatoria esencial (ver figura 16 D); las variantes S842N y D928N se localizan en la cola de la cadena pesada, generando una disminución y aumento, respectivamente, entre el súper enrollamiento de las colas de miosina (ver figura 16 E y F, respectivamente). Las variantes R1050P, T1351M y A1379M no se modelaron debido a que la miosina molde sólo está resuelta hasta el residuo 932.

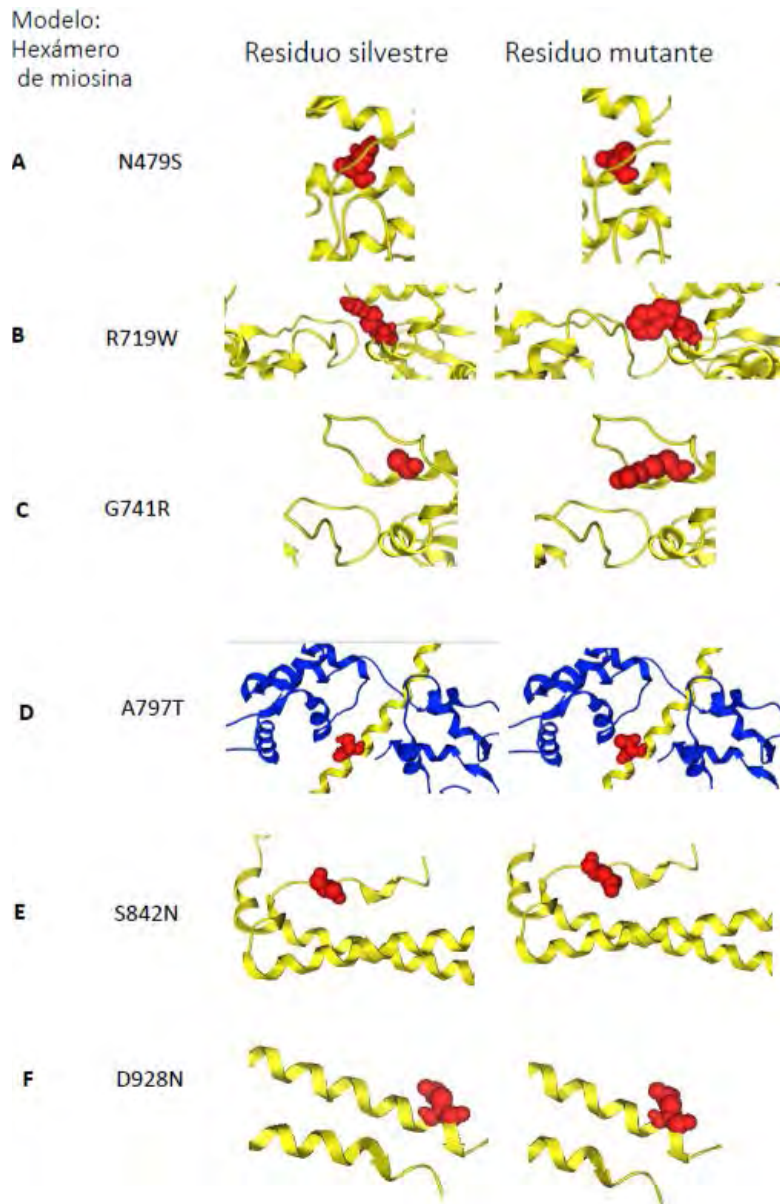


Figura 16. Modelos para evaluar las diferencias de interacciones entre el hexámero de la miosina silvestre y las variantes. En color amarillo se encuentra la cadena pesada de la miosina. En color azul se encuentra la cabeza ligera esencial. En rojo el residuo que se quiere mostrar.

Cambios en las interacciones entre la cadena pesada de miosina y el filamento de actina

Se modelaron las 3 variantes que se localizan en la cabeza, estas son N479S, R719W y A797T. Las tres variantes generaron un aumento de interacción con actina (ver figura 17 A, B y C, respectivamente).

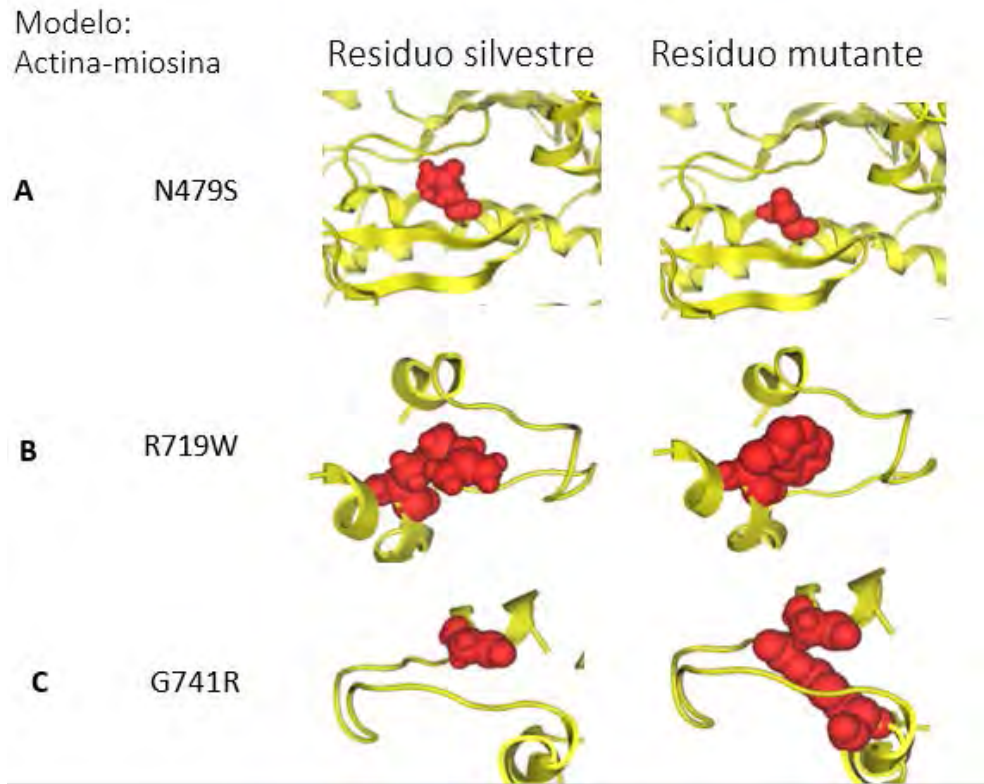


Figura 17. Modelos para evaluar las diferencias de las interacciones entre la cabeza globular de la miosina y el filamento de actina entre el modelo silvestre y cada una de las 3 variantes que se localizan en la cabeza. En color amarillo se encuentra la cadena pesada de miosina, en rojo es el residuo que se quiere mostrar.

