



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESPECTRO DE MUTACIONES Y BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES CAUSALES DE
CANALOPATÍAS ARRITMOGÉNICAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE NUEVA
GENERACIÓN EN PACIENTES MEXICANOS

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMÉDICAS)
PRESENTA:

ERIKA ANTÚNEZ ARGÜELLES

Director de Tesis:

DRA. MARÍA TERESA VILLARREAL MOLINA
Facultad de Medicina

Comité Tutor:

DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Instituto de Investigaciones Biomédicas
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
Facultad de Medicina

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi familia,
A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al CONACyT por el apoyo y financiamiento de mis estudios de posgrado. Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y al Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares, lugar donde realicé mi tesis. Al Instituto Nacional de Medicina Genómica “Ignacio Chávez” (INCICH) y a su Departamento de Electrofisiología, donde fue estudiado y discutido cada caso. A la Universidad de Michigan y su Centro de Arritmias Cardíacas por permitirme realizar una estancia de investigación.

Particularmente a mi tutora, la Dra. María Teresa Villarreal, y al Dr. Samuel Canizales Quinteros y la Dra. Patricia Ostrosky Shejet, miembros de mi comité tutor. Al Dr. Pedro Iturralde, la Dra. Mirna Álvarez Bran y al Dr. Santiago Nava, por su relevante labor en la selección y estudio clínico de los casos. Al Dr. Arturo Rojo Domínguez y la Dra. Leticia Arregui Mena por llevar a cabo la modelación *in silico* de KCNQ1. Finalmente, al Dr. Héctor Valdivia y la Dra. Carmen Valdivia por su cálido recibimiento en la Universidad de Michigan para la realización de estudios funcionales.

A. RESUMEN

La muerte súbita cardiaca (MSC) es una de las principales causas de muerte en adultos jóvenes y niños en el mundo. Se sabe que una proporción considerable de estas muertes son causadas por canalopatías arritmogénicas (CAs). En las últimas décadas se han descrito varios genes implicados en estas enfermedades. Sin embargo, en una proporción importante de pacientes en quienes se exploran genes conocidos no se identifican mutaciones, lo que sugiere la existencia de nuevos genes y/o mecanismos implicados en las CAs. En el presente estudio, se realizó secuenciación de nueva generación (SNG) en 51 pacientes con diagnóstico clínico de CA. Se encontró al menos una mutación patogénica, potencialmente-patogénica o de significado clínico incierto en el 76-100% de los casos con distintas CAs dependiendo del diagnóstico, incluyendo síndrome de QT largo (SQTL), síndrome de Brugada (SBr), disfunción del nodo sinusal (DNS) y taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. Además, la SNG en células de cordón umbilical almacenadas al nacimiento permitió el diagnóstico *post-mortem* de SQTL mediante autopsia molecular en un caso de muerte súbita inexplicada (MSI), encontrando que la paciente era heterocigota compuesta para 2 mutaciones diferentes en *KCNQ1* (p.A300T/p.P535T). Además, se encontró evidencia de que el gen *RYR2* podría estar implicado en el SQTL; que el gen *SNTA1* podría estar implicado en el SBr; y que los genes *TRPM4* y *CAMK2A* podrían estar implicados en la DNS. Por último, se identificaron 3 polimorfismos (*KCNQ1*/p.D4469, *CASQ2*/p.V76M y *RYR2*/p.H877P) asociados a SQTL comparando casos y controles sanos, los cuales son más frecuentes en población latina.

B. ABSTRACT

Sudden cardiac death is one of the main causes of death in children and young adults. A considerable proportion of these deaths are caused by primary electric disorders of the heart known as arrhythmogenic channelopathies (ACs). Although a long list of genes causing ACs has been described over the last 2 decades, genetic studies fail to find a mutation in genes known to cause ACs in a considerable proportion of patients with a clear phenotype. In addition, one of the main challenges for molecular diagnosis is to determine the causality of the identified mutations. In the present study, next generation sequencing

