



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Estudio de asociación de los polimorfismos rs41315493 (*SCN5A*), rs61751489 y rs76371972 (*NOTCH1*), rs10801999 (*CASQ2*), rs185788586 (*CACNA1C*) y rs45578741 (*TCAP*) con la susceptibilidad a canalopatías y cardiomiopatías en población mexicana”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
MARTHA ANDREA MÁRQUEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Leonor Jacobo Albavera





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

VOCAL: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

SECRETARIO: Dra. Leonor Jacobo Albavera

1er. SUPLENTE: Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

2° SUPLENTE: Dr. José Vergara de la Fuente

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES PERTENECIENTE AL
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA

SUSTENTANTE (S):

MARTHA ANDREA MÁRQUEZ RODRÍGUEZ

*“La ciencia no sólo es una disciplina de la razón,
sino también del romance y de la pasión”*

-Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

En especial a mi tutora, la Dra. Leonor Jacobo Albavera, por permitirme ser parte de su equipo, por la confianza y apoyo brindado a lo largo de mi estancia en el INMEGEN.

A la Dra. Ma. Teresa Villarreal Molina por abrirme las puertas de su laboratorio y por todo el apoyo.

Al M. en C. Hugo Villamil Ramírez por su apoyo en el área técnica de este proyecto.

Al M. en C. Antonio Hernández Martínez por sus aportaciones en la parte técnica y revisión de esta tesis.

A lo miembros del jurado: Dra. Sobeida Sánchez Nieto, al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra y a la Dra. Leonor Jacobo Albavera por la revisión crítica de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la beca de titulación otorgada: “beca para titulación egresados de alto rendimiento (2018-2019)”.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Panorama de las ECV en el mundo	11
1.2 Enfermedades Cardiovasculares en México	13
1.3 Actividad eléctrica del corazón.....	14
1.4 Electrocardiograma	16
1.5 Canalopatías Arritmogénicas	18
1.5.1 Síndrome de QT largo	19
1.5.2 Síndrome de Brugada.....	23
1.5.3 Síndrome de QT corto	25
1.5.4 Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica.....	27
1.5.5 Genes de interés.....	29
1.6 Cardiomiopatías	32
1.6.1 Cardiomiopatía dilatada	33
1.6.2 Cardiomiopatía hipertrófica.....	34
1.6.3 Cardiomiopatía arritmogénica	36
1.6.4 Genes de interés.....	38
1.7 SNPs.....	39
2. JUSTIFICACIÓN.....	40
3. HIPÓTESIS.....	40
4. OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo General	40
4.2 Objetivos Específicos.....	41
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	41
5.1 Población de Estudio	41
5.1.1 Controles	41
5.1.2 Casos.....	42

5.2 Criterios de Inclusión.....	42
5.3 Criterios de Exclusión	43
5.4 Genotipificación de los SNPs mediante PCR en tiempo real	43
5.5 Análisis estadístico: Equilibrio de Hardy-Weinberg, estudio caso-control y análisis <i>in silico</i>	45
6. RESULTADOS	47
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIONES.....	60
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
10. ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Potencial de acción de miocitos.....	15
Figura 2. Electrocardiograma normal.....	17
Figura 3. Patrón electrocardiográfico de SQT.....	19
Figura 4. Diagrama de superposición entre los genes asociados con síndrome de Brugada (BrS), síndrome de QT largo (LQTS), taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) y síndrome de QT corto (SQTS).....	22
Figura 5. Patrón electrocardiográfico de SBr.....	23
Figura 6. Patrón electrocardiográfico de SQTC	24
Figura 7. Patrón electrocardiográfico de TVPC	27
Figura 8. Estructura del canal Nav1.5.....	29
Figura 9. Estructura del canal Cav1.2.....	31
Figura 10. Representación gráfica de la fluorescencia emitida por las sondas TaqMan.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Síndrome de QT largo por subtipo genético.....	21
Tabla 2. Síndrome de QT corto por subtipo genético.....	26
Tabla 3. Información general de cada SNP estudiado.....	39
Tabla 4. Ensayos utilizados para la genotipificación de cada uno de los SNPs....	43
Tabla 5. Características de la población de estudio.....	47
Tabla 6. Frecuencia alélica menor (MAF) obtenida y reportada para cada SNP.....	48
Tabla 7. Frecuencia genotípica, genotipos obtenidos y esperados en la población de estudio y equilibrio de Hardy-Weinberg de los seis SNPs seleccionados.....	49
Tabla 8. Análisis de asociación de los SNPs a canalopatías.....	50
Tabla 9. Análisis de asociación de los SNPs a SQT.....	51
Tabla 10. Análisis de asociación de los SNPs a cardiomiopatías.....	52
Tabla 11. Análisis de asociación de los SNPs a CMD.....	53
Tabla 12. Análisis de asociación de los SNPs a CMH.....	54
Tabla 13. Análisis <i>in silico</i> y reportes en la literatura.....	55

RESUMEN

El estudio de las enfermedades cardiovasculares (ECV) ha sido de especial interés por ser un grave problema de salud en México y en el mundo. Estas enfermedades tienen un origen multifactorial, es decir, surgen como resultado de la interacción de múltiples variantes genéticas y diversos factores ambientales. Las variantes genéticas más comunes en el DNA son los llamados SNPs, polimorfismos de un sólo nucleótido, los cuales se distinguen principalmente de las mutaciones por su frecuencia; su vinculación con enfermedades es motivo de investigación ya que en ocasiones pudieran afectar el fenotipo de la enfermedad.

Se sabe que enfermedades como las canalopatías y cardiomiopatías son responsables de provocar muerte súbita en población joven (<35 años), por lo que en este trabajo se analizó la participación de 6 SNPs no sinónimos, de alta frecuencia en latinos, ubicados en 5 genes de interés (*SCN5A*, *NOTCH1*, *CASQ2*, *CACNA1C* y *TCAP*) en el desarrollo de estas enfermedades en población mexicana.

La genotipificación se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan. Se evaluó el equilibrio de Hardy Weinberg para cada uno de los SNPs en el grupo control y en los grupos de casos mediante una prueba de Chi cuadrada de Pearson. También se analizó la asociación de estos SNPs a canalopatías y cardiomiopatías bajo un modelo dominante utilizando el programa SPSS 22.0. Por último, se realizó el análisis *in silico* de la posible implicación funcional de los SNPs estudiados, utilizando dos programas diferentes (Sift y Polyphen-2) y una búsqueda en la literatura de los 6 SNPs y su asociación a entidades clínicas, utilizando la plataforma ClinVar.

En conclusión, se encontraron 3 variantes con posible asociación a estas enfermedades; la variante del gen *CASQ2* (*V76M*) con tendencia de riesgo a SQT, la variante del gen *SCN5A* (*V1950M*) con tendencia de riesgo a CMD y la variante del gen *TCAP* (*R106C*) se asoció significativamente a CMH; es necesario aumentar el tamaño de la muestra para confirmar las asociaciones encontradas, así como estudios funcionales para conocer el papel de estas variantes en estas enfermedades.

ABREVIATURAS

AV: Nodo auroventricular

CAs: Canalopatías arritmogénicas

CMA: Cardiomiopatía arritmogénica

CMD: Cardiomiopatía dilatada

CMH: Cardiomiopatía hipertrófica

ECG: Electrocardiograma

ECV: Enfermedades cardiovasculares

ENT: Enfermedades no transmisibles

FRET: Fluorescence resonance energy transfer (Transferencia de energía de resonancia fluorescente)

IC: Intervalo de confianza

MS: Muerte súbita

MSC: Muerte súbita cardiaca

NGS: Next Generation Sequencing (Secuenciación de nueva generación)

NS: Nodo sinusal

OR: Odds ratio (Razón de momios)

PA: Potencial de acción

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RS: Retículo Sarcoplásmico

SBr: Síndrome de Brugada

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

SQTC: Síndrome de QT corto

SQTL: Síndrome de QT largo

TVPC: Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018), las enfermedades no transmisibles (ENT) son la causa de muerte de 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen en el mundo. Se entiende por ENT, a las enfermedades de larga duración, lenta progresión, que no se resuelven espontáneamente, que rara vez logran la curación total y que resultan de la combinación de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales.

Los principales tipos de ENT son las enfermedades cardiovasculares (los ataques cardíacos y los accidentes cerebrovasculares), el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas (la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma) y la diabetes (OMS, 2018).

Estos cuatro grupos de enfermedades crónicas no transmisibles afectan desproporcionadamente a los países de mediano y bajo ingreso, donde se registran más del 75% de las muertes por ENT (OMS, 2018).

1.1 Panorama de las ECV en el mundo

Las ECV constituyen un conjunto de entidades que afectan el corazón y los vasos sanguíneos (Sánchez-Arias et al., 2016), provocando la mayoría de las muertes (17.9 millones cada año), seguidas del cáncer (9.0 millones), las enfermedades respiratorias (3.9 millones) y la diabetes (1.6 millones) (OMS, 2018).

Se estima que para el año 2020, las muertes por ECV aumentarán de 15 a 20% y, en el año 2030, morirán cerca de 23.6 millones de personas, por lo que se pronostica que seguirá siendo la principal causa de muerte a nivel global (Gómez, 2011; Sánchez-Arias et al., 2016). Cabe recalcar que las ECV, además de ser una causa de discapacidad entre la población y generar altos costos para su prevención y

control, están asociadas con alto riesgo de muerte prematura (Prüss-Üstün & Corvalán, 2015). La muerte prematura se define como aquella que se produce antes de la edad promedio de muerte en una población determinada (Instituto Nacional del Cáncer (NIH), 2018).

Se ha reportado que las ECV son las responsables de cerca del 85% de las muertes súbitas (MS) en el mundo y cuando es ocasionada por estas enfermedades se le denomina muerte súbita cardíaca (MSC). Desde el punto de vista clínico, la MS se define como la muerte natural inesperada que ocurre dentro de una hora después del inicio de los síntomas en un individuo aparentemente sano (Campuzano et al., 2015).

Dentro de las ECV, la cardiopatía isquémica es la de mayor prevalencia a nivel mundial (Benjamin et al., 2017). Sin embargo, existen enfermedades de menor prevalencia como las canalopatías arritmogénicas (CAs) [síndrome de QT largo (SQTL), síndrome de Brugada (SBr), síndrome de QT corto (SQTC) y taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC)] y las cardiomiopatías [cardiomiopatía hipertrófica (CMH), cardiomiopatía dilatada (CMD) y cardiomiopatía arritmogénica (CMA)], ambas responsables de una gran parte de las MSC ocurridas en población joven (Fernández-Falgueras et al., 2017).

Actualmente, no se han reportado datos de prevalencia e incidencia de las CAs en conjunto, pero se sabe que son responsables de cerca del 30% de las MSC ocurridas en población joven (García-Elías & Benito, 2018). Sin embargo, existen estudios donde se reporta la prevalencia mundial del SQTL, SBr, SQTC y TVPC por separado. La prevalencia estimada del SQTL es de 1: 2,000 individuos, aunque se ha llegado a reportar de hasta 1: 5,000 y 1: 20,000. La prevalencia global estimada del SBr es de 1 caso por cada 2,000 individuos; no obstante, en algunas regiones del mundo como Asia se registran hasta 20 casos por 10,000 individuos. El SQTC y la TVPC son las CAs más raras, con prevalencia estimada de 1 caso en 10,000

individuos (Fernández-Falgueras et al., 2017; García-Elías & Benito, 2018). Hoy en día, las cardiomiopatías en general afectan a 1 de 390 individuos en el mundo. Existen estudios donde se reporta la prevalencia de la CMD, CMH y CMA. La prevalencia de la CMH en Europa es de 1 caso en 500 individuos; esto coincide con lo reportado en el estudio de cohorte CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults) realizado en Australia (Semsarian et al., 2015; Towbin, 2015). Para la CMD, la prevalencia estimada en un estudio poblacional en Estados Unidos refiere 36.5 afectados en 100,000 individuos. En el caso de la CMA, la prevalencia estimada en Europa varía entre 1:1,000 y 1:10,000 individuos (Towbin, 2015).

1.2 Enfermedades Cardiovasculares en México

Las ECV son la primera causa de mortalidad en México, por lo que representan un verdadero reto para la salud pública de nuestro país. En el 2015 se registraron más de 655,000 defunciones, de las cuales el 25.5% fueron provocadas por ECV, principalmente por enfermedad isquémica del corazón (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2017).

En el año 2011, el 19% de las muertes prematuras (30-69 años) en nuestro país fueron ocasionadas por enfermedades cardiovasculares según registros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (OMS y OPS, 2011).

En México se desconoce la incidencia y la prevalencia de la muerte súbita (MS) en población adulta (Rodríguez-Reyes et al., 2016). Sin embargo, un estudio realizado recientemente por el Laboratorio de Investigación en Cardiopatías Congénitas y Arritmias del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) estimó la prevalencia por año de las enfermedades que predisponen a la MSC en población

infantil. Dichas enfermedades pueden clasificarse en dos grupos: enfermedades estructurales (cardiomiopatías) y enfermedades eléctricas (canalopatías). La prevalencia de estos grupos de enfermedades que predisponen a MSC infantil fue de 9.5 en 1,000 pacientes por año (Cano-Hernández et al., 2017).

Actualmente, no se cuenta con datos estadísticos a nivel nacional de cardiomiopatías en población adulta; sin embargo, en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” se confirmó el diagnóstico de CMH en 136 pacientes entre los años 2000 y 2014, de un total de 81,460 individuos atendidos en la institución, lo que resulta en una prevalencia de 0.16% (Márquez et al., 2016).