Cambios en interacciones entre la cadena pesada de miosina y la molécula de ATP

Las 3 variantes localizadas en la cabeza N479S, R719W y A797T generaron un aumento en la interacción con ATP (ver figura 18A, B y C, respectivamente).

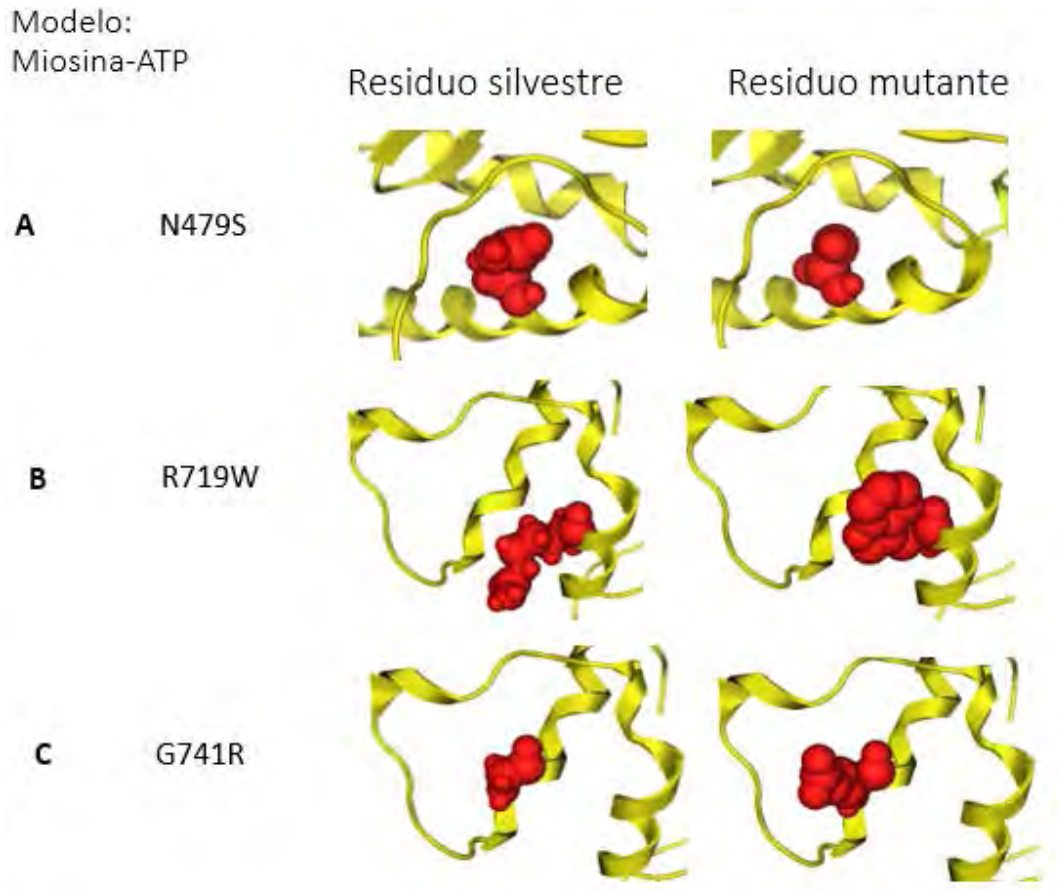


Figura 18. Modelos para evaluar las diferencias de interacciones entre la cabeza globular la miosina y la molécula de ATP entre el modelo silvestre y cada una de las 3 variantes que se localizan en la cabeza. En color amarillo se encuentra la cadena pesada de miosina. En rojo es el residuo que se quiere mostrar.

Cambios en interacciones entre la cadena pesada de miosina y la molécula de ADP

Las 3 variantes localizadas en la cabeza N479S, R719W y A797T no presentaron cambios en cuanto al aumento de interacción con la molécula de ADP (ver figura 19 A, B y C, respectivamente).

Modelo:
Miosina-ADP

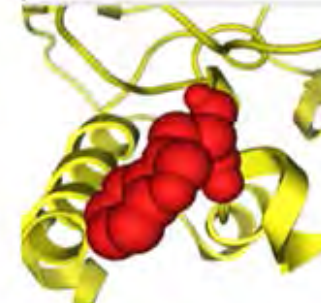
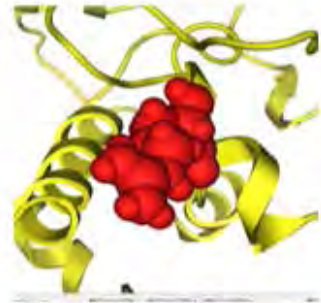
Residuo silvestre

Residuo mutante

A N479S



B R719W



C G741R



Figura 19. Modelos para evaluar las diferencias de interacciones entre la cabeza globular de la miosina y la molécula de ADP entre el modelo silvestre y cada una de las 3 variantes que se localizan en la cabeza. En color amarillo se encuentra la cadena pesada de miosina. En rojo es el residuo que se quiere mostrar.

DISCUSIÓN

Las variantes N479S, R719W y G741R presentaron, en el modelado por homología, un aumento de interacción: tanto entre las dos cabezas de miosina, como entre la cabeza y la actina además de un aumento de afinidad con la molécula de ATP. Estos datos sugieren que para realizarse el ciclo de contracción-relajación, se necesitaría un mayor gasto energético, resultado que coincide con lo reportado en un estudio experimental previo de la variante R719W, realizado por Seebohm y cols. en donde encontraron un aumento en la actividad de ATPasa en cada cabeza de miosina, en una fibra muscular de un paciente con CMH. En la parte clínica, las tres variantes han sido encontradas en cohortes de diferentes poblaciones en pacientes enfermos con CMH. Un dato interesante es que en la familia con la variante R197W existieron 3 casos de muerte súbita en hermanas del caso índice a los 15, 17 y 19 años. Estos datos van en el mismo sentido con un estudio reportado en 1994 por Anan y colaboradores en donde confirman una reducción significativa ($P < 0.001$) en la expectativa de vida, con una vida media de 38 años en los portadores de esta variante.

En la familia con la variante A797T, no se puede concluir con la información que se tiene hasta el momento si la variante cosegrega con la enfermedad, pero desde 1995 ha sido encontrada en diferentes poblaciones en pacientes con CMH. La variante presenta una frecuencia del 1% en latinos (ExAC) y en mexicanos (1000 genomas) por lo que se sugiere que puede tener un efecto modificador en el desarrollo de la enfermedad por su alta frecuencia. La variante presentó un aumento de interacción entre la cadena pesada y la cadena ligera esencial, lo que sugiere que podría afectar la fuerza de la contracción, ya que este dominio se encarga de intensificar los movimientos generados por la cabeza. En cuando al aumento de interacción con a CLE, podría generar como consecuencia un aumento de interacción con actina, (ya que esa es la función de la CLE, estabilizar unión actina-miosina) y afectar el ciclo contracción-relajación.