(SNG) was performed in 51 patients with a clinical diagnosis of AC, functional *in vitro* studies or *in silico* protein modeling was performed to analyze the functionality of 4 novel identified mutations, and the possible effect of several AC gene polymorphisms found in Latin American population was analyzed. At least one variant considered as pathogenic, potentially pathogenic or of unknown clinical significance was identified in 76 to 100% of cases with different types of channelopathy, including long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome (BrS), sick sinus syndrome (SSS) and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Next generation sequencing performed on umbilical cord cells stored at birth allowed post-mortem diagnosis of LQTS in a child with sudden death who was compound heterozygous for two *KCNQ1* mutations (p.A300T/p.P535T), where *in silico* protein modeling suggested mutation causality. Although no new causal AC genes were identified, several mutations were identified in genes not previously related with specific channelopathies: evidence of the implication of *RYR2* in LQTS was found, a potentially pathogenic mutation in *SNTA1* was found in a patient with BrS, and potentially pathogenic mutations in *TRPM4* y *CAMK2A* were found in a patient with SSS. Finally, 3 polymorphisms found in Latin American populations (*KCNQ1*-p.D4469, *CASQ2*-p.V76M and *RYR2*-p.S877P) were found to be associated with LQTS in a case-control analysis.

C. LISTA DE ABREVIACIONES

AV Aurículo-ventricular

CaM Calmodulina

CaMKII Cinasa calmodulina dependiente de Ca^{2+}

CAs Canalopatías arritmogénicas

CE50 Concentración efectiva para alcanzar el 50% de saturación

DHPLC Cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (*denaturing high performance liquid chromatography*)

DAI Desfibrilador automático implantable; cardiovertidor implantable

DNA Ácido desoxirribonucleico

DNS Disfunción del nodo sinusal

EAC Enfermedad arterial coronaria

ECG Electrocardiograma/electrocardiográfico
FC Frecuencia cardiaca
HEK riñón humano embrionario (*human embryonic kidney*)
IgG inmunoglobulina G
ICa_L Corriente de calcio tipo L
INa Corriente de sodio
LCIC Liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺
MCH Miocardiopatía hipertrófica
MCD Miocardiopatía dilatada
MS Muerte súbita
MSC Muerte súbita cardiaca
MSR Muerte súbita revertida
Nav1.5 Subunidad α del canal de sodio cardiaco
NCX Intercambiador sodio-calcio
PKA Proteína cinasa A
PLB Fosfolamban
ppm Pulsaciones por minuto
RS Retículo sarcoplásmico
RyR2 Receptor de rianodina cardiaco
TV Taquicardia ventricular
TVMC Taquicardia ventricular monomórfica catecolaminérgica
TVPC Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
SA Senoauricular
SBr Síndrome de Brugada
SERCA ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico/endoplásmico
SQTL Síndrome de QT largo
Túbulos-T Túbulos transversos
VD Ventrículo derecho
WT Silvestre (*wild type*)

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte súbita cardíaca (MSC)	10
1.1.1 Causas de la MSC.....	10
1.1.2 MS inexplicada y el diagnóstico genético-molecular	12
1.1.3 Potencial de acción cardíaco.....	12
1.1.4 Acoplamiento electromecánico del corazón.....	15
1.2 Canalopatías Arritmogénicas.....	16
1.2.1 Síndrome de QT largo (SQTL)	17
1.2.2 Síndrome de Brugada (SBr).....	20
1.2.3 Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC).....	23
1.2.4 Disfunción del nodo sinusal (DNS).....	25
1.3 Diagnóstico genético-molecular de las CAS.....	28
1.3.1 Problemas para el diagnóstico genético-molecular.....	28
1.3.2 Clasificación de patogenicidad de una variante.....	30