1.3 Actividad eléctrica del corazón

El corazón es una bomba electromecánica accionada eléctricamente por la generación y propagación de un potencial de acción (PA) a través de los miocitos (Fernández-Falgueras et al., 2017). Este impulso eléctrico es generado por las células del nodo sinusal (NS) y es propagado a través de fibras especializadas hacia las aurículas y el nodo auro-ventricular (AV). Posteriormente la actividad eléctrica viaja desde el nodo AV hacia los ventrículos, mediante el sistema His-Purkinje (Bartos et al., 2015); después hay un periodo de contracción muscular y relajación hasta la generación del próximo impulso. El PA cardiaco es un cambio transitorio del potencial membranal generado por el intercambio iónico, cuya dirección está determinada por el gradiente electroquímico de los iones sodio (Na^+), potasio (K^+) y/o calcio (Ca^{2+}) a través de la membrana celular. La activación e inactivación sinérgica de los canales iónicos que conducen despolarización (corrientes hacia el interior (Na^+ y Ca^{2+})) y repolarización (corrientes hacia el exterior (K^+)) inducen la formación de un PA (Fernández-Falgueras et al., 2017). Tradicionalmente, el PA cardiaco está dividido en 5 fases (**Figura 1**):

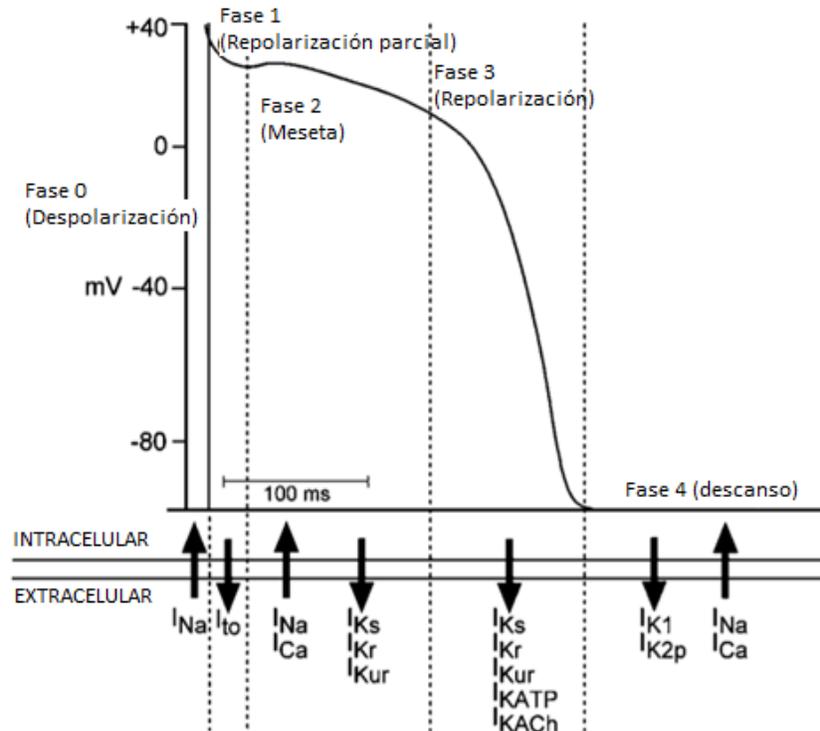


Figura 1. Potencial de acción de miocitos. El potencial de acción de los miocitos auriculares y ventriculares consiste en cinco fases: despolarización (fase 0), repolarización parcial (fase 1), meseta (fase 2), repolarización (fase 3) y descanso (fase 4). Tomada y modificada de Bastiaenen & Behr, 2011.

La *fase 0* del PA es la fase de inicio y de despolarización rápida de la célula, es desencadenada por la entrada rápida por difusión facilitada de iones Na^+ a la célula, generando una corriente hacia el interior (I_{Na}) y provocando que la célula pase del estado de reposo (-90 mV) al estado de excitación (40 mV) (Bastiaenen & Behr, 2011).

Durante la *fase 1*, ocurre la inactivación de I_{Na} y una salida breve de K^+ a través de una corriente llamada I_{to} , generada por los canales $K_{v4.2}$ y $K_{v4.3}$ (componente rápido) y $K_{v1.4}$ (componente lento), dando lugar a la repolarización rápida de la membrana.

La *fase 2* o fase *meseta*, es un periodo donde el PA se mantiene constante debido a la salida de iones Na^+ y a la simultánea entrada lenta de iones Ca^{2+} a través del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, generando una corriente denominada

I_{Ca}. Los canales de K⁺ permanecen abiertos para así continuar con la repolarización del cardiomiocito.

Posteriormente, en la *fase 3* los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje se cierran, mientras que los iones K⁺ continúan saliendo de la célula haciendo que el PA se vuelva negativo.

En la *fase 4*, la célula ya se encuentra en estado de reposo y el PA se restablece a -90 mV, para así quedar lista para el siguiente impulso cardiaco (Fernández-Falgueras et al., 2017; García-Elías & Benito, 2018).

Cambios anormales en el PA, sincronización y/o propagación del impulso eléctrico, predisponen potencialmente a arritmias malignas (Fernández-Falgueras et al., 2017).

1.4 Electrocardiograma

Las diferencias de potencial producidas durante la actividad eléctrica cardiaca son registradas mediante electrodos colocados sobre la piel. El dispositivo se llama electrocardiógrafo y al registro obtenido se le llama electrocardiograma (ECG). El ECG es una prueba no invasiva y económica, de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades cardiacas.

El marcapasos del corazón (nodo sinusal) provoca una despolarización espontánea que causa potenciales de acción, lo que da por resultado el latido automático del corazón. Los potenciales de acción son conducidos por células miocárdicas en las aurículas y transmitidos hacia los ventrículos mediante tejido de conducción especializado; dichos eventos corresponden a las ondas del ECG (Fox, 2014).

Cada ciclo cardiaco produce ondas ECG distintas designadas como P, Q, R, S, T y U (**Figura 2**).

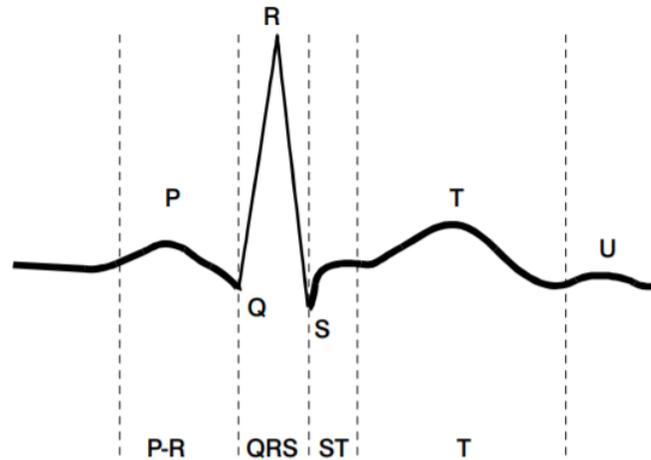


Figura 2. ECG normal. Tomada de Franco-Salazar, 2007

La onda P es el primer componente de una forma de onda de ECG normal, es el resultado de la propagación de la despolarización auricular que causa una diferencia de potencial indicada por una deflexión positiva de la línea isoeletrica (Fox, 2014). Esta onda corresponde inicialmente a la despolarización de la aurícula derecha y su parte final a la de la aurícula izquierda (Burghardt, 2005). El segmento PR representa la despolarización auricular y el retraso fisiológico que sufre el estímulo a su paso por el AV.

De modo similar, la conducción del impulso hacia los ventrículos crea una diferencia de potencial que da como resultado una deflexión positiva de la línea del ECG, que después regresa a la basal, a medida que los ventrículos en su totalidad alcanzan la despolarización. La onda Q representa la despolarización del septum ventricular, la onda R corresponde a la despolarización del ventrículo izquierdo y la onda S a la despolarización del ventrículo derecho. Por eso, el complejo QRS representa la despolarización del miocardio ventricular.

El segmento ST representa la fase de meseta del PA, es decir, es el lapso comprendido entre la despolarización y la repolarización. El intervalo QT representa la sístole ventricular, es decir, el conjunto de la despolarización y la repolarización de los ventrículos (Franco-Salazar, 2007).

La repolarización total de los ventrículos está representada por la onda T (Fox, 2014). Por último, la onda U representa el período de recuperación de las fibras de Purkinje y puede no aparecer en un ECG (Burghardt, 2005).

1.5 Canalopatías Arritmogénicas

Las canalopatías arritmogénicas (CAs) son un grupo de enfermedades producidas por alteraciones en la función de los canales iónicos cardiacos, los cuales son proteínas que participan en el potencial de acción cardiaco (Benito et al., 2009; González-Melchor et al., 2014). Estas modificaciones son comúnmente inducidas por mutaciones en los genes que codifican para canales iónicos, receptores y/o proteínas asociadas (Fernández-Falgueras et al., 2017). Dichas mutaciones pueden ser de novo o de origen hereditario y son capaces de incrementar o disminuir la función de los canales iónicos alterando el PA cardiaco o el manejo de calcio intracelular, causando inestabilidad eléctrica y ocasionando latidos anormales del corazón (García-Elías & Benito, 2018).

Estas enfermedades se caracterizan por ser de penetrancia incompleta, expresividad variable (González-Melchor et al., 2014) y no se asocian a cardiopatía estructural. Son responsables principalmente de causar arritmias, síncope o MS; esta última suele ser regularmente la primera manifestación de la enfermedad en población medianamente joven (<35 años) (Campuzano et al., 2015), por lo que el diagnóstico temprano es esencial. En los últimos años, la aplicación de los avances tecnológicos en el campo de la medicina ha facilitado en ocasiones el diagnóstico oportuno de la enfermedad (Fernández-Falgueras et al., 2017).

El síndrome de QT largo (SQTL), síndrome de Brugada (SBr), síndrome de QT corto (SQTC) y taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) se incluyen en este grupo de enfermedades cardiacas eléctricas, siendo éstas las más prevalentes a nivel mundial (Benito et al., 2009; Campuzano et al., 2015; Fernández-Falgueras et al., 2017).

1.5.1 Síndrome de QT largo

El síndrome de QT largo (SQTL) representa la canalopatía mejor conocida y más estudiada. Se caracteriza por la prolongación del intervalo QT en el ECG de reposo (>470 ms para los varones y >480 ms para las mujeres como diagnóstico, y de 440-470 ms como límite) (**Figura 3**), lo cual es interpretado como un retraso en la repolarización ventricular del miocardio (García-Elías & Benito, 2018).

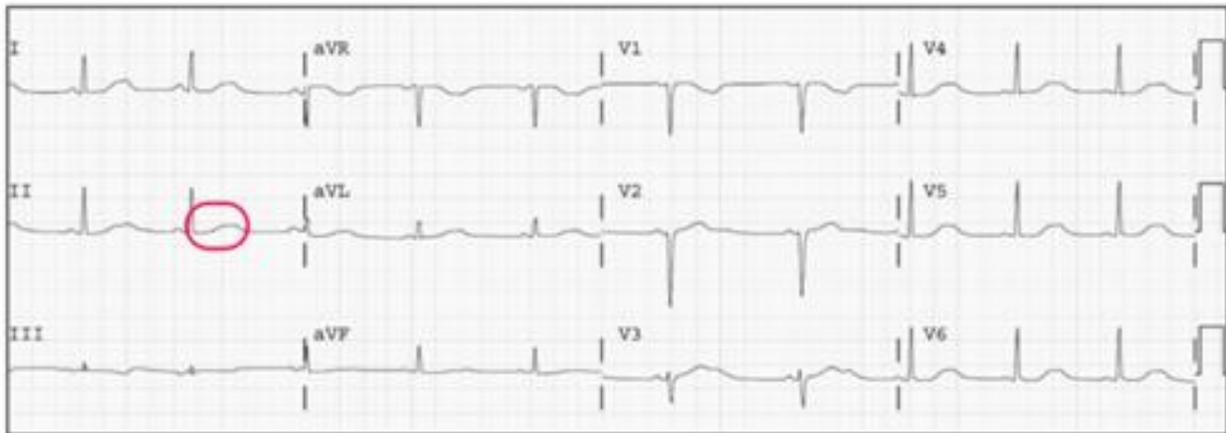


Figura 3. SQTL con intervalo QT prolongado; el círculo hace referencia al intervalo QT alargado en las derivaciones I, II y III. Tomado de García-Elías & Benito, 2018.

El género es un factor importante para determinar el curso y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Aunque la duración del intervalo QT corregido (QTc) es similar entre mujeres (460 ms) y hombres (440 ms), se ha sugerido que las hormonas sexuales contribuyen de manera importante en el fenotipo del SQTL.

El SQTL puede ser congénito o adquirido. Mientras el SQTL congénito es causado por mutaciones en los canales iónicos y/o proteínas asociadas, el adquirido es generalmente asociado con fármacos y desequilibrio hidroelectrolítico (hipocalcemia, hipocalcemia o hipomagnesemia) (Fernández-Falgueras et al., 2017).

Descripción clínica

Las manifestaciones clínicas del SQTl pueden ser variables, ya que van desde pacientes asintomáticos diagnosticados a través de la detección familiar, a MSC, síncope, convulsiones y arritmias ventriculares malignas. La MSC ocurre principalmente en niños y jóvenes sanos bajo situaciones de estrés físico o emocional (Fernández-Falgueras et al., 2017).

En 1957 fue reportada una forma rara de síndrome de QT largo por Anton Jervell y Fred Lange-Nielsen, quienes describieron un síndrome cardíaco que se acompañaba de sordera neuronal congénita, que bajo estudios genéticos correspondía a mutaciones homocigotas, con un fenotipo muy grave y un alto riesgo de MS; este síndrome se transmitía por patrón de herencia autosómico recesivo y se conoce como síndrome de Jervell y Lange-Nielsen (JLNS, por sus siglas en inglés) (Schwartz et al., 2017). En 1964, Romano y Ward publicaron de manera independiente un síndrome cardíaco familiar caracterizado por síncope recurrente, MS y prolongación de QT sin sordera neuronal, cuyos estudios genéticos demostraron que correspondía a mutaciones heterocigotas, cuyo patrón de herencia era autosómico dominante y la gravedad de la enfermedad era variable (Medeiros-Domingo et al., 2007). Este síndrome es actualmente conocido como síndrome de QT largo tipo 1 (LQT1, por sus siglas en inglés).

Bases genéticas

La heterogeneidad genética del SQTl ha llevado a su clasificación en 15 subtipos basados en los genes donde se han descrito las mutaciones causales de este síndrome (**Tabla 1**).

Tabla 1. Síndrome de QT largo por subtipo genético. Tomado y modificado de García-Elías & Benito, 2018.

Tipo	Gen	Proteína	Efecto funcional de la mutación	Frecuencia de casos (%)
SQTL1	<i>KCNQ1</i>	K _v LQT1 (Subunidad alfa de I _{Ks})	Pérdida de función	30-35
SQTL2	<i>KCNH2</i>	HERG (Subunidad alfa de I _{Kr})	Pérdida de función	25-30
SQTL3	<i>SCN5A</i>	Nav1.5 (Subunidad alfa I _{Na})	Ganancia de función	5-10
SQTL4	<i>ANK2</i>	Ankirina B, proteína de anclaje	Pérdida de función	<1
SQTL5	<i>KCNE1</i>	MinK (Subunidad beta de I _{Ks})	Pérdida de función	<1
SQTL6	<i>KCNE2</i>	MiRP (Subunidad beta de I _{Kr})	Pérdida de función	<1
SQTL7	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1 (Subunidad alfa de I _{Ki})	Pérdida de función	<1
SQTL8	<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2 (Subunidad alfa de I _{CaL})	Ganancia de función	Raro
SQTL9	<i>CAV3</i>	Caveolina 3	Ganancia de función	<1
SQTL10	<i>SCN4B</i>	Subunidad beta 4 de I _{Na}	Ganancia de función	Raro
SQTL11	<i>AKAP9</i>	Proteína de anclaje de cinasa A	Ganancia de función	Raro
SQTL12	<i>SNTA1</i>	Sintrofina	Aumento de corriente de sodio	Raro
SQTL13	<i>KCNJ5</i>	Subunidad Kir 3.4 de canal I _{KAch}	Pérdida de función	Raro
SQTL14	<i>CALM1</i>	Calmodulina 1	Señalización de calcio alterada	<1
SQTL15	<i>CALM2</i>	Calmodulina 2	Señalización de calcio alterada	<1

A la fecha, se han identificado cientos de mutaciones en 19 genes de susceptibilidad a SQT: 16 siguen el patrón de herencia autosómico dominante (*AKAP9*, *ANK2*, *CACNA1C*, *CALM1*, *CALM2*, *CALM3*, *CAV3*, *KCNE2*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *KCNJ5*, *RYR2*, *SCN1B*, *SCN4B*, *SCN5A* y *SNTA1*), una sigue un patrón de herencia autosómico recesivo (*TRDN*) y dos más siguen ambos patrones de herencia (*KCNQ1* y *KCNE1*) (**Figura 4**) (Fernández-Falgueras et al., 2017).