En el modelo *in silico* de la variante S842N encontramos una disminución en la interacción entre las colas de miosina, esto debido a su localización, ya que se encuentra en una posición a de los dominios heptad, y al cambiar la serina por asparagina, se puede ver afectada la formación de la α -hélice super enrollada debido que es un aminoácido hidrofílico. Esta variante, a pesar de tener rs no ha sido estudiada ni desde el punto de vista funcional ni del clínico.

En el estudio de la variante D928N encontramos un aumento de interacción entre las dos colas de miosina, el cambio generado es un aminoácido con carga negativa por uno sin carga y como la variante se localiza en una posición c de los dominios heptad, se sugiere que se podrían generar nuevas interacciones compensatorias y explicar el aumento de interacción obtenido en el modelo.

Para las variantes R1050P, T1351M y A1379T no fue posible realizar un modelo debido a una falta de estructura base, pero su localización en la cola se sugiere que también podrían afectar la interacción entre los dominios heptad que unen las dos cadenas. La variante R1050P se localiza en la posición f y se genera un cambio de un aminoácido hidrofílico, positivo y grande (arginina) por uno clasificado como especial o alifático (prolina). La prolina es un aminoácido que normalmente no se encuentra en estructuras de colas super enrolladas debido a que forma “curvas cerradas” en la estructura de α -hélice y es incompatible con la formación de la estructura de cola super enrollada. Este cambio de R1050P puede generar, además de la ruptura de la estructura local de α -hélice super

enrollada en la cola, romper estabilidad provocando cambios compensatorios dentro del cardiomiocito, generando un agregado de miosinas fuera del sarcómero, y como consecuencia debilidad muscular.

Las variantes T1351M y 1379T se encuentran en una posición e y en ambas se genera un cambio de un aminoácido polar sin carga a un aminoácido hidrofóbico. Estos cambios pueden afectar la formación de α -hélice super enrollada y generar cambios estructurales y de estabilidad en la cola debido a que en la posición "e" deben estar aminoácidos apolares. La variante A1379T presentó cosegregación en 2 individuos de la familia analizada. Esto corrobora con dos reportes previos en donde se reportó cosegregación en cohortes de pacientes franceses y estadounidenses.

Las 9 variantes afectan el ciclo de contracción-relajación o la estabilidad de la miosina en el sarcómero. Estos cambios sugieren que se genera un aumento en el estrés y distensión en la fibra, lo cual, activa factores tróficos y la maquinaria transcripcional para aumentar la transcripción de genes y síntesis de proteínas para aumentar el número de sarcómeros causando hipertrofia, es decir, la hipertrofia se genera como mecanismo compensatorio en respuesta al miocito al estrés mecánico y el aumento de la masa contráctil podría compensar el déficit de generación de fuerza generados las mutaciones.

CONCLUSIÓN

La variante N479S es un caso único y no se heredó a los descendientes; las variantes R719W, G741R, D928N, A797T, S842N, R1050P, T135M y A1379T son de tipo familiar, y presentaron un patrón de herencia autosómico dominante.

Al evaluar la patogenicidad/benignidad se concluye que las variantes N479S, R719W, G741R, D928N, R1050P y A1379T son patogénicas; la variante S842N tiene una probabilidad alta de ser patogénica; A797T es variante de significado incierto y T1351M resultó ser probablemente benigna.

En los modelos realizados, las variantes N479S, R719W y G741R presentan un aumento en la interacción de las dos cabezas de miosina, un aumento en la interacción con el filamento de actina y un aumento en la interacción con la molécula de ATP, lo cual afecta el ciclo de contracción-relajación y el gasto energético.

La variante A797 presentó un aumento de interacción entre la cadena pesada de miosina y la cadena ligera esencial. Este cambio podría incrementar el número de miosinas y actinas en interacción, sugiriendo nuevamente la afectación del ciclo de contracción-relajación, generando un mayor gasto energético. Sin embargo, la variante presenta una alta frecuencia en población sana y los predictores la clasifican como benigna o polimorfismo, así que la variante puede que no esté generando el fenotipo por sí sola, o que sea una variante modificadora.

La variante S842N presentó una disminución en la interacción entre las colas de miosina y la variante D928N aumentó la interacción entre las colas de miosina. Los cambios en la cola pueden afectar la estabilidad del hexámero, el ensamble en el sarcómero y la unión a otras proteínas sarcoméricas.

Para las variantes R1050P, T1351M y A1379T no fue posible realizar un modelo debido a una falta de estructura. Sin embargo, estas 3 variantes se localizan en regiones denominadas dominios "heptad" y al existir mutaciones en esta zona se puede alterar la organización de α -hélice super enrollada en la cola de miosina y esto podría tener un impacto en la estabilidad de la proteína.

En conjunto con los resultados de cosegregación, patogenicidad/benignidad, efectos en el modelaje por homología de la proteína y los antecedentes experimentales de cada variante se sugiere que: la variante A797T es benigna y no parece ser causal de la enfermedad, las variantes N479S, R719W, S842N, R719W D928N y T1351M son probablemente causales de la enfermedad y las variantes G741R, R1050P y A1379T son causales de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Daniel Arrese, Alejandro Legaz y Enrique Serrano Ostáriz. (2001). Diferenciación de la hipertrofia cardíaca fisiológica o patológica en deportistas de alto nivel. *Sociedad aragonesa de cardiología*, 6(3).
- Alberts, B. Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. 2004. (2015). *Molecular Biology of the cell*. New , NY : Gardland Science .
- Genetic Alliance, G. (2009). Appendix einheritance patterns. En Genetic Alliance, *Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK115561/> consultado Marzo 2018.
- Asuar, Laura Espinosa Asuar (2014). Guía práctica sobre la técnica de PCR- Las herramientas moleculares. *Guía práctica sobre la técnica de PCR*, 517-539.
- A.D.A.M, E. m. (05 de 07 de 17). *Cámaras del corazón*. (I. N. UU., Editor) Recuperado el 19 de 07 de 17, de https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/19612.htm
- Baker, David, Andrej Sali (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294, 93-96.
- Ballesteros, Carlos A. Delfín Ballesteros y Rodríguez Alvarez Adalberto (2005). Miocardiopatía hipertrófica. *Rev Cub Med Int Emerg*, 4(4), 229-247.
- Bang, ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S. (2001). The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ. Res.*, 89, 1065-1072.
- Barrett, Berne, R.M. & Levy, M.N. (2010) "Fisiología". 13ª Edición. Mosby. NewYork. Ganong, W.F. (1994). "Fisiología Médica". 13ª Edición. K. E. (2010). *Ganong. Fisiología médica* (Vol. 24). CHINA: McGraw-Hill.
- Blankenburg, R. (2014). β -myosin heavy chain variant causes very mild hypertrophic cardiomyopathy in mice, but exarcebates HMC phenotypes in mice carryinf other HMC mutations. *Circ. Resp Autho manuscript*, 115(2), 227-237.
- Blankenfeldt R, Hackert K, Wurster S, Deenen R, Seidman JG, Seidman CE, Lohse MJ, Schmitt JP. (2006). Crystal structures of human cardiac β -myosin II S2- Δ provide insight into the functional role of the S2 subfragment. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(47), 17713–17717.
- Brooks, B. Bernard R. Brooks Robert E. Bruccoleri Barry D. Olafson David J. States S. Swaminathan Martin Karplus (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comp Chem.*, 4(2), 187–217.
- Brugada, J. (1998). Muerte Súbita en la cardiomiopatía hipertrófica. *Revista Española de Cardiología*, Vol. 51 num.12 pp. 991-996.