II. JUSTIFICACIÓN.....33

III. HIPÓTESIS.....34

IV. OBJETIVO.....35

4.1 Objetivos particulares.....35

V. METODOLOGÍA

5.1 Población de estudio.....36

5.2 Extracción de DNA genómico.....	36
5.3 Secuenciación de Nueva Generación (SNG)	37
5.3.1 SNG sitio-dirigida.....	38
5.3.2 Secuenciación de exoma completo y genoma completo.....	38
5.3.3 Procesamiento de datos obtenidos por SNG.....	38
5.4 Análisis de ancestría global y local de la mutación <i>KCNH2</i> -p.T613M.....	42
5.5 Transfección de células HEK-293	43
5.5.1 Registro de las corrientes iónicas.....	44
5.6 Canal recombinante RyR2-p.R2920Q murino	47
5.6.1 Generación de línea estable de células HEK inducibles para la expresión de RyR2-Q2920R murino.....	52
5.9 Western Blot de RyR2.....	54
5.10 Ensayo de unión a RyR2 [³ H]	54
5.11 Modelo del canal Kv7.1/p.A300T/p.P535T.....	55
VI. RESULTADOS	
6.1 Población de estudio.....	57
6.2 Proceso general de SNG.....	57
6.3 Análisis genético en casos con SQTL.....	58
6.4 Análisis genético en casos con DNS.....	65
6.5 Análisis genético en casos con SBr.....	71
6.6 Análisis genético en casos con TVs polimórficas.....	74
6.7 Mutación <i>RYR2</i> -p.R2920Q en un caso con SQTL.....	77
6.8 Ancestría de la mutación <i>KCNH2</i> -p.T613M.....	78

6.9 Caracterización funcional de mutación <i>SCN5A</i> -p.T1708N identificada en 3 familias con fenotipo mixto.....	80
6.10 Autopsia molecular de un caso de MSI: modelación <i>in silico</i> de <i>Kv7.1/p.A300T/p.P535T</i>	85
6.11 Identificación de polimorfismos asociados a CAs.....	91

VII. DISCUSIÓN

7.1 El estudio de las CAs en México.....	93
7.1.2 Epidemiología de las CAs en pacientes mexicanos.....	94
7.2 Espectro de mutaciones en casos con SQT.....	95
7.2.1 Posible nuevo gen de SQT: <i>RYR2</i>	96
7.2.2 Posible nuevo gen de SQT: <i>BAG3</i>	98
7.2.3 Posible <i>hotspot</i> mutacional en <i>KCNH2</i>	99
7.3 Espectro de mutaciones en casos con DNS.....	100
7.3.1 Espectro de mutaciones en casos de DNS de acuerdo a la edad de inicio....	103
7.3.2 Fenotipos mixtos en portadores de mutaciones en <i>SCN5A</i>	103
7.3.3 Posibles nuevos genes de DNS: <i>TRPM4</i> y <i>CAMK2A</i> en la DNS.....	106
7.4 Espectro de mutaciones en casos con SBr.....	107
7.4.1 Posible nuevo gen de SBr: <i>SNTA1</i>	108
7.5 Espectro de mutaciones en casos con TV polimórfica.....	109
7.6 La autopsia molecular en un caso de MSI: modelo de <i>Kv7.1/p.A300T/p.P535T</i>	109
7.7 Polimorfismos comunes y raros asociados a SQT.....	110
7.8 Retos y Perspectivas en el Diagnóstico Genético-Molecular de las CAs.....	116

VIII. CONCLUSIONES	119
IX. PERSPECTIVAS	121
X. REFERENCIAS	122
XI. ANEXOS	
Anexo I. Figuras adicionales del modelo de Kv7.1.....	141
Anexo II. Paneles de secuenciación de secuenciación sitio-dirigida.....	143
Anexo III. Consentimiento informado.....	145
Anexo IV. Artículo Publicado.....	146

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Muerte súbita cardiaca (MSC)

La muerte súbita cardiaca (MSC) es una de las principales causas de muerte en países desarrollados y regiones industrializadas del mundo (Ackerman, 2009). Aproximadamente 17.7 millones de muertes anuales son causadas por enfermedades cardiovasculares en todo el mundo, de las cuales el 25% son de carácter súbito (Priori *et al.*, 2015). Diversos estudios definen la muerte súbita (MS) como la muerte que ocurre en ≤ 1 hora después del inicio de los síntomas prodrómicos (si la muerte es atestiguada); o bien, cuando la muerte no es atestiguada, como aquella que ocurre en un lapso de 24 horas después que el individuo fue visto por última vez sin síntomas sugestivos previos (Zipes & Wellens, 1998; Steinberg *et al.*, 2016). Así mismo, según las ‘guías para el manejo de pacientes con taquicardias ventriculares y prevención de MSC’ de la *Sociedad Europea de Cardiología (ESC)* (Priori *et al.*, 2015) y la *Asociación Americana del Corazón/Colegio Americano de Cardiología/Sociedad del Ritmo Cardíaco (AHA/ACC/HRS)* (Al-Khatib *et al.*, 2017) la MS puede considerarse de origen cardíaco sólo si existe una condición cardíaca (congénita o adquirida) potencialmente letal reconocida durante la autopsia o durante la vida del paciente. Así mismo, estas guías consideran casos potenciales de MSC a aquellos que ocurren en individuos con un corazón estructuralmente normal, en quienes el estudio de autopsia no logra identificar la causa de la muerte.