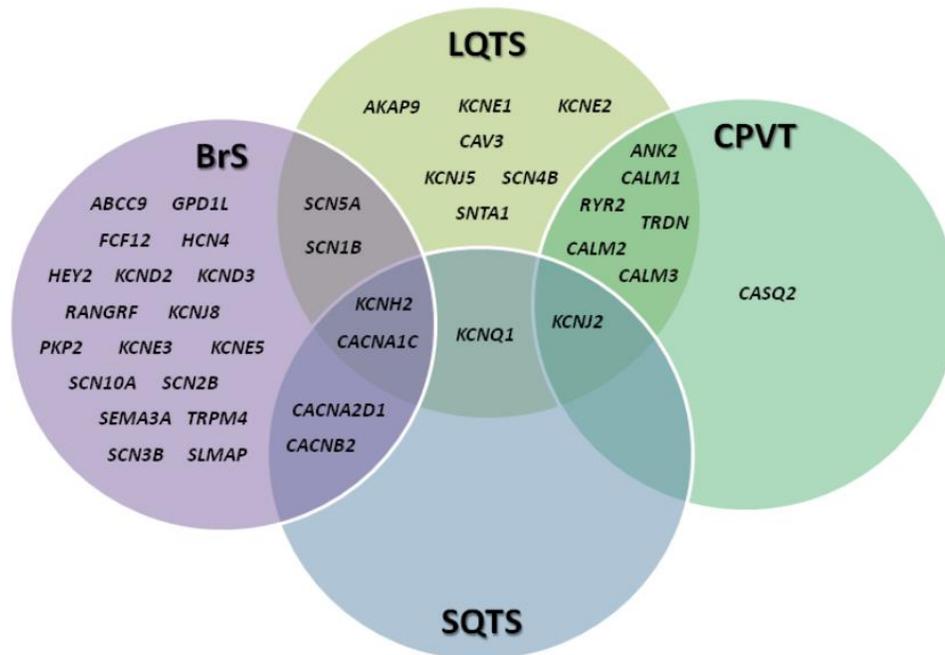


Figura 4. Diagrama de superposición entre los genes asociados con síndrome de Brugada (BrS), síndrome de QT largo (LQTS), taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) y síndrome de QT corto (SQTs). Tomada de Fernández-Falgueras et al., 2017.

Estas mutaciones causan una alteración en la proteína codificada por estos genes, provocando un mecanismo de pérdida o ganancia de función del canal implicado en una determinada corriente iónica del PA.

Aproximadamente el 85% de los pacientes diagnosticados clínicamente con SQTl tienen una mutación en uno de estos genes (**Figura 4**). Un 75% de los casos se deben a mutaciones en los tres genes principales (*KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*); los 16 genes restantes son responsables sólo del 10% de los casos de SQTl (**Tabla 1**) Cerca del 15-20% de los casos clínicos con diagnóstico definitivo de SQTl no se ha logrado identificar la causa genética (Fernández-Falgueras et al., 2017).

1.5.2 Síndrome de Brugada

Descrito por primera vez en 1992 por Pedro y Josep Brugada, el síndrome de Brugada (SBr) es una patología eléctrica primaria o canalopatía cardíaca, potencialmente mortal, caracterizada por presentar un patrón electrocardiográfico propio y la predisposición a presentar arritmias ventriculares y MSC en pacientes sin cardiopatía estructural evidente (Benito et al., 2009; González-Melchor et al., 2014; Schwartz et al., 2017).

Años después, el SBr fue reportado como “síndrome de muerte nocturna súbita inexplicable”, también llamado “bangungut” en Filipinas, conocido como “pokkuri” en Japón o “tai tai” en Tailandia, todos responsables de muerte nocturna mayoritariamente en hombres (Fernández-Falgueras et al., 2017).

Descripción clínica



Figura 5. Patrón electrocardiográfico de SBr. Hay una elevación del segmento ST seguido de la inversión de la onda T en las derivaciones V1 y V2. Tomada de Berne et al., 2012.

En el ECG, el SBr está caracterizado principalmente por la elevación del segmento ST, seguida de ondas T negativas (**Figura 5**) en las precordiales derechas, en ausencia de anomalías estructurales cardíacas.

El SBr presenta una marcada variabilidad geográfica y étnica; existe una menor prevalencia en Europa y una mayor prevalencia en el sureste asiático, donde ha

sido considerado endémico. Cabe mencionar que este síndrome es mucho más frecuente en varones que en mujeres con una relación 9:1 (Berne et al., 2012; Fernández-Falgueras et al., 2017).

Los pacientes con SBr permanecen en su mayoría asintomáticos. No obstante, se ha descrito que un 17-42% de ellos presentan síncope o MS como consecuencia de una arritmia ventricular en algún momento de su vida (González-Melchor et al., 2014).

Bases genéticas

Se hereda típicamente mediante un patrón de herencia autosómico dominante. Las primeras mutaciones causales de esta patología fueron identificadas en 1998 en el gen *SCN5A*, que codifica para la subunidad α del canal de sodio cardiaco ($Na_v1.5$). Mutaciones en *SCN5A* condicionan pérdida de la función del canal con disminución de la corriente (Campuzano et al., 2015; Fernández-Falgueras et al., 2017).

Aunque este fue el único gen (*SCN5A*) asociado a la enfermedad durante casi diez años, las mutaciones en él se encuentran en aproximadamente entre el 20-25% de los pacientes (Mizusawa & Wilde, 2012). Sin embargo, los genes causales conocidos de SBr (**Figura 4**) sólo explican del 30 al 35% de los casos, dejando casi 70% de los pacientes sin diagnóstico genético (Fernández-Falgueras et al., 2017).

Hasta la fecha, se han identificado más de 450 mutaciones en 24 genes que codifican para canales de sodio, potasio y calcio o proteínas asociadas: *ABCC9*, *CACNA1C*, *CACNA2D1*, *CACNB2*, *FGF12*, *GPD1L*, *HCN4*, *HEY2*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNE3*, *KCNE5*, *KCNH2*, *KCNJ8*, *PKP2*, *RANGRF*, *SCN10A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN5A*, *SEMA3A*, *SLMAP* y *TRPM4* (**Figura 4**) (Fernández-Falgueras et al., 2017).

1.5.3 Síndrome de QT corto

El síndrome de QT corto (SQTC) es una rara enfermedad cardíaca que condiciona a un elevado riesgo de MS, presenta un patrón de herencia autosómico dominante y alta penetrancia. En el ECG, se caracteriza por presentar un intervalo QT corto (<320-350 ms) (**Figura 6**) (Fernández-Falgueras et al., 2017).



Figura 6. Patrón electrocardiográfico del SQTC en las derivaciones I, II y III; el círculo señala el intervalo QT reducido. Tomado de García-Elías & Benito, 2018.

Descripción clínica

El intervalo QT corto en el ECG refleja una duración reducida del PA a nivel celular, causada por una repolarización rápida, lo cual favorece la presencia de arritmias ventriculares en ausencia de daño estructural cardíaco (García-Elías & Benito, 2018).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes del SQTC son principalmente palpitaciones, síncope y fibrilación atrial (FA) (Fernández-Falgueras et al., 2017).

Bases genéticas

Actualmente, se han identificado mutaciones asociadas con SQTC en 6 genes (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *CACNA1C*, *CACNB2* y *CACNA2D1*) (**Figura 4**). El subtipo 1 es el más prevalente del SQTC y está asociado con mutaciones en el gen *KCNH2*, las cuales ocasionan una ganancia de función, que incrementa el flujo de

la corriente a través del canal, acortando la duración del PA y por ende el intervalo QT. El subtipo 2 se refiere a mutaciones en el gen *KCNQ1*, las cuales ocasionan un incremento en la corriente de repolarización, provocando también un acortamiento del intervalo QT. El subtipo 3 está asociado con mutaciones en el gen *KCNJ2* que ocasionan una ganancia de función y un intervalo QT corto (**Tabla 2**).

El intervalo QT también puede ser corto por la reducción de las corrientes de despolarización. Los subtipos 4, 5 y 6 (**Tabla 2**) están asociados con mutaciones de pérdida de función en genes que codifican para diferentes subunidades del canal de calcio tipo L dependiente de voltaje, caracterizándose clínicamente por un intervalo QT anormalmente corto y una elevación del segmento ST en el ECG (Fernández-Falgueras et al., 2017).

Tabla 2. Síndrome de QT corto por subtipo genético. Tomado y modificado de Garcia-Elias & Benito, 2018.

Tipo	Gen	Proteína	Efecto funcional de la mutación	Frecuencia de casos (%)
SQTC1	<i>KCNH2</i>	K _v 11.1 (Subunidad alfa de I _{Kr})	Ganancia de función	15
SQTC2	<i>KCNQ1</i>	K _v 7.1 (Subunidad alfa de I _{Ks})	Ganancia de función	<1
SQTC3	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	Ganancia de función	<1
SQTC4	<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2 (Subunidad alfa 1C de I _{CaL})	Pérdida de función	<1
SQTC5	<i>CACNB2</i>	Proteína auxiliar de Ca _v 1.2 (Subunidad beta 2 de I _{CaL})	Pérdida de función	<1
SQTC6	<i>CACNA2D1</i>	Proteína auxiliar de Ca _v 1.2 (Subunidad alfa 2 de I _{CaL})	Pérdida de función	<1

1.5.4 Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) es una enfermedad rara pero potencialmente letal, se manifiesta comúnmente a temprana edad y se ha descrito que el género juega un papel importante en la etiología y patología de los pacientes con TVPC.

Descripción clínica

La TVPC se caracteriza por la presencia de un ECG normal en estado de reposo que bajo el estímulo adrenérgico induce arritmias ventriculares dando lugar a síncope, paro cardiaco y MS en niños y jóvenes sin cardiopatía estructural (**Figura 7**) (Fernández-Falgueras et al., 2017).



Figura 7. Patrón electrocardiográfico característico de TVPC cuando el paciente es sometido a estímulos adrenérgicos en las derivaciones I, II y III. Tomado de García-Elías & Benito, 2018.

La TVPC se agrupa dentro de las denominadas canalopatías y es una de las formas más severas de los trastornos arritmogénicos hereditarios (Fernández-Falgueras et al., 2017; García-Elías & Benito, 2018). Interesantemente, es la única canalopatía que no afecta directamente el PA, sino que está implicada en la regulación del Ca^{2+} intracelular.

Bases genéticas

A la fecha, se han identificado diversas mutaciones en 8 genes de susceptibilidad a TVPC (**Figura 4**). La TVPC puede presentar patrones de herencia autosómico dominante y autosómico recesivo. Se han reportado mutaciones en los genes que codifican para los receptores cardiacos tipo 2 de la rianodina (*RYR2*) y para calsecuestrina (*CASQ2*), considerándolas como las responsables de las formas autosómica dominante y recesiva respectivamente (García-Elías & Benito, 2018).

El receptor de rianodina es un canal intracelular de calcio que está localizado en el retículo sarcoplásmico, es responsable de regular la liberación del calcio al citoplasma desde el retículo sarcoplásmico durante la fase de meseta del PA. Se han encontrado alrededor de 150 mutaciones en *RYR2*. Cerca del 55-60% de los pacientes afectados clínicamente presenta alguna variante en este gen (Fernández-Falgueras et al., 2017)

En el año 2001, Lahat y colaboradores descubrieron una mutación en el gen que codifica para la proteína calsecuestrina (*CASQ2*), en una familia de origen árabe, afectada por un patrón de herencia autosómico recesivo. La calsecuestrina es una proteína reguladora del calcio en el retículo sarcoplásmico que participa modulando la respuesta del receptor de rianodina al calcio intracelular. Las mutaciones en el gen calsecuestrina están presentes en aproximadamente el 5% de los pacientes con TVPC (Lahat et al., 2001; García-Elías & Benito, 2018).

Otros genes causales de TVPC menos frecuentes son *CALM2*, *CALM3*, *TRDN*, *ANK2*, *KCNJ2* y *CALM1*. Estos genes en conjunto simbolizan sólo el 5% de los casos (Campuzano et al., 2015; Fernández-Falgueras et al., 2017).

1.5.5 Genes de interés

SCN5A

Este gen se localiza en el brazo corto (p) del cromosoma 3 en la posición 22.2, abarca más de 100 kb en el cromosoma y cuenta con 28 exones, de los cuales el exón 1 es una región no traducida (Park et al., 2012). *SCN5A* codifica para la subunidad α tipo 5 del canal de sodio dependiente de voltaje ($Na_v1.5$) y se expresa predominantemente en el corazón, donde tiene un papel clave en la generación y propagación del impulso cardíaco. Es un gen altamente conservado en animales y humanos (Veerman et al., 2015; Genetics Home Reference, 2019).

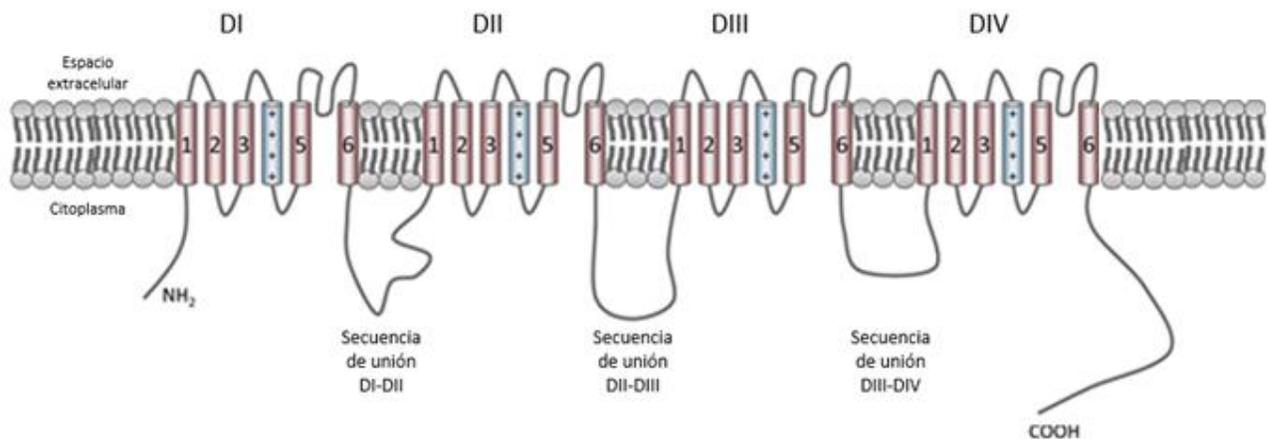


Figura 8. Estructura del canal $Na_v1.5$. La subunidad α del canal de Na^+ regulado por voltaje consta de 4 dominios homólogos (DI-DIV), cada uno de los cuales contiene 6 segmentos (S1-S6) que se extienden sobre la membrana, que están indicados por cilindros numerados; el cuarto segmento cargado positivamente, importante en la detección de voltaje, se representa en color azul. Tomado y modificado de Park et al., 2012; Veerman et al., 2015.