- Campbell, Stuart G, Andrew D. McCulloch. (2011). Multi-scale computational models of familial hypertrophic cardiomyopathy: genotype to phenotype. *Journal of the royal society. Interface*, (8)5, 1550-1561.
- Castro, García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, Sainz R, Martín M, Morís C. (2009). Mutations in Sarcomeric Genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol*, 62(1), 48-56.
- Chavez, Luis de Jesús Colín Lizalde (2003). Cardiomiopatía hipertrófica: las arritmias en la cardiomiopatía hipertrófica. *Archivos de cardiología de México*, (73), 26-30.
- Chemical-Computing-Group. (2017). *Molecular Operating Environment*. Obtenido de https://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Operating_Environment.htm consultado marzo 2018.
- Chothia, Cyrus, Arthur M. Lesk C. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*, 5, 823-826.
- Cirino, Allison L, Carolyn Ho (2017). Hypertrophic Cardiomyopathy Overview. *NCBI Bookshelf*, 1-20.
- Colegrave, Colegrave, Michelle Peckham. (2014). Structural implications of b-cardiac myosin heavy chain mutations in human disease. *The anatomical record*, 1670-1680.
- Cooley, D. A. (2014). *EL MÚSCULO ESQUELÉTICO*. Recuperado el 17 de Febrero de 2016, de Imagen Diagnóstica y Enfermería. Diagnóstico Clínico y Enfermería: <http://www.needgoo.com/el-musculo-esqueletico/>
- The Texas Heart Institute. (1 de Julio de 2015). *The Texas Heart Institute*. Recuperado el 17 de Febrero de 2016, de The Heartbeat: <http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy/systole.cfm#>
- Cultek. (12 de Marzo de 2018). *Cultek- Aplicaciones*. Obtenido de http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_AN_Purificacion&opc=tecnicas&idap=36
- Davey James, Roberto A Chica (2015). Optimization of rotamers prior to template minimization improves stability predictions made by computational protein design. *PROTEIN SCIENCE*, 24, 545—560.
- Deepa Selvi Rani, Pratibha Nallari, Perundurair S. Dhandapany, Jhansi Rani, Khunza Meraj, Mala Ganesan, Calambur Narasimhan, and Kumarasamy Thangaraj (2015). Coexistence of Digenic Mutations in Both Thin (TPM1). *DNA and cell biology*, 1-10.
- Dumont, Carlos Alberto Dunayevich (Noviembre de 2007). *Federacion Argentina de Cardiología*. Recuperado el 12 de Febrero de 2016, de 5to congreso nacional de cardiología por internet: <http://www.fac.org.ar/qcvc/llave/c167e/dumont.php>
- Berríos Bárcenas, Bustamante Palacios E, Alexanderson Rosas, Barrero Laínez-Zelaya, Meave-González. Características morfológicas de la miocardiopatía hipertrófica en la resonancia magnética (2014). *Anales de Radiología México*, (13), 94-102.
- Elliot, Perry, Bert Andersson, Eloisa Arbustini, Zofia Bilinska, Franco Cecchi, Philippe Charron, Olivier Dubourg, Uwe Köhl, Bernhard Maisch William J. McKenna. (2008) Classification of

the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Society of cardiology*, 270-276.

- Elliott, P. (2000). Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Hearth*, 106-113.
- Erdmann, Jeanette, Jörg Raibl, Jaleh Maki-Abadi, Jan Hammann, Bernd Wollnik, Eckart Frantz, Eckart Fleck, Vera Regitz-Zagrosek (2001). Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(2), 222-230.
- Farina, Guillermo Romero, Jaume Candell-Riera, Osvaldo Pereztol-Valdés, Enrique Galve-Basilio, Jordi Palet-Balart, Herminio García del Castillo, Santiago Aguadé-Bruix, Joan Castell-Conesa, Domingo Ortega-Alcalde, Jordi Soler-Soler. (2000). Clasificación morfológica de la miocardiopatía hipertrófica mediante tomografía miocárdica. Comparación con la clasificación ecocardiográfica. *Revista Especial Cardiológica*, 53: 511-516.
- Fiser András Andre jšali. (2003). Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods in enzymology*, 374, 461-491.
- Flavigny, Jeanne Flavigny, Pascale Richard, Richard Isnard, Lucie Carrier, Philippe Charron, Gisèle Bonne, Jean-François Forissier, Michel Desnos, Olivier Dubourg, Michel Komajda, Ketty Schwartz B. Hainque (1998). Identification of two novel mutations in the ventricular regulatory myosin light chain gene (MYL2) associated with familial and classical forms of hypertrophic cardiomyopathy. *Molec. Med.*, 4(76), 208-21.
- Fleitas Aydée Burgos Fleitas, María Stella Cicono García, Graciela González Bogado, Carlos Vega López (2001). MIOCARDIOPATIA HIPERTROFICA: Revisión. *Revista de Posgrado de la Cátedra Vía Medicina*(106), 13-18.
- Fozzard Harry A. Fozzard, Edgar Haber, Robert B. Jennings (1991). En *The Heart and Cardiovascular System*. pp. 2193
- Frey, Norbert, Luedde Mark, Katus Hugo A. (2012). Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Review*, (9), 91-100.
- Ganong, W. (2013). *Fisiología Médica*. Mosby. El manual moderno.
- Genetics Home Reference*. (2016). Obtenido de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MYBPC3> consultado Febrero 2018.
- Genetics home reference: *What are reduced penetrance and variable expressivity?* Obtenido de <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/inheritance/penetranceexpressivity>. Consultado el 27 de febrero del 2018.
- Gersh, Bernard J., Barry J. Maron, Robert O. Bonow, Joseph A. Dearani, Michael A. Fifer, Mark S. Link, Srihari S. Naidu, Rick A. Nishimura, Steve R. Ommen, Harry Rakowski, Christine E. Seidman, Jeffrey A. Towbin, James E. Udelson and Clyde W. Yancy (2011). Guideline for the Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*, 124, 36-106.