1.1.1 Causas de la MSC

Las causas de la MSC varían según el grupo de edad. En países desarrollados, la primera causa de MS en población adulta (>40 años) es la enfermedad arterial coronaria (EAC) (Arzamendi *et al.*, 2011). En cambio, en gente joven (1-35 años) la causa más frecuente de MS son las enfermedades estructurales del corazón (*e.g.* miocardiopatía hipertrófica o la miocardiopatía dilatada) y las enfermedades eléctricas primarias cardíacas o canalopatías arritmogénicas (CAs) (*e.g.* síndrome de QT largo o síndrome de Brugada), que constituyen un grupo de enfermedades causadas por mutaciones en genes que codifican canales iónicos y otras proteínas responsables de generar el potencial de acción cardíaco (Fernández-Falgueras *et al.*, 2017).

En países desarrollados, se estima que la incidencia anual de MSC en personas jóvenes es de 1.3-8.5 por cada 100,000 individuos, ubicándola como una de las primeras causas de muerte en este grupo etario (Winkel *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2012; Bagnall *et al.*, 2016). Dado que las CAs rara vez causan cambios estructurales en el corazón, y en algunas ocasiones no tienen traducción electrocardiográfica al reposo o se manifiestan intermitentemente en el electrocardiograma (ECG), pueden pasar desapercibidas durante la valoración médica. De manera similar, la MS puede quedar ‘inexplicada’ (MSI) aun tras haberse llevado a cabo una investigación médica y/o legal exhaustiva, que haya excluido el análisis de genes de CAs (Tester & Ackerman, 2006).