El canal $Na_v1.5$ controla la excitabilidad cardíaca al desencadenar el PA de los miocitos cardíacos y la velocidad de conducción del impulso eléctrico dentro del corazón. Estudios experimentales demuestran que $Na_v1.5$ interactúa con el citoesqueleto y también puede participar en el mantenimiento de la integridad estructural del corazón.

Por otra parte, se sabe que el canal $Na_v1.5$ se encuentra asociado a múltiples proteínas accesorias que regulan su función y localización (Veerman et al., 2015).

Las variantes en el gen *SCN5A* descritas hasta ahora se han relacionado con la MSC asociada con una serie de síndromes arrítmicos como el SBr, SQTL y recientemente CMD (Park et al., 2012; Rangaraju et al., 2018).

CASQ2

Este gen se localiza en el brazo corto (p) del cromosoma 1 en la posición 13.1, cubre alrededor de 70 kb en el cromosoma y cuenta con 11 exones. *CASQ2* codifica para una proteína llamada calsequestrina 2 y se expresa mayormente en el corazón (Genetics Home Reference, 2019).

La calsequestrina 2 es la proteína más abundante en el interior del retículo sarcoplásmico (RS); es la principal proteína que se une al Ca^{2+} y es capaz de almacenar calcio en una cantidad suficiente para permitir contracciones repetidas. Existen dos isoformas descritas de calsequestrina codificadas por genes distintos (*CASQ1* y *CASQ2*), la isoforma *CASQ1* se encuentra en músculo esquelético de contracción rápida y también en músculo esquelético de contracción lenta; la isoforma *CASQ2* se encuentra en el músculo esquelético de contracción lenta y en el músculo cardíaco, entre ellas comparten una gran similitud de aminoácidos y alrededor del 80% a nivel del mRNA, y hasta el momento no se han descrito diferencias funcionales (Lahat et al., 2001).

La calsequestrina es una glicoproteína ácida, que es capaz de formar polímeros lineales en respuesta a incrementos de la concentración de Ca^{2+} , se ha observado cerca de la membrana del RS aunque no está anclada a ésta, sino que se encuentra asociada a las proteínas juntina y triadina, que junto con el receptor de rianodina (RYR) forman un complejo multiproteico. La calsequestrina tiene una gran capacidad para ligar Ca^{2+} con una afinidad intermedia, además de que regula la función de la liberación de Ca^{2+} del RYR.

Se ha demostrado que las proteínas del RS también juegan un papel muy importante en el desarrollo y progresión de enfermedades cardíacas, donde la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca han sido las más estudiadas, sin embargo, la

calsecuestrina y el receptor de rianodina ya se han asociado con TVPC previamente (Reyes-Juárez & Zarain-Herzberg, 2006).

CACNA1C

Este gen se localiza en el brazo corto (p) del cromosoma 12 en la posición 13.33, codifica para la subunidad α_1 tipo C del canal de calcio dependiente de voltaje ($\text{Ca}_v1.2$) que es crítica para la fase de meseta de PA cardiaco, la excitabilidad celular y el acoplamiento de excitación-contracción. Pertenece a la familia de canales de calcio tipo L (LTCC), consta de 56 exones y se expresa predominantemente en endometrio, corazón y cerebro (Genetics Home Reference, 2019).

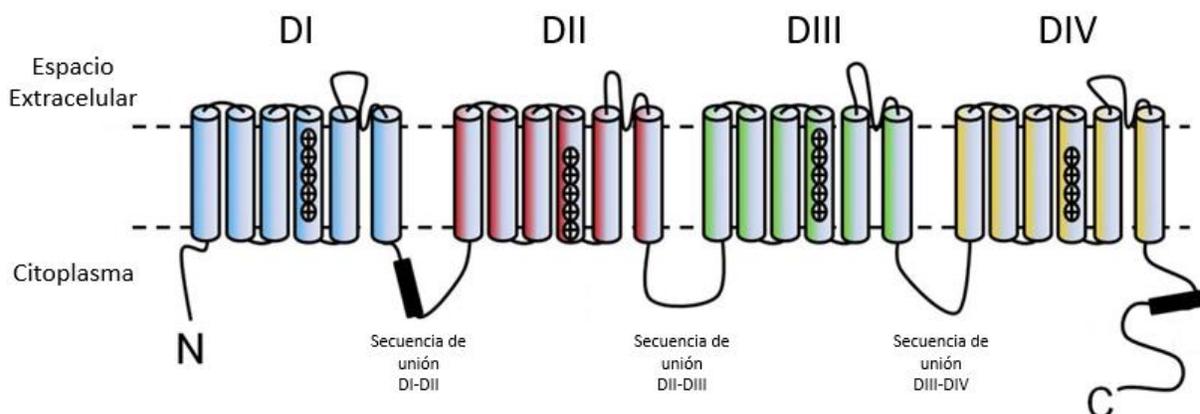


Figura 9. Estructura del canal $\text{Ca}_v1.2$. La subunidad α del canal de Ca^{2+} regulado por voltaje consta de 4 dominios (DI-DIV), cada uno de los cuales contiene 6 segmentos que se extienden sobre la membrana; el cuarto segmento cargado positivamente.

El canal $\text{Ca}_v1.2$ es responsable del transporte de iones calcio a las células, pues desempeñan un papel clave en la capacidad de una célula para generar y transmitir señales eléctricas.

Variantes de *CACNA1C* se han asociado con varios trastornos diferentes de arritmia cardiaca. Aunque no se ha descrito bien como estas variantes en *CACNA1C* pudieran estar causando CMH, se ha sugerido previamente que el manejo anormal del calcio se manifiesta en forma de hipertrofia (Boczek et al., 2015).

1.6 Cardiomiopatías

Las cardiomiopatías corresponden a un grupo heterogéneo de enfermedades miocárdicas asociadas a una disfunción mecánica y/o eléctrica que se deben a una variedad de causas, frecuentemente de origen genético que a menudo se pueden acompañar de dilatación o hipertrofia ventricular. Las cardiomiopatías primarias se limitan principalmente al músculo cardíaco, mientras que las cardiomiopatías secundarias generalmente son causadas por afecciones sistémicas con disfunción cardíaca asociada. En la clasificación de la Asociación Americana del Corazón (American Heart Association), las cardiomiopatías se clasifican según la causa, mientras que la clasificación de la Sociedad Europea de Cardiología se basa en una combinación de datos morfológicos y de hemodinámica (Weintraub et al., 2017).

Su etiología no es completamente conocida, pero se considera que están involucrados tanto factores intrínsecos como extrínsecos. Los factores intrínsecos incluyen variaciones genéticas, es decir, mutaciones que causan enfermedades y polimorfismos asociados a la susceptibilidad a enfermedades en los genes que desempeñan papeles clave en el rendimiento, la regulación y/o el mantenimiento de la función cardíaca. Los factores extrínsecos se refieren a complicaciones de otras enfermedades que pudieran causar un cuadro de cardiomiopatía como infección, isquemia, hipertensión y trastornos del metabolismo (Kimura, 2011).

Las cardiomiopatías como la cardiomiopatía dilatada (CMD), la cardiomiopatía hipertrófica (CMH) y la cardiomiopatía arritmogénica (CMA) se caracterizan por la presencia de alteraciones estructurales del corazón que conducen a arritmias relacionadas con la MSC. Estas arritmias a menudo son el resultado de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que se encuentran en el sarcómero, desmosomas y citoesqueleto (Fernández-Falgueras et al., 2017).

1.6.1 Cardiomiopatía dilatada

Descripción clínica

La cardiomiopatía dilatada (CMD) es una de las patologías del músculo cardíaco más frecuente en los países desarrollados. Se define por la presencia de disfunción sistólica y dilatación del ventrículo en ausencia de infarto de miocardio, lo cual es a menudo asociado con arritmia y MS. Con frecuencia, la enfermedad comienza en el ventrículo izquierdo, que es la principal cámara de bombeo del corazón. El músculo cardíaco comienza a dilatarse, lo que significa que se estira y se vuelve más delgado; en consecuencia, el interior de la cámara se agranda. El problema a menudo se propaga al ventrículo derecho y luego a las aurículas; la dilatación ventricular es generalmente severa y siempre se acompaña de hipertrofia (Esplugas et al., 2000; Laraudogoitia & Díez, 2006; Guttmann et al., 2015; Towbin, 2015). La CMD es uno de los principales motivos de insuficiencia cardíaca y la principal causa de trasplante cardíaco a nivel mundial (Shakeel et al., 2018).

Bases genéticas

La CMD se puede clasificar como familiar, primaria sin antecedentes familiares o secundaria (causada por otras condiciones). La forma familiar es considerada responsable de cerca del 20% de los casos, de los cuales aproximadamente el 90% son autosómicos dominantes, mientras que el 10% son autosómicos recesivos o ligados al cromosoma X con penetrancia incompleta y expresividad variable (Charron et al., 2010). Existe una considerable heterogeneidad en los genes reportados como causales de CMD, lo que hace que este trastorno sea genéticamente complejo (Weintraub et al., 2017).

Mutaciones relacionadas con CMD se han identificado en genes que codifican para una amplia gama de proteínas, particularmente aquellas que afectan la función del sarcómero, la homeostasis de electrolitos y la estructura no sarcomérica. Las mutaciones con mayor frecuencia se ubican en el gen *TTN* que codifica para titina,

el componente principal del sarcómero. Se ha reportado que mutaciones en este gen pueden estar causando el 25% de todos los casos de CMD con herencia autosómico dominante (Braunwald, 2017).

Polimorfismos en los genes expresados en cardiomiocitos se han asociado con CMD. Las variaciones de secuencia en los elementos del disco Z, tales como Trp4Arg de *CSRP3* y Asn654Lys de *NBLT*, se han reportado en población general europea y en población japonesa, respectivamente. Por lo tanto, éstos son polimorfismos asociados a CMD y no mutaciones que causan CMD; sin embargo, ambos polimorfismos son raros debido a su baja frecuencia, cuya detección en pacientes con CMD podría tener, aunque limitada, una significancia diagnóstica (Kimura, 2011). Otro ejemplo de polimorfismo asociado con CMD es Thr326Ile de *BMP10*, que se encontró en 2 de 46 pacientes japoneses con CMD acompañado de hipertensión. *BMP10* es un miembro de la familia TGF y se expresa específicamente en el cardiomiocito. Thr326Ile es una variante rara (frecuencia de 0.13%) en población japonesa aparentemente sana, pero es un factor de riesgo significativo para CMD en presencia de hipertensión (Kimura, 2011).

1.6.2 Cardiomiopatía hipertrófica

Descripción clínica

La cardiomiopatía hipertrófica (CMH) es una de las cardiomiopatías hereditarias observadas con mayor frecuencia, caracterizada principalmente por la presencia de hipertrofia en el ventrículo izquierdo. La CMH es una causa frecuente de MSC entre los jóvenes, sobre todo en deportistas (Kimura, 2011).

La manifestación de la CMH es muy variable y oscila entre un curso clínico asintomático durante toda la vida o presencia de dolor torácico, disnea de esfuerzo, síncope, intolerancia progresiva al ejercicio o MS en el primer episodio, pueden

manifestarse a cualquier edad. La CMH es un trastorno sin patrón específico geográfico, étnico o sexual (Ackerman et al., 2013; Young et al., 2018).

Bases genéticas

En el 50% de los casos con CMH, se trata de formas familiares que se transmiten en forma autosómica dominante y es causada principalmente por mutaciones en los genes que codifican para proteínas sarcoméricas cardíacas (Magi et al., 2017). Se han descrito también patrones de herencia autosómico recesivo y modos de herencia ligados a X, pero son raros (Braunwald, 2017). Un 45% son formas idiopáticas y un 5% esporádicas.

Hasta la fecha se han involucrado por lo menos 27 genes de susceptibilidad a CMH, con centenares de mutaciones identificadas (Ackerman et al., 2013).

Los genes principales involucrados (y las proteínas para las cuales codifican) son los siguientes: *MYH7* (cadena pesada de β -miosina), *TPM* (α -tropomiosina), *TNNT2* (troponina T cardíaca), *MYBPC3* (proteína C de unión a miosina cardíaca), *MYL2* (cadena ligera reguladora de miosina), *MYL3* (cadena ligera esencial de miosina), *TNNI3* (troponina I cardíaca), *ACTC1* (α -actina cardíaca), *MYH6* (cadena pesada de α -miosina), *TNNC1* (troponina C cardíaca) y *PRKAG2* (subunidad gamma 2 de la proteína cinasa activada por AMP) (Magi et al., 2017). Entre los genes causales conocidos, *MYH7* y *MYBPC3* son los 2 más comunes, siendo responsables en conjunto de aproximadamente la mitad de los pacientes con CMH familiar (Braunwald, 2017; Magi et al., 2017). Mutaciones en *TNN2*, *TNNI3* y *TRPM1* son relativamente poco comunes en casos de CMH y en conjunto son causales de menos del 10% de los casos. Mutaciones en *ACTC1*, *MYL2*, *MYL3* y *CSRP3* también son poco comunes.

Se han reportado otras variantes genéticas asociadas con CMH, que incluyen mutaciones en el gen *MYOZ2* (miocenina 2) y *ACTN2* (α -actinina 2), que es el componente principal del disco Z. Las mutaciones antes mencionadas, aunque son poco comunes, apoyan la teoría de que mutaciones en proteínas del disco Z sí

pueden conducir a CMH. Mutaciones en *TTN* (titina) y *TCAP* (teletonina) también han sido reportadas como causales de CMH pero ocurren en casos esporádicos y en familias pequeñas (Braunwald, 2017).

1.6.3 Cardiomiopatía arritmogénica

La cardiomiopatía arritmogénica (CMA) es un trastorno hereditario del músculo cardíaco que predispone a la muerte súbita cardíaca, especialmente en pacientes jóvenes y atletas. Las características patológicas incluyen la pérdida de miocitos y la sustitución fibrovascular, es decir, la lesión característica de CMA es la sustitución del miocardio ventricular por tejido fibroso (Guttman et al., 2015; Ganeva et al., 2017).

Es una cardiomiopatía de unión de célula a célula, causada por anomalías de desmosomas cardiacos determinadas genéticamente, que conducen a la separación de miocitos y a la alteración de la transducción de señales intracelularmente (Ganeva et al., 2017).