- Gregoratos, Gregoratos G, Abrams J, Epstein AE, Freedman RA, Hayes DL, Hlatky MA, Kerber RE, Naccarelli GV, Schoenfeld MH, Silka MJ, Winters SL, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Gregoratos G, Hiratzka LF, Faxon DP, Jacobs AK, Fuster V, Smith SC Jr; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines/North American Society for Pacing and Electrophysiology Committee to Update the 1998 Pacemaker Guidelines. (2002). ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices: Summary Article. *Circulation*, 106, 2145-2161.
- MOE *Molecular Operating Environment*. Obtenido de https://www.chemcomp.com/MOE-Molecular_Operating_Environment.htm Consultado el 12 de febrero del 2017
- Hall, Guyton & Hall Jonh (2013). *Tratado de fisiología Médica*, 11 edición.
- Hayashy, Hayashi T1, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Choi BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Knöll R, Hoshijima M, Chien KR, Kimura A. (2004). Tcap Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy and Dilated Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(11), 2192-2201.
- Hazebroek, Moskury R. Dennert, S. Heymans. (2012). Idiopathic dilated cardiomyopathy: possible triggers and treatment strategies. *Neth Heart J.*, 20(8): 332–335.
- Herman, Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, Conner L, DePalma SR, McDonough B, Sparks E, Teodorescu DL, Cirino AL, Banner NR, Pennell DJ, Graw S, Merlo M, Di Lenarda A, Sinagra G, Bos JM, Ackerman MJ, Mitchell RN, Murry CE, Lakdawala NK, Ho CY, Barton PJ, Cook SA, Mestroni L, Seidman JG, Seidman CE. (2012). Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *New Eng. J. Med.*(366), 619-628.
- Hershberger, Hershberger RE, Norton N, Morales A, Li D, Siegfried JD, Gonzalez-Quintana J. (2010). Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1 and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genetic*, 3(2): 155–161.
- Hoffmann, Hoffmann B, Schmidt-Traub H, Perrot A, Osterziel KJ, Gessner R. (2001). First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mutat.* , 515.
- Hu Zhongjun, Dianne W. Taylor, Michael K. Reedy, Robert J. Edwards, and Kenneth A. Taylor (2016). Structure of myosin filaments from relaxed *Lethocerus* flight muscle by cryo-EM at 6 Å resolution. *Biochemistry*, 1-12.
- Hughes, Siân E, William J McKenna (2005). NEW INSIGHTS INTO THE PATHOLOGY OF INHERITED CARDIOMYOPATHY. *Heart* , (91) 257-264 .
- Jaenicke, Thomas Klaus W. Diederich Walter Haas Jutta Schleich Peter Lichter Martin Pfordt Alfred Bac, Hans-Peter Vosberg (1990). The complete sequence of the human beta-myosin heavy chain gene and a comparative analysis of its product. *Genomics* (8), 194-206.

- Jung, Hyun Suk Jung, Satoshi Komatsu, Mitsuo Ikebe and Roger Craig (agosto de 2008). Head–Head and Head–Tail Interaction: A General Mechanism for Switching Off Myosin II Activity in Cells. *Molecular biology of the cell*, (19) 3234–3242.
- Kabaeva, Zhyldyz T, Andreas Perrot, Bastian Wolter, Rainer Dietz, Nuno Cardim, João Martins Correia, Hagen D Schulte, Almaz A Aldashev, Mirsaid M Mirrakhimov & Karl Josef Osterziel (2002). Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Europ. J. Hum. Genet.*, 741-748.
- Katz, Lippincott Williams & Wilkins (2011). Structure of the heart and cardiac muscle . En *Physiology of the heart* (págs. 2-32).
- Kingston, Helen Magdalen (2002). Mendelian Inheritance. En *A,B,C of clinical genetics*.
- Leach, Andrew. (2001). Molecular Modelling: Principles and Applications. *Harlow: Prentice Hall* .
- Lewis, Tania. (2016). *Live Science*. Recuperado el 18 de 07 de 2107, de Human Heart: Anatomy, Function & Facts: <https://www.livescience.com/34655-human-heart.html>
- Liew, Alphonsus, Vassilios S. Vassiliou, Robert Cooper, Claire E. Raphael (2017). Hypertrophic cardiomyopathy-Past, present and future. *Journal of Clinical Medicine* , 6(118), 20.
- Lizalde, Luis de Jesús Colín (2003). Cardiomiopatía hipertrófica. Las arritmias en la cardiomiopatía hipertrofica. *Archivos de Cardiología*, 3 (1), 26-30.
- López, Francisco Navarro (2004). Miocardiopatía hipertrófica. Bases genéticas e implicaciones clínicas. *Revista Española de Cardiología*, 54, 22-32.
- López, Francesc Navarro (2009). Mecanismos moleculares y celulares en la cardiomiopatía hipertrófica. *Miocardiopatía Hipertrófica*. Sociedad Española de Cardiología.
- Lorenz Michael and Kenneth C. Holmes. (2010). The actin-myosin interface. *PNAS*, 107(28), 12529–12534.
- Marian Jackelyn, Robert Roberts (2001). The Molecular Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.*, 33(4), 655–670.
- Marian Jackelyn, Braunwald Edgar. (2017). Hypertrophic cardiomyopathy: genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and therapy. *Circulation Research* , 749-770.
- Marieb, Elanien (2008). *Anatomía y fisiología humana*. Person Addison Wesley.
- Maron, Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB; American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; Council on Epidemiology and Prevention. (2006). Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Function. *Circulation, American Heart Association*, American Heart Association.

- McNally, McNally Emily, Golbus Jr, Puckelwartz Moscu Jackson. (2013). Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 19-26.
- Molina, Carlos Alberto Aguirre, Nilda Espínola Zavaleta, Fernando Córdova Gómez (2006). Miocardiopatía restrictiva del ventrículo derecho: Diagnóstico diferencial Serie de 3 casos. *Cardiol. Méx*, 76(3), 290-296.
- Monserrat Lorenzo, Manuel Hermida Prieto, Xusto Fernandez, Isabel Rodríguez, Carlos Dumont, Laura Cazón, Margarita G. Cuesta, Carlos Gonzalez-Juanatey, Jesús Peteiro, Nemesio Álvarez, Manuel Penas-Lado, Alfonso Castro-Beiras (2007). Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *European Heart Journal*, 1953–1961.
- Moolman-Smook, Johanna, Willem de Lange, Valerie Corfield, Paul Brink (2000). Expression of HCM causing mutations: lessons learnt from genotype-phenotype studies of the South African founder MYH7 A797T mutation. *J Med Genet*, 37, 951-956.
- Moore Jeffrey R, Leslie Leinwand, David M. Warshaw (2011). Understanding Cardiomyopathy Phenotypes Based on the Functional Impact of Mutations in the Myosin Motor . *Circ Res.*, 108, 751–764 .
- Mora, Dora Alejandra. (2016). CAPÍTULO 13: Electroforesis. *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.
- Moreira, Bruno Contreras. (2008). Modelado comparativo de proteínas Homology modelling. *Fundación ARAID y Estación Experimental de Aula Dei/CSIC*, 1-29.
- Morten Bertz, Matthias Wilmanns, Matthias Rief (11 de Agosto de 2009). The titin-telethonin complex is a directed, superstable molecular bond in the muscle Z-disk. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(32), 13307-133310.
- Mount, David (2004). Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis . En *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* . Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Murray Robert K, Peter J. Kennelly (2010). Músculo y citoesqueleto. En Harper, *Harper Bioquímica Ilustrada*, Mc Graw Hill, págs. 545-565.
- National Institute of health. (2015). Obtenido de <http://www.nlm.nih.gov/health/health-topics/topics/cm> consultado febrero 2015.
- NCBI. (2016). *MYH7 myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta [Homo sapiens (human)]*. Recuperado el 19 de Feb de 2016, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4625>
- NCBI-CONSERVED-DOMAINS. (2018). *NCBI CONSERVED DOMAINS*. Obtenido de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=NP_000248.2
- Niimura, Niimura H1, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. (2002). Sarcomere Protein Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly. *Circulation*(105), 446-451.