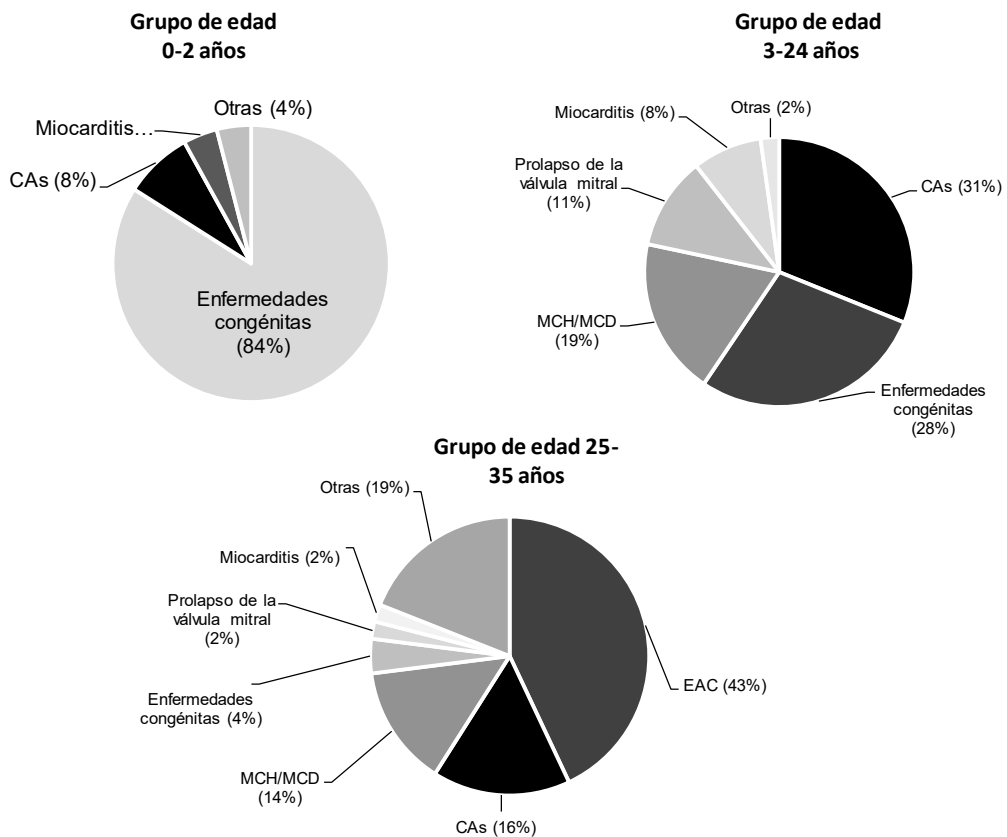


Figura 1.1 Causas de MSC en población joven estratificadas de acuerdo con el grupo de edad. En infantes (0 a 2 años) las alteraciones congénitas son la causa más frecuente de MS; mientras que en niños y jóvenes (3 y 24 años) las CAs son la causa más común de MSC. Finalmente, en adultos jóvenes (25 y 35 años) la enfermedad arterial coronaria de inicio temprano comienza a ser relevante como causa de MS, aunque las CAs siguen ocupando un lugar importante entre las causas de MSC (adaptado de Meyer *et al.* 2012).

1.1.2 MS inexplicada y el diagnóstico genético-molecular

Hasta en una tercera parte de los casos de MS que se reportan en jóvenes aparentemente sanos no logra establecerse la causa de la muerte mediante la autopsia convencional (Semsarian *et al.*, 2015) (**Tabla 1.1**). De acuerdo con ello, el análisis genético *post-mortem* o autopsia molecular de genes causales de CAs puede explicar una proporción de la MSI en jóvenes (Torkamani *et al.*, 2016). Adicionalmente, las CAs puede ser genéticamente diagnosticadas durante la vida del paciente mediante el análisis de genes implicados en estas enfermedades. Sin embargo, una proporción variable de los casos clínicamente diagnosticados con una CA quedan sin diagnóstico molecular tras el análisis de los genes causales conocidos, lo que ha llevado a sospechar que aún existen genes causales no identificados (Refaat *et al.*, 2015).

Tabla 1.1 Porcentaje de casos de MSI tras estudio *post-mortem* realizados en población joven

Año	País	Número de autopsias	Casos de MSI (%)	Referencia
2001	Italia	273	17	Corrado <i>et al.</i> 2001
2004	Australia	193	31	Doolan <i>et al.</i> 2004
2005	Australia	241	29	Puranik <i>et al.</i> 2005
2009	Reino Unido	118	23	De Noronha <i>et al.</i> 2009
2011	Dinamarca	469	29	Winkel <i>et al.</i> 2011
2011	Irlanda	342	26	Margey <i>et al.</i> 2011

MSI: Muerte súbita inexplicada

1.1.3 Potencial de acción cardiaco

La actividad eléctrica del corazón comienza con la generación espontánea de un potencial de acción (PA) en las células marcapasos del nodo sinusal (NS), el cual se propaga a través de fibras especializadas hacia las aurículas y el nodo aurículo-ventricular (AV). Posteriormente, el PA viaja desde el nodo AV hacia los ventrículos, mediante el sistema His-Purkinje, lo que desencadena la contracción ventricular y la acción de bombeo cardiaco (Bartos *et al.*, 2015) (**Figura 1.2**).