Descripción clínica

La CMA se manifiesta fundamentalmente en la adolescencia o en la edad adulta; además, la mayoría de los estudios informaron una mayor incidencia y una mayor gravedad de la CMA entre hombres. Esto se atribuye a la influencia directa de las hormonas sexuales en la expresión fenotípica de la enfermedad o a las diferencias relacionadas con el sexo en la cantidad e intensidad del ejercicio realizado (Francisco et al., 2007; Ganeva et al., 2017).

Su historia natural puede cursar desde asintomática, con arritmias ventriculares, fallo ventricular y biventricular, con amplio riesgo de MS. El diagnóstico de la CMA no se basa en una única prueba estándar de oro, sino que se logra mediante un sistema de puntuación que abarca factores familiares y genéticos, anomalías del

ECG, arritmias y alteraciones ventriculares estructurales y funcionales. El objetivo principal del tratamiento es la prevención de la muerte súbita cardíaca (Ganeva et al., 2017).

Bases genéticas

A la fecha, variantes patogénicas asociadas con CMA han sido identificadas en 14 genes: *JUP*, *DSP*, *PKP2*, *DSG2*, *DSC2*, *TMEM43*, *LMNA*, *DES*, *CTNNA3*, *PLN*, *TGFB3*, *TTN*, *SCN5A* y *CDH2* (Guttman et al., 2015; Ganeva et al., 2017).

Los 5 primeros genes codifican para proteínas relacionadas con los desmosomas, los cuales son estructuras celulares complejas responsables de la adhesión y señalización de la célula. Por lo tanto, mutaciones en estos genes son la principal causa de CMA y tienen un papel clave en la patogénesis.

Aproximadamente 30-50% de los pacientes con CMA tienen una mutación en uno de los siguientes genes: *JUP*, *DSP*, *PKP2*, *DSG2*, y *DSC2*, que codifican para proteínas asociadas a desmosomas. En la mayoría de los casos, la herencia es de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable. Además, se han encontrado en familias con CMA, mutaciones en otros genes no codificantes para proteínas asociadas a desmosomas. Tales hallazgos en genes vinculados previamente a otras formas de cardiomiopatías representan una superposición entre CMA y CMD tanto a nivel clínico como genético.

Finalmente, es importante señalar que los estudios genéticos han podido identificar una mutación causal en hasta el 60% de los casos de CMA. En el estudio más grande de pacientes con CMA y familiares hasta la fecha, 37% de los casos fueron negativos para mutaciones en genes codificantes para proteínas asociadas a desmosomas o en *TMEM43* o *PLN*. También es posible que la enfermedad en esos individuos sea el resultado de una combinación de variantes genéticas de baja penetrancia y factores ambientales que podrían apuntar a una forma oligogénica de CMA (Guttman et al., 2015; Ganeva et al., 2017).

1.6.4 Genes de interés

NOTCH1

Este gen se localiza en el brazo largo (q) del cromosoma 9 en la posición 34.3 y se expresa en todos los tejidos incluyendo el corazón (Genetics Home Reference, 2019). Los genes *NOTCH* codifican para receptores transmembranales de aproximadamente 300 kDa, cuya estructura está altamente conservada. Es bien sabido que la vía de señalización NOTCH está involucrada en el control de diversos eventos durante el desarrollo de las células como son la proliferación, el crecimiento, la migración, la diferenciación y la muerte celular programada (Santos et al., 2006).

Estudios han demostrado que las variantes en NOTCH pueden provocar el desarrollo de cardiomiopatías e insuficiencia cardiaca (High & Epstein, 2008; de la Pompa & Epstein, 2013; Luxán et al., 2013).

TCAP

Este gen se localiza en el brazo largo (q) del cromosoma 17 en la posición 12, codifica para una proteína de 19 kDa llamada teletonina ubicada en el disco Z y es parte del complejo sensible al estiramiento del disco Z del cardiomiocito (Genetics Home Reference, 2019).

La teletonina ancla la región N-terminal de la titina en el disco Z del sarcómero mediante la unión a dos dominios de la titina. Por lo tanto, la teletonina juega un papel importante en el ensamblaje de miofibrillas y en el desarrollo muscular y la regulación funcional. La TCAP interactúa con proteínas como calsarcina y MinK que son esenciales para la organización estructural del sarcómero cardiaco y el sensor de estiramiento del cardiomiocito (Hirtle-Lewis et al., 2013).

Variantes en *TCAP* han sido implicadas previamente en la patogénesis de CMD y CMH (Bos et al., 2006).

1.7 SNPs

Los polimorfismos de un sólo nucleótido, frecuentemente llamados SNPs, son un cambio de una base por otra en un lugar específico del genoma y, por definición, se encuentran en más de un 1% de la población. Los SNPs son el tipo más común de variación genética entre las personas y se utilizan como marcadores en los estudios de asociación para detectar qué regiones del genoma humano pueden estar involucradas con la enfermedad. Los SNP no sinónimos, los cuales conducen a un cambio de aminoácido en el producto proteico, son de gran interés, ya que pudieran estar afectando la actividad biológica de la proteína (Ng & Henikoff, 2003).

Selección de SNPs

Todos los SNPs analizados cumplieron con 3 criterios de selección: estar presentes en varios pacientes de canalopatías o cardiomiopatías, ser de relativamente alta frecuencia (del 3 al 14%) en población latina reportada en 1000 genomas y ser una variante no sinónima.

Los 6 SNPs seleccionados para este análisis fueron encontrados por secuenciación de nueva generación (NGS) utilizando un panel TruSight Illumina.

Los SNPs rs41315493 del gen *SCN5A*, rs10801999 de *CASQ2* y rs185788586 de *CACNA1C* se encontraron en pacientes con diagnóstico de canalopatías; los tres SNPs restantes, rs61751489 y rs76371972 de *NOTCH1* y rs45578741 de *TCAP* en pacientes con diagnóstico de cardiomiopatías.

Tabla 3. Información general de cada SNP estudiado.

SNP	Gen	Cambio de nucleótido	Exón	Cambio de aminoácido
rs41315493	<i>SCN5A</i>	6045C>A	28	Val1950Met
rs61751489	<i>NOTCH1</i>	6853C>T	30	Val2285Ile
rs76371972	<i>NOTCH1</i>	4823C>T	25	Arg1608His
rs10801999	<i>CASQ2</i>	226C>T	1	Val76Met
rs185788586	<i>CACNA1C</i>	5665C>T	35	Arg1889Cys
rs45578741	<i>TCAP</i>	316C>T	1	Arg106Cys

2. JUSTIFICACIÓN

Enfermedades cardiovasculares como las canalopatías y cardiomiopatías son responsables de provocar MSC en población joven (<35 años), poseen un componente genético en el que mutaciones causales, en conjunto con los polimorfismos, pudieran estar afectando de manera importante el fenotipo.

Por ello, surge el interés de analizar la participación de 6 SNPs no sinónimos, frecuentes en población latina (MXL), encontrados por NGS en pacientes de canalopatías y cardiomiopatías en la susceptibilidad al desarrollo de estas enfermedades en población mexicana.

3. HIPÓTESIS

Los SNPs rs41315493 del gen *SCN5A*, rs61751489 y rs76371972 de *NOTCH1*, rs10801999 de *CASQ2*, rs185788586 de *CACNA1C* y rs45578741 de *TCAP* se asocian a la susceptibilidad al desarrollo de canalopatías y/o cardiomiopatías en población mexicana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar los SNPs rs41315493 (*SCN5A*), rs61751489 y rs76371972 (*NOTCH1*), rs10801999 (*CASQ2*), rs185788586 (*CACNA1C*) y rs45578741 (*TCAP*) en controles del estudio Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA), en casos de canalopatías y casos de cardiomiopatías.

4.2 Objetivos Específicos

1. Analizar los seis SNPs en controles del estudio GEA, casos de canalopatías y casos de cardiomiopatías.
2. Calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de los 6 SNPs en los grupos estudiados.
3. Evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada SNP en todos los grupos.
4. Comparar las frecuencias de los SNPs obtenidas en los controles vs los distintos casos y analizar su posible asociación a estas enfermedades.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 Población de Estudio

5.1.1 Controles

En este estudio, se seleccionaron al azar 476 controles del estudio GEA. El estudio GEA fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH) y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Los participantes firmaron una carta de consentimiento informado antes de su inclusión en el estudio. Los controles del estudio GEA son 1600 mexicanos mestizos, son hombres y mujeres entre 35 y 74 años. Se midieron parámetros antropométricos y bioquímicos y se realizó una tomografía axial de tórax y abdomen. Los participantes respondieron cuestionarios estandarizados y validados para obtener información sobre el historial familiar y médico, el consumo de alcohol y tabaco, los hábitos dietéticos y actividad física (Villarreal-Molina et al., 2012).

5.1.2 Casos

5.1.2.1 Canalopatías

Se incluyeron un total de 67 pacientes, de los cuales 33 individuos fueron diagnosticados con síndrome de QT largo, 4 con síndrome de Brugada, 6 con taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, 14 con disfunción del nodo sinusal, 2 con taquicardia ventricular idiopática, 2 con taquicardia ventricular monomórfica, 6 con canalopatías menores y no tuvimos casos con síndrome de QT corto.

5.1.2.2 Cardiomiopatías

Se estudiaron 96 casos de cardiomiopatías, de los cuales 59 fueron diagnosticados con cardiomiopatía dilatada y los 37 pacientes restantes fueron diagnosticados con cardiomiopatía hipertrófica.

5.2 Criterios de Inclusión

A. Controles GEA

Todos los participantes del estudio GEA son mexicanos mestizos en 3 generaciones y no están relacionados. Un mexicano mestizo se define como un individuo nacido en México, descendiente de habitantes de dicha región y con una proporción cercana a 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y 4% de genes africanos (Luis-Montoya et al., 2007).

Los participantes del estudio GEA fueron individuos aparentemente sanos y sin antecedentes familiares de enfermedad arterial coronaria (EAC) prematura, seleccionados a partir de la población que acude regularmente a los bancos de sangre (Villarreal-Molina et al., 2012).

B. Casos de canalopatías y cardiomiopatías

Todos los casos fueron reclutados y diagnosticados en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH) en la Ciudad de México.

5.3 Criterios de Exclusión

A. Controles GEA

Los criterios de exclusión incluyeron insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedad hepática, renal, tiroidea u oncológica (Villareal-Molina et al., 2012).

B. Casos de canalopatías

Se excluyeron aquellos pacientes que hubieran presentado eventos cardiovasculares agudos en los tres meses previos al estudio y aquellos que presentaran anomalías estructurales en el corazón.

C. Casos de cardiomiopatías

Se excluyeron aquellos pacientes cuya CMD fuera de origen secundario.

5.4 Genotipificación de los SNPs mediante PCR en tiempo real

Se prepararon diluciones a una concentración de 10 ng/ μ L de cada muestra a partir del DNA extraído por kits comerciales (QIAGEN). La cuantificación de la concentración se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

La determinación de los genotipos de los SNPs (rs41315493, rs61751489, rs76371972, rs10801999, rs185788586 y rs45578741) se realizó mediante PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Ensayos utilizados para la genotipificación de cada uno de los SNPs

SNPs	Identificador del ensayo (Assay ID)
rs41315493	C_86460493
rs61751489	C_90123839
rs76371972	C_103776258
rs10801999	C_26680141
rs185788586	Por diseño
rs45578741	Por diseño

Fundamento de la técnica

El PCR en tiempo real es un método específico y sensible cuyo objetivo es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante la reacción de PCR y el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. La emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado (Tamay de Dios et al., 2013).

Este método sigue el principio conocido como “Transferencia de energía de resonancia fluorescente” (FRET), el cual consiste en transferir energía de un donador fluorescente a un aceptor (apagador o *quencher*). El empleo de sondas TaqMan garantiza la especificidad de la detección de polimorfismos o mutaciones, ya que se emplean dos fluorocromos (VIC y FAM), uno acoplado a una sonda con la base correspondiente al alelo común y el otro a la sonda con la base correspondiente al alelo raro (Gibson, 2006).

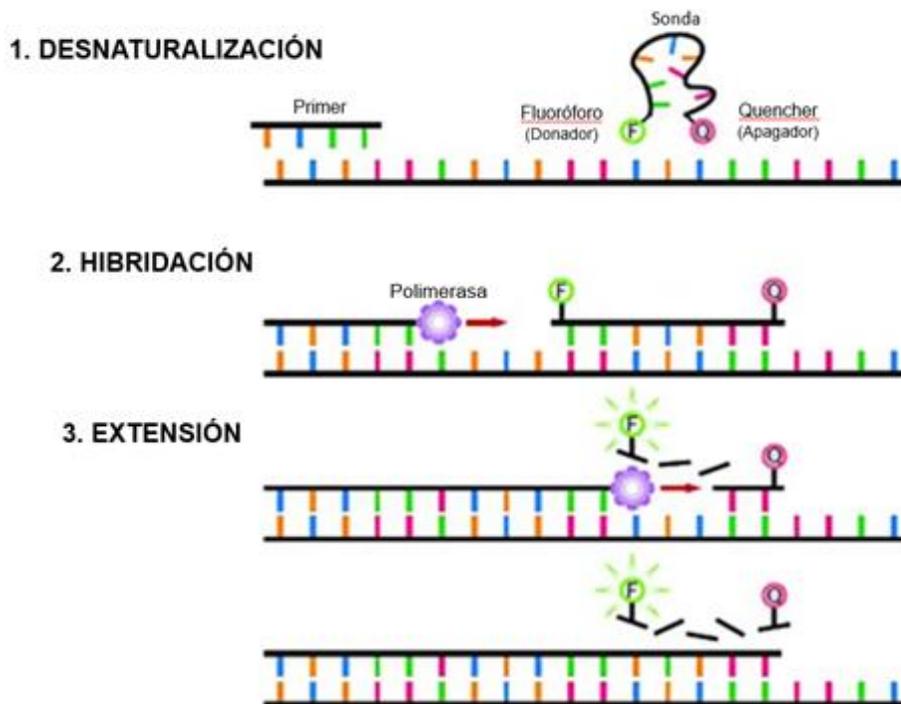


Figura 10. Representación gráfica de la fluorescencia emitida por las sondas TaqMan.

Mientras la sonda no hibride con su secuencia blanco, los fluorocromos acoplados a la sonda en sus extremos 5' y 3' se encuentran cercanos uno del otro y no se emite fluorescencia por el fenómeno de FRET; cuando la sonda hibrida con su secuencia blanco, la polimerasa hidroliza la sonda en el extremo 5', logrando que la fluorescencia emitida por el donador sea capturada por el equipo (**Figura 10**) (Becerril-Parra et al., 2015).