- Olson, Timothy M Olsonf, Thao P Doan, Nina Y Kishimoto, Frank G Whitby, Michael J Ackerman, Lameh Fananapazir, Timothy M Olsonf, Thao P Doan, Nina Y Kishimoto, Frank G Whitby, Michael J Ackerman, Lameh Fananapazir (2000). Inherited and de novo Mutations in the Cardiac Actin Gene Cause Hypertrophic Cardiac Actin Gene Cause Hypertrophic. *J Mol Cell Cardiol*, 1687–1694.
- OMIM. (2016). TITIN; TTN. Obtenido de <http://www.omim.org/entry/188840#1>
- OMIM. (2018). OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Obtenido de OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man: <https://www.omim.org/allelicVariant/160760>
- Opie, Leonel Hugo. (2004). *Heart physiology: from cell to circulation*. Philadelphia, USA.
- Parvatiyar Michelle, S. Parvatiyar, Andrew P. Landstrom, Cicero Figueiredo-Freitas, James D. Potter, Michael J. Ackerman y Jose Renato Pinto†**,5,6 (2012). A mutation in TNNC1-encoded cardiac troponin C, TNNC1-A31S, predisposes to hypertrophic cardiomyopathy and ventricular fibrillation. *J. Biol. Chem* , 287, 31845-31855.
- Pasquale, Pasquale Fabiola, Syrris Pablo, Kaski Juan Pablo, Mogensen Joni, McKenna WJ, Elliott P. (2012). Long-Term Outcomes in Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by Mutations in the Cardiac Troponin T Gene. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 1-12.
- Peinado, Rafael Peinado (2004). Presíncope: ¿un síntoma con igual significado pronóstico que el síncope? *Revista Española de Cardiología* , 57, 613-6.
- Piella Gemma, Mathieu De Craene, Bart H. Bijnens, Catalina Tobon-Gomez, Marina Huguet, Gustavo Avegliano, Alejandro F Frangi (2010). Caracterización de la deformación miocárdica en pacientes con hipertrofia ventricular izquierda de diferente etiología mediante el uso de distribuciones de strain obtenidas de imágenes de resonancia magnética. *Rev Esp Cardiol.*, 63(11), 1281-1291. Obtenido de <http://www.revespcardiol.org/es/caracterizacion-deformacion-miocardica-pacientes-con/articulo/13183611/>
- Qiagen. (2015). QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi. Obtenido de <https://www.qiagen.com/us/products/life-science-research/research-applications/gene-silencing/purification/qiaamp-dna-blood-midi-kit/>
- Roberts Robert, Ulrich Sigwart (2001). New Concepts in Hypertrophic Cardiomyopathies, Part I & Part II. *Circulation* , 104, 2113-6;2249-52. .
- Rodriguez Catarina Roma-Rodrigues, Alexandra R Fernandes (2014). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: advances and pitfalls in molecular diagnosis and therapy. *The Application of Clinical Genetics*, 295-208.
- Sudhir S. Kushwaha, John T. Fallon yValentin Fuster (2009). RESTRICTIVE CARDIOMYOPATHY. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 336 Num. 4 pp. 267-276.
- Sabater-Molina, Isabel Pére Sánchez, J.P. Hernández del Rincón, J.R. Gimeno (2017). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A review of current state. *Wiley, clinical genetics*, 1-12.
- Scientific-NanoDrop-One, T. (2018). Frequently Asked Questions. Obtenido de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/FL52778-NanoDrop-One-FAQs.pdf>

- Selvi Deepa Rani, Pratibha Nallari, Perundurai S. Dhandapany, Jhansi Rani, Khunza Meraj, Mala Ganesan, Calambur Narasimhan, and Kumarasamy Thangaraj. (2015). Coexistence of Digenic Mutations in Both Thin (TPM1) and Thick (MYH7) Filaments of Sarcomeric Genes Leads to Severe Hypertrophic Cardiomyopathy in a South Indian FHCM. *DNA and cell biology*. pp. 1-10.
- Semsarian Christopher, Jodie Ingles Grad Dip, Martin S. Maron, J. Maron (marzo de 2015). New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(12), 1249-1255.
- Song Yifan, Frank Di Maio, Ray Yu-Ruei, Wang David, KimChris Miles TJ, Brunette James Thompson David Baker (2013). High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM. *Cell Press*, 20, 1735-1742.
- Spudich, James A. Spudich, Tural Aksel, Sadie R. Bartholomew, Suman Nag, Masataka Kawana, Elizabeth Choe Yu, Saswata S. Sarkar, Jongmin Sung, Ruth F. Sommese, Shirley Sutton, Carol Cho, Arjun S. Adhikari, Rebecca Taylor, Chao Liu, Darshan Trivedi, Kathleen M. Ruppel (2016). Effects of hypertrophic and dilated cardiomyopathy mutations on power output by human β -cardiac myosin. *The company of biologists*, 219, 161-167.
- Stone, J. R. (2011). Updates to the WHO Classification of Cardiomyopathies. *Academic Forensic Pathology*, 1(2), 202-205.
- Sue Richards Chair, Sue Richards, Chair, ACMG, Nazneen Aziz, CAP, Sherri Bale, ACMG, David Bick, ACMG, Soma Das, ACMG, Julie Gastier-Foster, AMP, Wayne W. Grody, ACMG, Madhuri Hegde, ACMG, Elaine Lyon, AMP, Elaine Spector, ACMG, Karl Voelkerding, CAP, and Heidi L. Rehm, Co-Chair, ACMG, On behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015). Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. Author manuscript, 17(5), 405–424. doi:doi:10.1038/gim.2015.30.
- Tanjore Reena Rimo, Advithi Rangaraju, Kerkar Narsimhan Calambur and Pratibha Nallari (2008). MYBPC3 gene variations in hypertrophic cardiomyopathy patients in India. *Can J Cardiol*, 2(24), 127-130.
- Thermo-Scientific. (T042-TECHNICAL BULLETIN). T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. Obtenido de <http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>
- Thomas, David (2002). An Overview of the Actin-Myosin Interaction. *Results and Problems in Cell Differentiation book series*, 36, 1-13.
- Tortora Gerard J. T, Bryan Derrickson (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Médica.
- Toscano Inmaculada Paneque Sánchez, Ma Reyes Carrión Camacho, Rosa Casado Mejía, José María Fernández Pérez y Carmen Pinilla Jiménez (2014). Vivir con un desfibrilador automático implantable: un estudio cualitativo de las experiencias de los pacientes. *Index de Enfermería*, 23(1-2), 31-35.