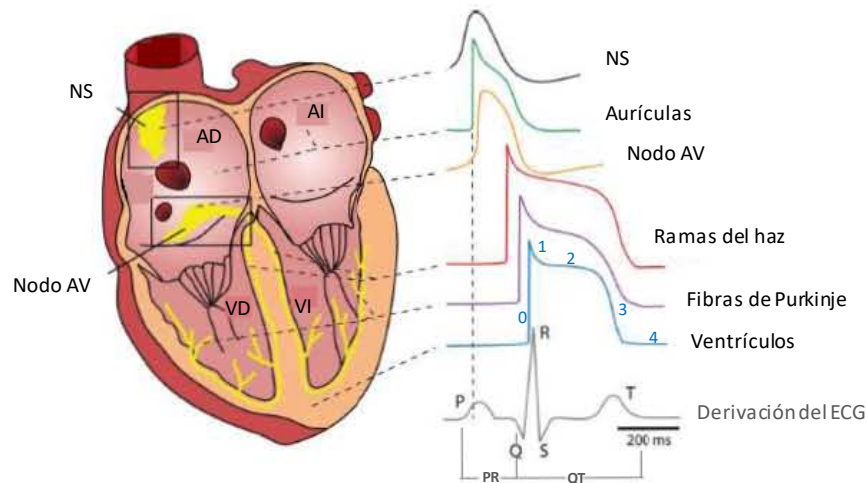


Figura 1.2 Anatomía del corazón humano (izquierda) y morfología de los PAs en sus diferentes regiones (derecha). Abajo se muestra una derivación representativa del ECG (VCS: vena cava superior, NS: nodo sinusal, AD: aurícula derecha, AI: aurícula izquierda, TIV: tabique interventricular, Nodo AV: nodo auriculoventricular, VD: ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo) (Bartos *et al.*, 2015).

El potencial de acción (PA) es un cambio transitorio del potencial membranar (E_m), generado por una modificación transitoria en la conductancia de distintos canales iónicos expresados en la membrana de la célula cardiaca (Bartos *et al.*, 2015). Éste tiene una morfología característica en cada región del corazón (**Figura 1.2**), resultado de la expresión diferencial de distintos canales iónicos y uniones comunicantes (*gap junctions*). Tradicionalmente, el PA está dividido en 5 fases:

- *Fase 0.* Es la fase de inicio y de despolarización del PA. En las células del músculo auricular, ventricular y fibras de Purkinje, es una fase de despolarización rápida, causada por la activación rápida de la corriente entrante de sodio (I_{Na}) generada por los canales Nav1.5. En cambio, en el nodo sinusal (NS) y nodo auriculo-ventricular (AV) es una fase de despolarización más lenta, mediada principalmente por la corriente de calcio I_{CaL} , y en menor grado por la I_{CaT} , generadas por canales de Ca^{2+} tipo L (Cav1.2 y 1.3) y tipo T (Cav3.1-3.3), respectivamente.
- *Fase 1.* Es la fase de repolarización rápida del PA. Está causada por la inactivación casi total de la I_{Na} y por la activación de la corriente transitoria de potasio (I_{to}), generada por los canales Kv4.2 y Kv4.3 (componente rápido), y Kv1.4 (componente lento).

- *Fase 2.* Es la fase de meseta del PA. Esta fase es más prolongada en células de músculo cardíaco auricular y ventricular. En esta fase la célula permanece despolarizada y refractaria durante cientos de milisegundos debido al equilibrio entre las corrientes entrantes (I_{CaL} y la I_{Na}), y las corrientes rectificadoras de potasio I_{Kr} e I_{Ks} , generadas por los canales $Kv7.1$ y $Kv11.1$ (hERG), también denominadas componente rápido y lento de la I_K , respectivamente. Así mismo, en la fase 2 la I_{CaL} ($Cav1.2$ y $Cav1.3$) provoca la activación de los canales de rianodina cardíacos ($RyR2$) en el retículo sarcoplásmico, esencial para el acoplamiento excitación-contracción (E-C).
- *Fase 3.* Fase de repolarización del PA cardíaco. En esta fase los canales $Cav1.2$ y $Cav1.3$ se inactivan y predominan las corrientes de potasio salientes I_{Kr} ($Kv7.1$), I_{Ks} ($Kv11.1$, hERG) y la corriente I_{K1} , generada por los canales $Kir2.X$, $Kir3.X$ y $Kir6.X$, la cual también se presenta en la fase 0 y fase 4 del PA.
- *Fase 4.* Es la fase diastólica del PA donde se alcanza el valor más negativo del E_m (i.e. potencial diastólico máximo). La corriente I_{K1} es responsable de estabilizar el E_m diastólico en el músculo auricular y ventricular. En cambio, en las células del NS y el nodo aurículo-ventricular (AV) la I_{K1} está poco expresada. Bajo estas condiciones, la corriente *funny* (I_f) generada por los canales activados por hiperpolarización sensibles a nucleótidos (HCN) causan una despolarización progresiva que eventualmente da lugar a la re-excitación o despolarización diastólica, responsable del automatismo característico del NS y el nodo AV.