Preparación de la reacción de PCR en tiempo real

Se preparó en un tubo de 0.6 mL una mezcla de reacción utilizando 250 µL de *LightCycler® 480 Probes Master* (Laboratorios Roche) y 10 µL de sonda TaqMan (Applied biosystems) para 100 pozos. Para controles GEA y casos de canalopatías, en cada pozo se agregaron 2.6 µL de la mezcla previamente preparada cuidando de cubrir cada columna con aluminio para evitar su exposición con la luz; después se añadieron 2.5 µL de la dilución de DNA. Por último, se selló la placa con una tapa adhesiva y se centrifugó a 3000 rpm por 2 minutos.

Para casos de cardiomiopatías, debido a que las muestras de DNA eran recientes, se utilizó solo 1 uL de la muestra de DNA para las reacciones de PCR en tiempo real.

Se incluyeron para cada SNP tres controles positivos (uno para cada genotipo) y tres controles negativos (sin muestra de DNA). Se utilizó el termociclador Light Cycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Switzerland), utilizando el programa Endpoint Genotyping (PCR Read 96-II) y la aplicación Analysis Endpoint Genotyping para la determinación de los genotipos.

5.5 Análisis estadístico: Equilibrio de Hardy-Weinberg, estudio caso-control y análisis *in silico*

La determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg es importante debido a que funciona como control de calidad en los estudios de genética de poblaciones.

El principio del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) establece que, en una población suficientemente grande en la que los apareamientos se producen al azar, las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación, a menos que algún otro proceso (migración, mutación o selección) actúe sobre ellas. Así, el equilibrio de HW determina que si p es la frecuencia de un alelo (A) y q es la frecuencia del alelo alternativo (a) para un locus bialélico, entonces la frecuencia esperada del equilibrio de HW será p^2 para el genotipo homocigoto común (AA), $2pq$ para el genotipo heterocigoto (Aa) y q^2 para el genotipo homocigoto raro (aa). Las tres proporciones genotípicas deben sumar 1, al igual que las frecuencias alélicas (Edwards, 2008; Hernández-Rodríguez & Trejo-Medinilla, 2014).

Se realizó el análisis del equilibrio de HW, utilizando un programa disponible en internet (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>), donde se calculó el valor de P empleando una prueba Chi cuadrada (X^2). El análisis de asociación caso-control para los SNPs estudiados se realizó mediante regresiones logísticas, utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 22.0; se obtuvieron los valores de OR, el intervalo de confianza (IC) del 95% y se consideró como significativo un valor de $P < 0.05$. El análisis *in silico* se realizó utilizando SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) un programa disponible en internet (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/code.html>) que predice si una sustitución de aminoácido afecta a la función de la proteína; SIFT considera la posición en la que ocurrió el cambio y el tipo de cambio de aminoácido (Ng & Henikoff, 2003). También se utilizó el software PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) una herramienta disponible a través de un servidor web (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), que predice el posible impacto de las sustituciones de aminoácidos en la estabilidad y función de las proteínas humanas; dicha predicción se basa en una serie de características que comprenden la secuencia, la información filogenética y estructural de la sustitución (Adzhubei et al., 2015).

Para la búsqueda en la literatura se utilizó la base de datos ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) que es un archivo público de acceso gratuito sobre las relaciones entre las variantes genómicas y los fenotipos (Harrison et al., 2016).

6. RESULTADOS

Para este estudio se analizaron un total de 639 participantes de entre 5 y 88 años que cumplieron con los criterios de inclusión. De ellos, 476 fueron controles del estudio GEA, 67 casos de canalopatías y 96 casos de cardiomiopatías. Las características de cada uno de los grupos de estudio se resumen en la **Tabla 5**, donde se observa que los casos de canalopatías constituyen un grupo de individuos jóvenes.

Tabla 5. Características de la población de estudio

Población de estudio	Edad (años) Media ± DE	Sexo H/M n (%)
Controles GEA	52.64 ± 9.55	224(47) / 252(53)
Casos de canalopatías SQTL	24.53 ± 13.30 23.90 ± 13.09	33(49) / 34(51) 12(36) / 21(64)
Casos de cardiomiopatías CMD CMH	47.05 ± 17.88 47.76 ± 16.54 45.75 ± 20.34	61(64) / 35(36) 40(68) / 19(32) 21(57) / 16(43)

La **Tabla 6** presenta las frecuencias del alelo menor (MAF) obtenidas para cada uno de los SNPs en controles y casos, así como las MAF reportadas en 1000 genomas para distintas poblaciones del mundo. El SNP rs10801999 (CASQ2) fue el de mayor

frecuencia en la población de controles estudiados, con 15.4% y el SNP rs41315493 (*SCN5A*) fue el de menor frecuencia con 2.6% en esta misma población.

Tabla 6. Frecuencia del alelo menor (MAF) obtenida y reportada para cada SNP en 1000 genomas

SNP	MAF reportadas en 1000 genomas			Frecuencia del Alelo Menor (MAF)		
	Latinos (MXL)	Europeos	Africanos	Controles GEA	Casos Canalopatías	Casos Cardiomiopatías
rs41315493 (V1950M) <i>SCN5A</i>	0.031	0.000	0.005	0.026	0.030	0.052
rs61751489 (V2285I) <i>NOTCH1</i>	0.133	0.017	0.001	0.145	0.136	0.182
rs76371972 (R1608H) <i>NOTCH1</i>	0.094	0.001	0.001	0.075	0.075	0.101
rs10801999 (V76M) <i>CASQ2</i>	0.141	0.003	0.002	0.154	0.172	0.167
rs185788586 (R1889C) <i>CACNA1C</i>	0.062	0.001	0.000	0.074	0.068	0.073
rs45578741 (R106C) <i>TCAP</i>	0.109	0.004	0.001	0.142	0.172	0.211

En la **Tabla 7** se muestran los resultados de la genotipificación para cada SNP en controles del estudio GEA y en casos, obtenidos mediante PCR en tiempo real; también se incluyen los genotipos esperados. Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los SNP en casos y en controles; los valores de *P* obtenidos se muestran en la **Tabla 7**. Dos de los SNPs no se encontraron en equilibrio de HW: el SNP rs76371972 en controles y el SNP rs185788586 en casos de cardiomiopatías.

Tabla 7. Frecuencia genotípica, genotipos obtenidos y esperados en la población de estudio y equilibrio de Hardy-Weinberg de los seis SNPs seleccionados

SNP	Controles GEA (% Frecuencia) Genotipos obtenidos/esperados n=476		Casos (% Frecuencia) Genotipos obtenidos/esperados		Equilibrio de Hardy-Weinberg		
			Canalopatías n=67	Cardiomiopatías n=96	Controles GEA	Casos Canalopatías	Casos Cardiomiopatías
rs41315493 (V1950M) <i>SCN5A</i>	CC	(94.79) 437/437.31	(93.94) 62/62.06	(89.58) 86/86.26	0.566	0.800	0.590
	CA	(5.21) 24/23.38	(6.06) 4/3.88	(10.42) 10/9.48			
	AA	(0.00) 0/0.31	(0.00) 0/0.06	(0.00) 0/0.26			
	Total	461	66	96			
rs61751489 (V2285I) <i>NOTCH1</i>	CC	(74.05) 351/346.90	(75.76) 50/49.23	(67.71) 65/64.19	0.128	0.419	0.579
	CT	(23.00) 109/117.20	(21.21) 14/15.55	(28.12) 27/28.62			
	TT	(2.95) 14/9.90	(3.03) 2/1.23	(4.17) 4/3.19			
	Total	474	66	96			
rs76371972 (R1608H) <i>NOTCH1</i>	CC	(86.29) 409/405.66	(84.85) 56/56.38	(81.91) 77/75.96	0.027	0.505	0.238
	CT	(12.45) 59/65.68	(15.15) 10/9.24	(15.96) 15/17.08			
	TT	(1.26) 6/2.66	(0.00) 0/0.38	(2.13) 2/0.96			
	Total	474	66	94			
rs10801999 (V76M) <i>CASQ2</i>	CC	(72.21) 343/340.22	(70.15) 47/45.97	(68.75) 66/66.67	0.327	0.378	0.624
	CT	(24.84) 118/123.56	(25.37) 17/19.05	(29.17) 28/26.67			
	TT	(2.95) 14/1.22	(4.48) 3/1.97	(2.08) 2/2.67			
	Total	475	67	96			
rs185788586 (R1889C) <i>CACNA1C</i>	CC	(85.89) 408/407.58	(86.36) 57/57.31	(87.50) 84/82.51	0.777	0.552	0.025
	CT	(13.47) 64/64.84	(13.64) 9 (8.39)	(10.42) 10/2.98			
	TT	(0.64) 3/2.58	(0.00) 0/0.31	(2.08) 2/0.51			
	Total	475	66	96			
rs45578741 (R106C) <i>TCAP</i>	CC	(73.21) 347/348.61	(67.16) 45/45.97	(61.05) 58/59.21	0.544	0.403	0.455
	CT	(25.10) 119/115.78	(31.34) 21/19.05	(35.79) 34/31.58			
	TT	(1.69) 8/9.61	(1.50) 1/1.97	(3.16) 3/4.21			
	Total	474	67	95			

La **Tabla 8** presenta los resultados del análisis de asociación a canalopatías, mediante una regresión logística ajustada por edad y sexo y una prueba exacta de Fisher; en ambas se utilizó un modelo dominante. Como se puede observar en esta tabla, no encontramos diferencias significativas para ninguno de los SNPs.

Tabla 8. Análisis de asociación de los SNPs a canalopatías

SNP	OR	IC	P*	P^
rs41315493 (V1950M) <i>SCN5A</i>	0.587	0.104-3.313	0.768	0.547
rs61751489 (V2285I) <i>NOTCH1</i>	0.737	0.271-2.005	0.881	0.550
rs76371972 (R1608H) <i>NOTCH1</i>	1.446	0.465-4.496	0.707	0.524
rs10801999 (V76M) <i>CASQ2</i>	1.454	0.567-3.728	0.772	0.436
rs185788586 (R1889C) <i>CACNA1C</i>	0.626	0.183-2.141	1.000	0.455
rs45578741 (R106C) <i>TCAP</i>	0.586	0.222-1.545	0.308	0.280

P*: Exacta de Fisher; P^: Regresión logística bajo un modelo dominante, ajustado por edad y sexo.

La **Tabla 9** muestra los resultados del análisis de asociación a SQTl empleando un modelo dominante. Se observa que la variante del gen *CASQ2* presenta una tendencia de asociación a SQTl, con un valor de OR de riesgo (OR=2.415) y un valor de $P=0.077$; sin embargo, al ajustar por edad y sexo esta tendencia observada se pierde ($P=0.151$).

Tabla 9. Análisis de asociación de los SNPs a SQT

SNP	OR	IC	P*	P^
rs41315493 (V1950M) <i>SCN5A</i>	0.313	0.023-4.251	1.000	0.383
rs61751489 (V2285I) <i>NOTCH1</i>	1.487	0.454-4.878	0.105	0.512
rs76371972 (R1608H) <i>NOTCH1</i>	0.989	0.220-4.441	0.441	0.989
rs10801999 (V76M) <i>CASQ2</i>	2.415	0.724-8.052	0.077	0.151
rs185788586 (R1889C) <i>CACNA1C</i>	0.723	0.159-3.296	1.000	0.675
rs45578741 (R106C) <i>TCAP</i>	1.097	0.339-3.554	0.232	0.877

P*: Exacta de Fisher; P^: Regresión logística bajo un modelo dominante, ajustado por edad y sexo.

En la **Tabla 10** se presentan los resultados del análisis de asociación a cardiomiopatías empleando un modelo dominante. La variante del gen *SCN5A* presentó una tendencia de asociación a cardiomiopatías (OR: 2.217) con una $P=0.061$; esta tendencia se mantuvo después de ajustar por edad y sexo ($P=0.056$). La variante del gen *TCAP* también se asoció a riesgo de desarrollar cardiomiopatías (OR: 1.725) con una P significativa de 0.025, la cual, de manera interesante al ajustar por edad y sexo, mantuvo su significancia ($P=0.029$).

Tabla 10. Análisis de asociación de los SNPs a cardiomiopatías

SNP	OR	IC	P*	P^
rs41315493 (V1950M) <i>SCN5A</i>	2.217	0.979-5.018	0.061	0.056
rs61751489 (V2285I) <i>NOTCH1</i>	1.308	0.791-2.164	0.209	0.296
rs76371972 (R1608H) <i>NOTCH1</i>	1.329	0.718-2.458	0.264	0.365
rs10801999 (V76M) <i>CASQ2</i>	1.199	0.722-1.990	0.535	0.483
rs185788586 (R1889C) <i>CACNA1C</i>	0.955	0.474-1.922	0.748	0.897
rs45578741 (R106C) <i>TCAP</i>	1.725	1.056-2.819	0.025	0.029

P*: Exacta de Fisher; P^: Regresión logística bajo un modelo dominante, ajustado por edad y sexo.

La **Tabla 11** presenta los resultados del estudio de asociación a CMD bajo un modelo dominante, donde se observa que la variante del gen *SCN5A* presentó una tendencia de asociación a riesgo de CMD (OR: 2.402) con una $P=0.071$, que después de ajustar por edad y sexo, mantuvo este comportamiento ($P=0.067$).

Tabla 11. Análisis de asociación de los SNPs a CMD

SNP	OR	IC	P*	P [^]
rs41315493 (V1950M) <i>SCN5A</i>	2.402	0.940-6.135	0.071	0.067
rs61751489 (V2285I) <i>NOTCH1</i>	1.306	0.713-2.389	0.438	0.387
rs76371972 (R1608H) <i>NOTCH1</i>	1.641	0.813-3.309	0.166	0.167
rs10801999 (V76M) <i>CASQ2</i>	1.179	0.639-2.176	0.878	0.598
rs185788586 (R1889C) <i>CACNA1C</i>	1.239	0.570-2.695	0.843	0.589
rs45578741 (R106C) <i>TCAP</i>	1.613	0.893-2.914	0.166	0.113

P*: Exacta de Fisher; P[^]: Regresión logística bajo un modelo dominante, ajustado por edad y sexo.

De igual manera se realizó el estudio de asociación a CMH, empleando un modelo dominante como se muestra en la **Tabla 12**. La variante del gen *TCAP* se asoció a riesgo de CMH (OR: 2.054) con una *P* significativa de 0.033; sin embargo, al realizar el ajuste por edad y sexo, esta variante presentó una tendencia de asociación a CMH (*P*=0.064).

Tabla 12. Análisis de asociación de los SNPs a CMH

SNP	OR	IC	P*	P^
rs41315493 (V1950M) SCN5A	1.703	0.461-6.289	0.442	0.424
rs61751489 (V2285I) NOTCH1	1.361	0.619-2.997	0.247	0.443
rs76371972 (R1608H) NOTCH1	0.89	0.297-2.666	1.000	0.835
rs10801999 (V76M) CASQ2	1.196	0.543-2.631	0.347	0.657
rs185788586 (R1889C) CACNA1C	0.452	0.104-1.962	0.455	0.289
rs45578741 (R106C) TCAP	2.054	0.960-4.399	0.033	0.064

P*: Exacta de Fisher; P^: Regresión logística bajo un modelo dominante, ajustado por edad y sexo.