- UniProtKB (2018). UniprotKB. Obtenido de UniProtKB - P12883 (MYH7_HUMAN): http://www.uniprot.org/uniprot/P12883#family_and_domains
- Velázquez, Laura Patricia Alejos, María del Consuelo Aragón Martínez, Amelia Cornejo Romero (2011). Extracción y purificación de ADN. Publicaciones del INECC.
- Wendt Thomas, Dianne Taylor, Kathleen M. Trybus, Kenneth Taylor (2001). Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2. PNAS, 1-37.
- WHO/ISFC. (1980). Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. HO/ISFC task force.
- Young Jasmine Y, John D Westbrook, Zukang Feng, Ezra Peisach, Irina Persikova, Raul Sala Sanchayita, Sen John, M Berrisford, G Jawahar Swaminathan, Thomas J Oldfield, Aleksandras Gutmanas, Reiko Igarashi, David R Armstrong, Kumaran Baskaran, Li Chen Minyu Chen, Alice R Clark, Luigi Di Costanzo, Dimitris Dimitropoulos, Guanghua Gao, Sutapa Ghosh, Swanand Gore, Vladimir Guranovic, Pieter M S Hendrickx, Brian P Hudson, Yasuyo Ikegawa, Yumiko Kengaku, Catherine L Lawson, Yuhe Liang, Lora Mak Abhik Mukhopadhyay, Buvaneswari Narayanan, Kayoko Nishiyama, Ardan Patwardhan, Gaurav Sahni, Eduardo Sanz-García, Junko Sato, Monica R Sekharan, Chenghua Shao, Oliver S Smart, Lihua Tan, Glen van Ginkel, Huanwang Yang, Marina A Zhuravleva, John L Markley, Haruki Nakamura, Genji Kurisu, Gerard J Kleywegt, Sameer Velankar, Helen M Berman Stephen K Burley (2018). Worldwide Protein Data Bank biocuration supporting open access to high-quality 3D structural biology data. Database,, 2018, 1-17.
- Zarco Pedro (1991). Diferencias hemodinámicas entre el ventrículo derecho e izquierdo. Revista española de cardiología .

MATERIAL SUPLEMENTARIO

PATOGENICIDAD/BENIGNIDAD DE VARIANTES

Tabla Suplementaria 1. Tabla de puntaje por cada variante para patogenicidad

Categoría		N479S	R719W	G741R	A797T	S842N	D928N	R1050P	T1351M	A1379T
Muy fuerte	PVS1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fuerte	PS1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
	PS2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PS3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PS4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderada	PM1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	PM2	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	PM3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PM4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PM5	1	1	1	1	0	1	0	0	1
	PM6	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Sugerida	PP1		1	1						1
	PP2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	PP3	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	PP4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	PP5	0	1	1	0	1	1	1	0	1

PVS1: "pathogenic very strong" (patogénica muy fuerte); PS1-4: "pathogenic strong" (patogénica fuerte); PM1-6: "pathogenic moderate" (moderadamente patogénica); PP1-5: "pathogenic supporting" (se sugiere como patogénica).

Tabla suplementaria 2. Suma de puntos PATOGENICIDAD

Suma de puntos PATOGENICIDAD									
Evidencia de patogenicidad	N479S	R719W	G741R	A797T	S842N	D928N	R1050P	T1351M	A1379T
Muy fuerte	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fuerte	1	1	1	1	0	1	0	0	1
Moderada	3	3	3	2	2	3	1	1	2
sugerida	3	5	5	3	4	4	4	2	4
Conclusión:	P	P	P	P	PP	P	P	X	P

P: patogénica; PP: probablemente patogénica

Tabla Suplementaria 3. Tabla de puntaje de cada variante para benignidad

Categoría		N479S	R719W	G741R	A797T	S842N	D928N	R1050P	T1351M	A1379T
Stand alone	BA1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fuerte	BS1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	BS2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BS3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BS4		0	0				0		0
Sugiere	BP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	BP2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BP3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BP4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BP5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BP6	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	BP7	0	0	0	0	0	0	0	0	0

BA1: "stand alone of benign" (benigna por sí sola); BS1-4: "strong benign" (fuertemente benigna); BP1-7: "supporting benign" (se sugiere como benigna).

Tabla suplementaria 4. Suma de puntos PATOGENICIDAD

Suma de puntos BENIGNIDAD									
Evidencia de patogenicidad	N479S	R719W	G741R	A797T	S842N	D928N	R1050P	T1351M	A1379T
Stand alone	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fuerte BS1-4	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Sugiere BP1-7	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Conclusión:	X	X	X	PB	X	X	X	PB	X

PB: probablemente benigna

MODELO *IN SILICO*

MODELOS PARA EVALUAR INTERACCIONES EN EL HEXÁMERO DE MIOSINA

Tabla suplementaria 5. Valores del análisis de cambios en las variantes N479S, R719W y G741R

Cabeza-Cabeza	INTERACCIONES															ENERGÍA (kcal/mol)								
	ÁREA (Å ²)			VDW (#)			ELECT (#)			P HIDRÓGENO (#)			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL		
VAR	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ
1.N479S	2258	2535	12.3%	217	223	2.8%	2	4	100.0%	18	23	27.8%	237	250	5.5%	-25.5	-47.2	-21.7	-293.6	-455.0	-161.4	-319.0	-502.2	-183.1
2.R719W	2258	2528	12.0%	217	245	12.9%	2	4	100%	18	29	61.1%	237	278	17.3%	-25.5	-49.0	-23.5	-293.6	-474.0	-180.4	-319.0	-523.0	-204.0
3.G741R	2258	2192	-2.9%	217	166	-23.5%	2	4	100%	18	22	22.2%	237	192	-19.0%	-25.5	-37.3	-11.8	-293.6	-424.5	-130.9	-319.0	-461.7	-142.7

VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno Explicar que es la delta, entre quienes