El músculo cardíaco, al igual que todos los tejidos excitables es refractario a la re-estimulación durante el PA. Durante el *periodo refractario absoluto* es imposible desencadenar un segundo PA (pues los canales de sodio se encuentran inactivados), mientras que en el *periodo refractario relativo* la célula puede llegar a excitarse con una señal muy intensa, generando un PA de baja amplitud. Este periodo termina después de la fase de hiperpolarización (denominada post-potencial), donde todos los canales de Na^+ están cerrados y disponibles para un nuevo estímulo (Boron *et al.*, 1999).

1.1.4 Acoplamiento electromecánico del corazón

El Ca^{2+} es un factor indispensable para la contracción del músculo ventricular (Bartos *et al.*, 2015). La despolarización de los túbulos T (invaginaciones del sarcolema que ponen a la membrana plasmática en estrecha proximidad con el retículo sarcoplásmico) induce la activación de los receptores de dihidropiridina o canales de calcio tipo L (Cav1.2 y Cav1.3), lo que genera una pequeña afluencia de Ca^{2+} (I_{CaL}) hacia el interior de la célula. Aunque la I_{CaL} no es suficiente para causar la contracción cardíaca, desencadena la liberación masiva de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (SR), a través de los canales de rianodina cardíacos (RyR2), en un proceso de amplificación conocido como *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* (LCIC). Como resultado, el Ca^{2+} liberado baña los microfilamentos contráctiles y se une a proteínas de unión a Ca^{2+} , induciendo la contracción del músculo cardíaco (Fabiato, 1985; Bers, 2002) (**Figura 1.3**).

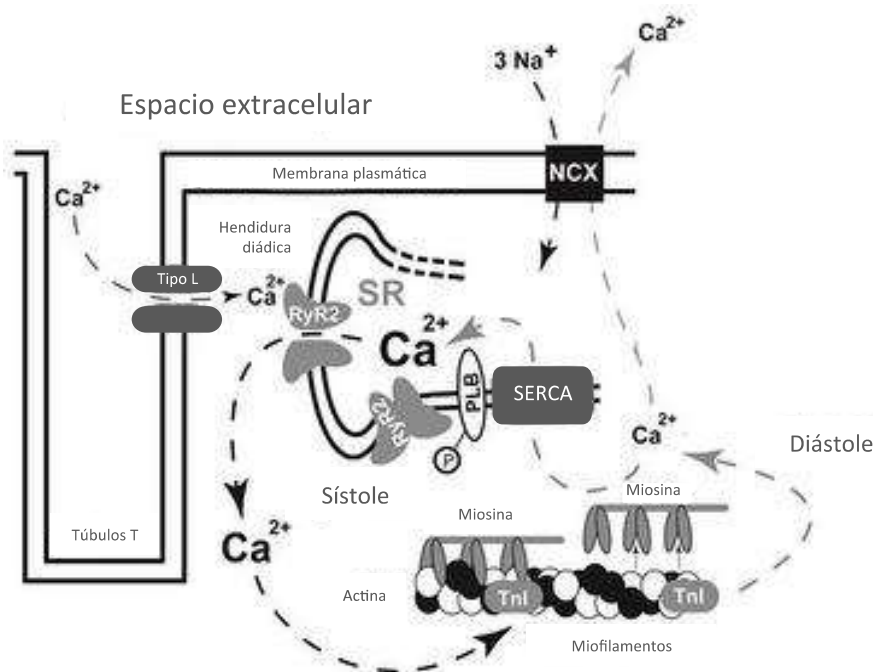


Figura 1.3 Acoplamiento electromecánico en la célula cardíaca. El Ca^{2+} liberado por los receptores de dihidropiridina (canales de calcio tipo L) hacia la hendidura diádica inducen la *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* a través de los receptores de rianodina cardíacos (RyR2), que amplifican la señal de Ca^{2+} entrante unas ~4 a 20 veces. Las flechas indican el desplazamiento del Ca^{2+} durante la sístole (flechas oscuras en la porción izquierda) y diástole (flechas en color más claro en la porción derecha). RS: retículo sarcoplásmico, PLB: fosfolamban, TnI: troponina I, NCX: intercambiador Na^+ - Ca^{2+} .