Por último, se realizó el análisis *in silico* de la posible implicación funcional de los SNPs estudiados, utilizando dos programas diferentes (Sift y Polyphen-2) (**Tabla 13**). También se hizo una búsqueda en la literatura de los 6 SNPs estudiados y su asociación a entidades clínicas, utilizando la plataforma ClinVar (**Tabla 13**).

Tabla 13. Análisis *in silico* y reportes en la literatura

SNP	SIFT	POLYPHEN	ClinVar
rs41315493 (V1950M) SCN5A	Dañina	Probablemente dañina	Síndrome de QT largo 2 fibrilación auricular Fenotipo cardiovascular
rs61751489 (V2285I) NOTCH1	Benigna	Benigna	Síndrome Adams-Oliver 5 Fenotipo cardiovascular
rs76371972 (R1608H) NOTCH1	Benigna	Benigna	Síndrome Adams-Oliver 5 Fenotipo cardiovascular
rs10801999 (V76M) CASQ2	Benigna	Benigna	TVPC Fenotipo cardiovascular
rs185788586 (R1889C) CACNA1C	Benigna	Probablemente benigna	Síndrome de Timothy SQT SBr Fenotipo cardiovascular
rs45578741 (R106C) TCAP	Dañina	Probablemente dañina	CMD CMH

7. DISCUSIÓN

El estudio de las ECV ha sido de especial interés por ser un grave problema de salud en México y en el mundo. Estas enfermedades tienen un origen multifactorial, es decir, surgen como resultado de la interacción de múltiples variantes genéticas y diversos factores ambientales, por lo que estudios de identificación de genes o polimorfismos genéticos involucrados en la susceptibilidad, permitirán definir mejores estrategias de diagnóstico y nuevos blancos farmacológicos.

Los SNPs son la sustitución de una base del DNA por otra en un determinado sitio, se distinguen principalmente de las mutaciones por su frecuencia y representan las

variantes genéticas más comúnmente encontradas en el humano; su vinculación con enfermedades es motivo de investigación ya que en ocasiones pueden afectar el fenotipo de la enfermedad. Los SNPs que se encuentran en regiones codificantes se subdividen en sinónimos (si el cambio de nucleótido no cambia el aminoácido) y no sinónimos (si el cambio de nucleótido cambia el aminoácido) lo que pudiera estar afectando la función de la proteína (Ramírez-Bello et al., 2013). Es por ello, que el estudio de la participación de la variación genética en la predisposición a estas enfermedades ha cobrado nuevas dimensiones en la era genómica (De León-Ojeda et al., 2013; Portilla et al., 2014).

Se han reportado diversos estudios en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas, pero hay pocos datos en población mexicana. La población mexicana al ser resultado de una mezcla de europeos, nativos americanos y un pequeño porcentaje de ancestros de origen africano (1-3%) hace necesario el estudio de la genética de las enfermedades en esta población (Ramírez-Bello et al., 2013; Weissglas-Volkov et al., 2013).

Este estudio proporciona por primera vez información acerca de la participación de 6 SNPs no sinónimos de alta frecuencia en latinos con la susceptibilidad a desarrollar canalopatías y cardiomiopatías en población mestiza mexicana.

La frecuencia del alelo menor (MAF) se define como la frecuencia con la que aparece el alelo secundario, en un determinado locus, dentro de una población (Turner et al., 2011). Las MAF obtenidas para cada uno de los seis SNPs en los controles de GEA fueron similares a las reportadas en 1000 genomas en población Mexico-Americana (MXL) y al compararla con las frecuencias reportadas para europeos y africanos, se puede observar que en estas poblaciones, los 6 SNPs tienen una frecuencia mucho más baja (**Tabla 6**). El SNP rs10801999 (V76M-CASQ2) y el SNP rs45578741 (R106C-TCAP) fueron los más frecuentes en casos de canalopatías (17.2%) vs controles (15.4% y 14.2%), mientras que los SNPs rs41315493 (V1950M-SCN5A) y rs45578741 (R106C-TCAP) fueron más frecuentes en casos de cardiomiopatías (**Tabla 6**).

Antes de realizar el análisis de asociación, se determinó si los SNPs se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg para el grupo control y para los grupos de casos. Para comprobar si una población está en equilibrio de HW es necesario comparar las frecuencias observadas para cada uno de los genotipos con las frecuencias teóricas esperadas y aplicar la prueba estadística de Chi cuadrada para determinar si hay o no diferencias significativas (Turner et al., 2011). En general, 4 de los 6 SNPs genotipificados por PCR en tiempo real están en equilibrio de HW como se observa en la **Tabla 7**, puesto que los valores de P obtenidos fueron superiores a 0.05. El SNP rs76371972 no estuvo en equilibrio de HW en el grupo de los controles de GEA ($P=0.027$) y el SNP rs185788586 no estuvo en equilibrio de HW en el grupo de casos de cardiomiopatías ($P=0.025$). Al comparar los genotipos obtenidos con los esperados como se observa en la **Tabla 7**, el SNP rs76371972 obtuvo un exceso de homocigotos raros y una falta de heterocigotos, lo mismo sucede para el SNP rs45578741. La determinación del equilibrio de HW es importante para el control de calidad en los estudios genéticos, por lo tanto, la desviación del equilibrio sugiere en primera instancia un posible error de genotipificación. En ambos casos se tomaron al azar muestras de los tres genotipos y se analizaron nuevamente por PCR en tiempo real; los genotipos obtenidos en estos segundos ensayos fueron idénticos a los obtenidos en los primeros; por lo tanto, se descartó un error de genotipificación. La desviación del equilibrio en controles sugiere que la muestra está sesgada o que el tamaño de muestra no es representativo de la población; en cambio, en la muestra de casos, la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg puede ser indicativo de que el polimorfismo pudiera estar asociado con la enfermedad (Tian et al., 2008; Turner et al., 2011). Sin embargo, para ambos polimorfismos es necesario aumentar el tamaño de la muestra para observar si se mantiene esta desviación del equilibrio de HW o no.

Como se muestra en la **Tabla 8**, no se encontró asociación de ninguno de los 6 SNPs analizados a canalopatías, lo que sugiere que estas variantes analizadas no contribuyen al desarrollo de estas enfermedades en la muestra de población mexicana estudiada. Sin embargo, al realizar el análisis de asociación específicamente a SQT (**Tabla 9**), la variante V76M del gen *CASQ2* presentó un

valor de P con tendencia a la significancia ($P=0.077$), pero cuando se ajustó por edad y sexo, esta tendencia se perdió ($P=0.151$). Es necesario aumentar el tamaño de la muestra, considerando que solo son 33 los pacientes con SQTL. El gen *CASQ2* ha sido asociado previamente a TVPC (**Figura 4**); este gen codifica para la calsecuestrina cardiaca, la cual actúa como una importante proteína de almacenamiento de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (SR) de los cardiomiocitos y participa en procesos de acoplamiento de excitación-contracción del músculo. En la **Tabla 13** se observa que la variante V76M de *CASQ2* es considerada benigna, de acuerdo al análisis realizado en los programas Polyphen-2 y SIFT; sin embargo, es posible que pudiera tener un papel en la duración del intervalo QT, debido a que este cambio se encuentra en el dominio II, específicamente en la hélice α -3 de la calsecuestrina, donde la cadena lateral de V76 es de naturaleza anfipática y al interactuar con sus residuos hidrófobos (L72 y I75), pudiera contribuir a esta interacción de tipo hidrófoba. Se ha reportado que la variante V76M afecta la conformación local del monómero y del dímero, dada la naturaleza extendida de la metionina causando una perturbación funcional de la proteína (Kim et al., 2007).

Al realizar el estudio de asociación a cardiomiopatías, se observa en la **Tabla 10** que la variante V1950M del gen *SCN5A* presentó tendencia de asociación ($P=0.061$) y que al realizar un análisis específico de asociación de esta variante a CMD, se obtuvo un valor de $P=0.071$ (**Tabla 11**). El gen *SCN5A* codifica para la subunidad α del canal de sodio cardiaco principal ($Na_{v1.5}$), que se sabe es responsable de mantener la función normal de la corriente de sodio hacia el interior de la célula (I_{Na}), la cual es la más importante en la fase de despolarización rápida en cardiomiocitos. Es bien sabido que variantes genéticas en *SCN5A* están involucradas en una serie de canalopatías cardiacas hereditarias (**Figura 4**); estas variantes también se encuentran relacionadas con disfunción contráctil del miocardio, con CMD y la insuficiencia cardiaca. La variante V1950M se ubica en una región conservada del canal de sodio en el dominio C-terminal (CTD) que es importante para la inactivación del canal (Shinlapawittayatorn et al., 2011). Este

cambio no sinónimo es de naturaleza dañina (**Tabla 13**) según el análisis *in silico* realizado en dos programas diferentes (Sift y Polyphen-2); dicho daño pudiera estar causado por el grupo tioéster incluido en la estructura de la metionina, lo que pudiera estar afectando la funcionalidad de la proteína. Varias hipótesis vinculan las alteraciones en la conductividad del sodio al desarrollo de la CMD, esto como resultado de arritmias provocadas por la pérdida de función de la proteína ocasionando que las fibras musculares presenten atrofia, cardiomiopatía dilatada y posteriormente insuficiencia cardíaca (te Riele et al., 2017). Estos hallazgos proponen que la variante V1950M está probablemente implicada con la susceptibilidad a CMD; sin embargo, es necesario aumentar el tamaño de la muestra para confirmar estos resultados y también se necesitan realizar análisis funcionales para conocer el papel de esta variante en el desarrollo de CMD. Este hallazgo podría tener importantes implicaciones en la comprensión de esta enfermedad, sugiriendo así que los polimorfismos puedan transformarse en posibles blancos para futuras intervenciones terapéuticas (Berne et al., 2012).

Por otra parte, la variante del gen *TCAP* (R106C) se asoció a riesgo de cardiomiopatías con un valor de *P* de 0.025 (**Tabla 10**) y al realizar el análisis específico a CMH, la asociación conservó su significancia (*P*=0.033) (**Tabla 12**). Este gen codifica para una proteína llamada teletonina, la cual es una proteína esencial de unión al disco Z para la organización estructural del sarcómero cardíaco y de estiramiento del cardiomiocito. Este cambio no sinónimo es de naturaleza dañina (**Tabla 13**), debido al cambio de aminoácido de una arginina (carácter básico) por cisteína (polar) que pudiera estar afectando la conformación de la proteína y, por ende, su actividad biológica. Se han reportado otras variantes genéticas asociadas con CMH en *TTN* (titina) y *TCAP* (teletonina) previamente; aún no se sabe cómo este cambio (R106C) pudiera estar afectando molecularmente (Braunwald, 2017; Hayashi et al., 2004), por lo cual es necesario realizar estudios funcionales para entender su posible efecto sobre la actividad de la proteína.

Por último, se buscaron las posibles asociaciones de estas 6 variantes en la literatura y se encontró que todas las variantes ya han sido implicadas previamente con eventos cardiovasculares (**Tabla 13**).

Esta es la primera vez que se identifican SNPs con posible asociación a canalopatías y cardiomiopatías en población mexicana. Aunque es necesario ampliar el tamaño de la muestra y realizar estudios funcionales, estos resultados aportan una primera aproximación sobre la variación genética involucrada en la susceptibilidad a estas enfermedades en la población mestiza mexicana.

8. CONCLUSIONES

- De las 6 variantes estudiadas, se encontró que 3 presentan posible asociación a canalopatías o cardiomiopatías en población mestiza mexicana.
- El SNP rs45578741 del gen *TCAP* se asoció significativamente a cardiomiopatías, particularmente con CMH.
- El SNP rs41315493 del gen *SCN5A* presentó una tendencia de asociación a cardiomiopatías, particularmente a CMD.
- El SNP rs10801999 del gen *CASQ2* presentó una tendencia de asociación a SQTL.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman, M., Marcou, C. and Tester, D. (2013). Medicina personalizada: diagnóstico genético de cardiopatías/canalopatías hereditarias. *Revista Española de Cardiología*, 66(4), 298-307.

Adzhubei, I., Jordan, D., & Sunyaev, S. (2015). Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, 76(1).

Bartos, D., Grandi, E., & Ripplinger, C. (2015). Ion Channels in the Heart. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1423-1464.

Bastiaenen, R., & Behr, E. (2011). Sudden death and ion channel disease: pathophysiology and implications for management. *Heart*, 97(17), 1365-1372.

Becerril-Parra, D., Torres-Guerrero, E., Moreno-Coutiño, G., Aguilar-Sarmiento, A., Arenas-Guzmán, R., & Hernández-Castro, R. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus aplicaciones en dermatología. *Dermatología Cosmética, Médica Y Quirúrgica*, 13(3), 214-219.

Benito, B., Brugada, J., Brugada, R., & Brugada, P. (2009). Síndrome de Brugada. *Revista Española de Cardiología*, 62(11), 1297-1315.

Benjamin, E., Blaha, M., Chiuve, S., Cushman, M., Das, S., & Deo, R. et al. (2017). Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*, 135(10), 146-603.

Berne, P., Aguinaga, L., & Brugada, J. (2012). Síndrome de Brugada. *Revista De La Federación Argentina de Cardiología*, 41(4), 225-234.

Bezzina, C., Shimizu, W., Yang, P., Koopmann, T., Tanck, M., & Miyamoto, Y. et al. (2006). Common Sodium Channel Promoter Haplotype in Asian Subjects Underlies Variability in Cardiac Conduction. *Circulation*, 113(3), 338-344.

Boczek, N., Ye, D., Jin, F., Tester, D., Huseby, A., & Bos, J. et al. (2015). Identification and Functional Characterization of a Novel CACNA1C-Mediated Cardiac Disorder Characterized by Prolonged QT Intervals with Hypertrophic Cardiomyopathy, Congenital Heart Defects, and Sudden Cardiac Death. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 8(5), 1122-1132.

Bos, J., Poley, R., Ny, M., Tester, D., Xu, X., & Vatta, M. et al. (2006). Genotype—phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Molecular Genetics And Metabolism*, 88(1), 78-85.

Braunwald, E. (2017). Cardiomyopathies: An Overview. *Circulation Research*, 121(7), 711-721.

Burghardt, C. (2005). *ECG Interpretation Made Incredibly Easy!* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

Campuzano, Ó., Sarquella-Brugada, G., Brugada, R., & Brugada, J. (2015). Genetics of channelopathies associated with sudden cardiac death. *Global Cardiology Science and Practice*, (3), 39.

Cano-Hernández, K., Nava-Townsend, S., Sánchez-Boiso, A., Sánchez-Urbina, R., Contreras-Ramos, A., & Erdmenger-Orellana, J. et al. (2018). Prevalencia y espectro de las enfermedades que predisponen a la muerte súbita cardíaca en niños mexicanos: una muestra obtenida del Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Archivos de Cardiología de México*, 88(4), 253-332.