Tabla suplementaria 6. Valores del análisis de cambios en la variante A797T

VAR 4.A797T	INTERACCIONES															ENERGÍA (kcal/mol)										
	ÁREA (Å ²)			VDW (#)			ELECT (#)			P HIDRÓGENO (#)			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL				
	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR
CP1-CL1	2805	3108	10.8%	177	187	5.6%	4	4	0.0%	18	18	0.0%	199	209	5.0%	-50.9	-52.7	-1.8	-441.6	-539.3	-97.7	-492.5	-592.0	-99.5		
CP2-CP2	2768	2934	6.0%	143	159	11.2%	3	4	33.3%	14	19	35.7%	160	182	13.8%	-58.0	-48.2	9.8	-347.4	-480.3	-107.6	-405.4	-528.4	-123.0		

VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno; CP1: cadena pesada 1; CL1: cadena ligera 1; CP2: cadena pesada 2; CL2: cadena pesada 2

Tabla suplementaria 7. Valores del análisis de cambios en la variante S842N

VAR 5.S842N	INTERACCIONES															ENERGÍA (kcal/mol)										
	ÁREA (Å ²)			VDW (#)			ELECT (#)			P HIDRÓGENO (#)			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL				
	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR
Cola-cola	2822	2585	-8.4%	180	156	-13.3%	9	9	0.0%	10	12	20.0%	199	177	-11.1%	-43.2	-37.2	6.1	-457.2	-443.8	13.4	-500.4	-480.9	19.5		

VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

Tabla suplementaria 8. Valores del análisis de cambios en la variante D928N

VAR 6.D928N	INTERACCIONES															ENERGÍA (kcal/mol)										
	ÁREA (Å ²)			VDW (#)			ELECT (#)			P HIDRÓGENO (#)			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL				
	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR
Cola-cola	2088	1931	-7.5%	191	89	-53.4%	3	4	33.3%	9	9	0.0%	203	102	-49.8%	27.5	-18.6	-46.1	-186.4	-314.7	-128.3	-158.9	-333.3	-174.4		

VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

MODELOS PARA EVALUAR INTERACCIONES ENTRE LA CABEZA GLOBULAR Y ACTINA

Tabla Suplementaria 9. Valores del análisis de cambios en la variante N479S

N479S	INTERACCIONES															ENERGÍA (kcal/mol)										
	ÁREA (Å ²)			VDW (#)			ELECT (#)			P HIDRÓGENO (#)			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL				
	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR
ACT-MIO	2476	2655	7.2%	108	108	0.0%	5	6	20%	11	13	18.2%	124	127	2.4%	-32.9	-26.4	6.5	-429.8	-503.0	-73.2	-462.7	-529.4	-66.7		

ACT-MIO: interacción actina-miosina; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

Tabla suplementaria 10. Valores del análisis de cambios en la variante R719W

R719W	INTERACCIONES															ENERGÍA (kcal/mol)										
	ÁREA (Å ²)			VDW (#)			ELECT (#)			P HIDRÓGENO (#)			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL				
	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR
ACT-MIO	2476	2669	7.8%	108	116	7.4%	5	6	20%	11	13	18.2%	124	135	8.9%	-32.9	-26.5	6.4	-429.8	-508.0	-78.2	-462.7	-534.5	-71.8		

ACT-MIO: interacción actina-miosina; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

Tabla suplementaria 11. Valores del análisis de cambios en la variante G741R

G741R	INTERACCIONES															ENERGÍA (kcal/mol)										
	ÁREA (Å ²)			VDW (#)			ELECT (#)			P HIDRÓGENO (#)			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL				
	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR
ACT-MIO	2476	2803	13.2%	108	125	15.7%	5	6	20%	11	13	18.2%	124	144	16.1%	-32.9	-36.2	-3.3	-429.8	-495.1	-65.3	-462.7	-531.4	-68.7		

ACT-MIO: interacción actina-miosina; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

MODELOS PARA EVALUAR INTERACCIONES ENTRE LA CABEZA GLOBULAR Y LA MOLÉCULA DE ATP

Tabla suplementaria 12. Valores del análisis de cambios en la variante N479S

N479S	INTERACCIONES (#)									ENERGÍA (kcal/mol)								
	VDW			P HIDRÓGENO			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL		
VAR	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ
MIO-ATP	119	121	1.7%	20	19	-5%	139	140	0.7%	832.7	-7.7	-840.4	-788.3	-486.2	302.1	44.4	-493.9	-538.3

MIO-ATP: interacción miosina-ADP; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

Tabla suplementaria 13. Valores del análisis de cambios en la variante R719W

R719W	INTERACCIONES (#)									ENERGÍA (kcal/mol)								
	VDW			P HIDRÓGENO			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL		
VAR	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ
MIO-ATP	119	124	4.2%	20	21	5.0%	139	145	4.3%	832.7	-8.0	-840.6	-788.3	-504.9	283.3	44.4	-512.9	-557.3

MIO-ATP: interacción miosina-ADP; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

Tabla suplementaria 14. Valores del análisis de cambios en la variante G741R

G741R	INTERACCIONES (#)									ENERGÍA (kcal/mol)								
	VDW			P HIDRÓGENO			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL		
VAR	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ
MIO-ATP	119	110	-7.6%	20	18	-10.0%	139	128	-7.9%	832.7	-3.9	-836.6	-788.3	-494.7	293.5	44.4	-498.7	-543.1

MIO-ATP: interacción miosina-ADP; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

MODELOS PARA EVALUAR INTERACCIONES ENTRE LA CABEZA GLOBULAR Y LA MOLÉCULA DE ADP

Tabla suplementaria 15. Valores del análisis de cambios en la variante N479S

N479S	INTERACCIONES (#)									ENERGÍA (kcal/mol)								
	VDW			P HIDRÓGENO			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL		
VAR	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ
MIO-ADP	121	113	-6.6%	11	9	-18.2%	132	122	-7.6%	-20.6	-14.3	6.3	-349.6	-375.9	-26.3	-370.1	-390.2	-20.0

MIO-ADP: interacción miosina-ADP; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

Tabla suplementaria 16. Valores del análisis de cambios en la variante R719W

R719W	INTERACCIONES (#)									ENERGÍA (kcal/mol)								
	VDW			P HIDRÓGENO			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL		
VAR	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ
MIO-ADP	121	112	-7.4%	11	10	-9.1%	132	122	-7.6%	-20.6	-16.4	4.2	-349.6	-359.5	-9.9	-370.1	-375.9	-5.8

MIO-ADP: interacción miosina-ADP; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno

Tabla suplementaria 17. Valores del análisis de cambios en la variante G741R

G741R	INTERACCIONES (#)									ENERGÍA (kcal/mol)								
	VDW			P HIDRÓGENO			TOTAL			VDW			ELECT			TOTAL		
VAR	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ	WT	VAR	Δ
MIO-ADP	121	109	-9.9%	11	10	-9.1%	132	119	-9.8%	-20.6	-15.7	4.9	-349.6	-372.3	-22.7	-370.1	-388.0	-17.8

MIO-ADP: interacción miosina-ADP; VDW: van der Waals; ELECT: electrostáticas; P HIDRÓGENO: puentes de hidrógeno