Charron, P., Arad, M., Arbustini, E., Basso, C., Bilinska, Z., & Elliott, P. et al. (2010). Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, 31(22), 2715-2728.

de la Pompa, J., & Epstein, J. (2013). Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease. *Developmental Cell*, 22(2), 244-254.

de León-Ojeda, N. (2013). Determinantes Genética de la Muerta Súbita Cardiovascular. *Corsalud Revista de Enfermedades Cardiovasculares*, (6), 30-41.

Edwards, A. (2008). G.H Hardy (1908) and Hardy-Weinberg Equilibrium. *Genetics*, 179(3), 1143-1150.

Esplugas, E., Alonso, F., Alonso, J., Asín, E., Elizaga, J., Íñiguez, A., & Revuelta, J. (2000). Guía de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en cardiología intervencionista: angioplastia coronaria y otras técnicas. *Revista Española de Cardiología*, 53(2), 218-240.

Fernández-Falgueras, A., Sarquella-Brugada, G., Brugada, J., Brugada, R., & Campuzano, Ó. (2017). Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology*, 6(1), 7.

Fox, S. (2014). *Fisiología Humana* (13th ed., pp. 374-419). Mc Graw Hill Education.

Francisco, J., Bodegas, A., Gómez, C., Arana, J., & Barrenetxea, J. (2007). Miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho. *Gaceta Médica de Bilbao*, 104(2), 70-74.

Franco-Salazar, G. (2007). Capítulo 3: El electrocardiograma, componentes, valores normales y semiología de sus perturbaciones. *Manual de electrocardiografía y electroencefalografía* (1st ed., pp. 21-35).

Ganeva, K., Ivanova, M., Shivachev, P., Kaneva, A., & Marinov, L. (2017). Arrhythmogenic cardiomyopathy: Literature review. *Pediatriya*, 57(1), 45-52.

García-Elías, A., & Benito, B. (2018). Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1-30.

Genetics Home Reference. (2019). Your Guide to Understanding Genetic Conditions. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/>

Gibson, N. (2006). The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Journal of Health Services Research and Policy*, 11(1), 32-47.

Gómez, L. (2011). Las enfermedades cardiovasculares: un problema de salud pública y un reto global. *Revista Biomédica*, 31(4), 9-10.

González-Melchor, L., Villarreal-Molina, T., Iturralde-Torres, P., & Medeiros-Domingo, A. (2014). Muerte súbita cardiaca en el corazón estructuralmente normal: una actualización. *Archivos de Cardiología de México*, 84(4), 293-304.

Guttmann, O., Mohiddin, S., & Elliott, P. (2015). Almanac 2014: cardiomyopathies. *Turk Kardiyoloji Derneji Arsivi*, 57(3), 302-314.

Harrison, S., Riggs, E., Maglott, D., Lee, J., Azzariti, D., & Niehaus, A. et al. (2016). Using ClinVar as a Resource to Support Variant Interpretations. *Current Protocols in Human Genetics*, 89:8.16.1-8.16.23.

Hayashi, T., Arimura, T., Itoh-Satoh, M., Ueda, K., Hohda, S., & Inagaki, N. et al. (2004). Tcap Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy and Dilated Cardiomyopathy. *Journal of The American College of Cardiology*, 44(11), 2192-2201.

Hernández-Rodríguez, A., & Trejo-Medinilla, F. (2014). Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. *Archivos De Medicina*, 10(1), 1-24.

High, F., & Epstein, J. (2008). The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nature Reviews Genetics*, 9(1), 49-61.

Hirtle-Lewis, M., Desbiens, K., Ruel, I., Rudzics, N., Genest, J., Engert, J., & Gianetti, N. (2013). The genetics of dilated cardiomyopathy: a prioritized candidate gene study of LMNA, TNNT2, TCAP, and PLN. *Clinical Cardiology*, 36(10), 628-633.

Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2018). Diccionario de cáncer. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/muerte-prematura>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017). Estadísticas a propósito del Día de Muertos, 1-12.

Kim, E., Youn, B., Kemper, L., Campbell, C., Milting, H., Varsanyi, M., & Kang, C. (2007). Characterization of Human Cardiac Calsequestrin and its Deleterious Mutants. *Journal of Molecular Biology*, 373(4), 1047-1057.

Kimura, A. (2011). Contribution of genetic factors to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: the cause of dilated cardiomyopathy: genetic or acquired? (genetic-side). *Circulation Journal*, 75(7), 1756-1765.

Lahat, H., Eldar, M., Levy-Nissenbaum, E., Bahan, T., Friedman, E., & Khoury, A. et al. (2001). Autosomal recessive catecholamine- or exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia: clinical features and assignment of the disease gene to chromosome 1p13-21. *Circulation*, 103(23), 2822-2827.

Laraudogoitia, E., & Díez, I. (2006). Miocarditis y Miocardiopatías. *Revista Española De Cardiología*, (6), 21-29.

Luis-Montoya, P., Yamamoto-Furusho, J., Vega-Memije, E., Rodríguez-Carreón, A., Ruiz-Morales, J., & Vargas-Alarcón, G. et al. (2007). HLA-DRB1*0101 is associated with the genetic susceptibility to develop lichen planus in the Mexican Mestizo population. *Archives of Dermatological Research*, 299(8), 405-407.

Luxán, G., Casanova, J., Martínez-Poveda, B., Prados, B., D'Amato, G., & MacGrogan, D. et al. (2013). Mutations in the NOTCH pathway regulator MIB1 cause left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Nature Medicine*, 19(2), 193-201.

Magi, S., Lariccia, V., Maiolino, M., Amoroso, S., & Gratteri, S. (2017). Sudden cardiac death: focus on the genetics of channelopathies and cardiomyopathies. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 1-18.

Márquez, M., Ruíz-Siller, T., Méndez-Ramos, R., Karabut, E., Aranda-Fraustro, A., & Jiménez-Becerra, S. (2016). Miocardiopatía hipertrófica (MCH). Una revisión histórica y anatomopatológica. *Gaceta Médica de México*, 152(5), 697-702.

Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P., & Ackerman, M. (2007). Clínica y genética en el síndrome de QT largo. *Revista Española De Cardiología*, 60(7), 739-752.

Moran, A., Forouzanfar, M., Roth, G., Mensah, G., Ezzati, M., & Flaxman, A. et al. (2014). The Global Burden of Ischemic Heart Disease in 1990 and 2010. *Circulation*, 129(14), 1493-1501.

Mizusawa, Y., & Wilde, A. (2012). Brugada Syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, (5), 606-616.

Ng, P., & Henikoff, S. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3812-3814.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2014* [Ebook] (pp. 1-18). Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Enfermedades no transmisibles. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Organización Mundial de la Salud (OMS), & Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2011). OMS | Estadísticas Sanitarias Mundiales 2011. Disponible en: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2011/es/

Park, H., Kim, Y., Lee, Y., Jung, B., Lee, S., & Shin, D. et al, (2012). Genetic Analysis of SCN5A in Korean Patients Associated with Atrioventricular Conduction Block. *Genomics & Informatics*, 10(2), 110-116.

Portilla, E., Muñoz, W., & Sierra, C. (2014). Genes y variantes polimórficas asociadas a la enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*, 21(5), 275-358.

Prüss-Üstün, A., & Corvalán, C. (2015). *Ambientes saludables y prevención de enfermedades hacia una estimación de la carga de morbilidad atribuible al medio ambiente* (pp. 1-19). Organización Mundial de la Salud (OMS).

Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., & Fragoso, J. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica De México*, 149(2), 220-228.

Rangaraju, A., Krishnan, S., Aparna, G., Sankaran, S., Mannan, A., & Hygriv Rao, B. (2018). Genetic variants in post myocardial infarction patients presenting with electrical storm of unstable ventricular tachycardia. *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*, 18(3), 91-94.

Reyes-Juárez, J., & Zarain-Herzberg, Á. (2006). Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Archivos De Cardiología De México*, 76(4), 18-32.

Rodríguez-Reyes, H., Muñoz-Gutiérrez, M., Márquez, M., Pozas-Garza, G., Asensio-Lafuente, E., & Ortiz-Galván, F. et al. (2015). Muerte súbita cardíaca. Estratificación de riesgo, prevención y tratamiento. *Archivos De Cardiología De México*, 85(4), 329-336.

- Sánchez-Arias, A., Bobadilla-Serrano, M., Dimas-Altamirano, B., Gómez-Ortega, M., & González-González, G. (2016). Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad en un hospital de tercer nivel. *Revista Mexicana De Cardiología*, 27(3), 98-102.
- Santos, L., León-Galván, M., & Marino-Marmolejo, E. (2006). Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud Pública De México*, 48(2).
- Schwartz, P., Ackerman, M., & Wilde, A. (2017). Channelopathies as Causes of Sudden Cardiac Death. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 9(4), 537-549.
- Semsarian, C., Ingles, J., Maron, M., & Maron, B. (2015). New Perspectives on the Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(12), 1249-1254.
- Shakeel, M., Irfan, M., & Khan, I. (2018). Rare genetic mutations in Pakistani patients with dilated cardiomyopathy. *Gene*, 673(5), 134-139.
- Shinlapawittayatorn, K., Du, X., Liu, H., Ficker, E., Kaufman, E., & Deschênes, I. (2011). A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical defects of SCN5A mutations. *Heart Rhythm Society*, 8(3), 455-462.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 2(5), 70-78.
- te Riele, A., Argullo-Pascual, E., James, C., Leo-Macías, A., Cerrone, M., & Zhang, M. et al. (2017). Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis. *Cardiovascular Research*, 113(1), 102-111.
- Tian, C., Gregersen, P., & Seldin, M. (2008). Accounting for ancestry: Population substructure and genome-wide association studies. *Human Molecular Genetics*, 17(2), 143-150.
- Towbin, J. (2015). Inherited cardiomyopathies. *Circulation Journal*, 78(10), 2347-2356.
- Turner, S., Armstrong, L., Bradford, Y., Carlson, C., Crawford, D., & Crenshaw, A. et al. (2011). Quality control procedures for genome wide association studies. *Current Proceedings in Human Genetics*, 68(1), 1-24.
- Veerman, C., Wilde, A., & Lodder, E. (2015). The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene*, 573(2), 177-187.
- Villarreal-Molina, T., Posadas-Romero, C., Romero-Hidalgo, S., Antúnez-Argüelles, E., Bautista-Grande, A., & Vargas-Alarcón, G. et al. (2012). The ABCA1 gene R230C variant is associated with

decreased risk of premature coronary artery disease: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study. *Plos One*, 7(11), e49285.

Weintraub, R., Semsarian, C., & Macdonald, P. (2017). Dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 390, 400-414.

Weissglas-Volkov, D., Aguilar-Salinas, C., Nikkola, E., Deere, K., Cruz-Bautista, I., & Arellano-Campos, O. et al. (2013). Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *Journal of Medical Genetics*, 50(5), 298-308.

Young, L., Smedira, N., Tower-Rader, A., Lever, H., & Desai, M. (2018). Hypertrophic cardiomyopathy: A complex disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 85(5), 399-411.

10. ANEXOS



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: Estudio Clínico y Genómico de la Insuficiencia Cardíaca, Arritmias y la Muerte Súbita, Causadas por Cardiomiopatías y Canalopatías Arritmogénicas en Pacientes Mexicanos.

Invitación a participar y descripción del proyecto

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

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

Objetivos del estudio

El propósito es identificar las mutaciones en los genes descritos como causales de Cardiomiopatías y Canalopatías de tipo Genético, mediante secuenciación de segunda generación, en pacientes mexicanos diagnosticados con Cardiomiopatía Dilatada, Hipertrofica o Canalopatías de origen familiar o idiopática en el Instituto Nacional de Cardiología y Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y buscar correlaciones fenotipo-genotipo.

Descripción de la investigación

Colecta de muestras y de información médica

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

¿Cómo se manejarán mis muestras y registros médicos?

- Los tejidos, muestras de sangre y registros médicos serán marcados con un código (codificados) para su seguimiento y con el fin de mantener la confidencialidad.
- Solamente la Dra. Alessandra Carnevale investigadora del Instituto Nacional de Medicina Genómica, responsable del proyecto tendrá la información que permita asociar este código con su nombre y sus datos personales.

- Todos los datos iniciales serán depositados en una base de datos segura, donde nadie que no esté autorizado podrá tener acceso a su información.
- Solamente un reducido grupo de investigadores y médicos autorizados, que se han comprometido a proteger los datos de los participantes en el estudio, tendrán acceso a la base de datos.

¿A dónde irán mis muestras e información?

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

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

- Los resultados del estudio serán analizados por los investigadores participantes y se publicarán en artículos científicos para que otros investigadores y médicos tengan acceso a la información que les será útil en el diagnóstico y tratamiento de otros pacientes con esta enfermedad. En ningún caso se podrá identificar a ninguno de los o las pacientes del estudio.
- Los datos particulares como nombre o dirección, no estarán disponibles.

- Los datos codificados de su expediente clínico estarán disponibles solamente a otros investigadores interesados que hayan recibido aprobación por parte de los responsables del estudio y nunca con fines comerciales.

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

- Si se requiere obtener información adicional acerca de su estado de salud, una persona del Instituto Nacional de Medicina Genómica, del Instituto Nacional de Cardiología o del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre lo contactará para realizarle un cuestionario acerca de su estado de salud.

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

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

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

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

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

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

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

¿Dónde se almacenará mi muestra?

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

¿Puedo retirar mis muestras del estudio?

- Una vez que sus muestras e información haya sido codificada y analizada, o depositada en las bases de datos, no será posible retirar sus muestras y datos del estudio. Por razones de bioseguridad su muestra no le puede ser devuelta bajo ninguna circunstancia.
- Usted es libre de decidir si desea participar o no en este estudio de investigación. Si decide no participar esto no afectará su relación con los médicos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ni con el Instituto Nacional de Medicina Genómica. Si decide participar, puede cambiar de opinión y retirarse del estudio en el momento que lo

decida. En este caso, por disposición legal, además de sus muestras de sangre, el ADN y todos los datos clínicos ligados a la muestra recabada para este estudio serán destruidos.

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

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

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

Dra. Alessandra Carnevale Cantoni al teléfono 53 50 19 00, ext 1209 o al correo electrónico acarnevale@inmegen.gob.mx INMEGEN

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

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

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

Registro: _____ Comentarios: _____

Diagnóstico _____

Fecha: _____

Consentimiento para participar en el estudio:

Para contar con su participación en el estudio titulado Estudio Clínico y Genómico de la Insuficiencia Cardíaca, Arritmias y la Muerte Súbita, Causadas por Cardiomiopatías y Canalopatías Arritmogénicas en Pacientes Mexicanos., debe usted estar de acuerdo con todos los siguientes puntos:

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



Carta de consentimiento informado del menor (o incapaz), para aprobar la obtención de muestras biológicas

México, Distrito Federal, a _____

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

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

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

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

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

Nombre	Fecha
_____	_____

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

Nombre y firma del padre o tutor

Nombre y firma de la madre o tutora

Nombre y firma investigador