Para la relajación cardíaca, el Ca^{2+} (~70%) es devuelto al RS a través de la bomba ATPasa- Ca^{2+} (SERCA) o extruido de la célula (~28%) por el intercambiador electrogénico NCX (transporta 3 Na^+ por cada Ca^{2+}). El Ca^{2+} restante es removido por la ATPasa- Ca^{2+} sarcolémica y por el uniportador de calcio mitocondrial (UCM). En condiciones basales, SERCA está inhibida por la proteína fosfolamban (PLB). Sin embargo, durante la estimulación β -adrenérgica, la cinasa A dependiente de AMPc (PKA) fosforila a PLB, evitando la inhibición de PLB sobre SERCA, por lo que ésta última secuestra Ca^{2+} con mayor rapidez, contribuyendo a la respuesta inotrópica cardíaca en presencia de β -agonistas (Smeazzetto *et al.*, 2013). En cada latido, la cantidad de Ca^{2+} extruido/resecuestrado debe igualar la cantidad de Ca^{2+} entrante, de lo contrario pueden desarrollarse arritmias como resultado de una corriente entrante transitoria mediada por NCX.

1.2 Canalopatías Arritmogénicas

Las canalopatías arritmogénicas (CAs) genéticas constituyen un grupo de enfermedades eléctricas primarias del corazón, causadas por mutaciones en genes que codifican canales iónicos cardíacos (o proteínas asociadas a su función) responsables de generar el PA cardíaco (Amin *et al.*, 2010). Las CAs también pueden ser adquiridas, como resultado del un desbalance electrolítico (*e.g.* hipocalcemia), el efecto de un agente farmacológico (*e.g.* toxinas o medicamentos) o por fenómenos autoinmunes, donde los anticuerpos atacan algún canal iónico. La susceptibilidad al desarrollo de CAs y arritmias mortales en respuesta a ciertos fármacos o toxinas muchas veces puede estar influenciada por ciertas mutaciones genéticas y/o polimorfismos. Las CAs más frecuentes son el síndrome de QT largo (SQTL), el síndrome de Brugada (SBr), la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) y el síndrome de QT Corto (SQTC). Sin embargo, algunos trastornos arritmogénicos de etiología diversa, como la disfunción del nodo sinusal (DNS) y la taquicardia ventricular idiopática (TVI) pueden ser considerándose CAs cuando están causados por mutaciones en canales iónicos. Tratándose de enfermedades genéticas heredables, en estos casos el inicio de los síntomas suele ocurrir a edades tempranas (Lei *et al.*, 2008). Las CAs pueden ser el resultado de mutaciones que alteran la expresión y/o la función de los canales iónicos cardíacos, lo que puede provocar diversos cambios en la

propagación y/o en la morfología del PA, tales como la prolongación de su duración, acortamiento de su duración y/o generación post-potenciales tempranos o tardíos que predisponen en graves arritmias ventriculares y MSC.

1.2.1 Síndrome de QT largo (SQTL)

El síndrome de QT largo (SQTL) heredable es un trastorno de la repolarización cardiaca que se caracteriza por la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma (ECG) y que predispone al desarrollo de arritmias ventriculares malignas (de tipo *torsades de pointes*), síncope y MS (Amin *et al.*, 2013). Aunque en México no se tienen estadísticas confiables sobre su prevalencia, se considera la más frecuente de las CAs en poblaciones caucásicas, con una prevalencia de 1:2,000 a 1:2,500 individuos (Priori *et al.*, 2015; Itoh *et al.*, 2016). Desafortunadamente, la MS llega a ser la primera manifestación de la enfermedad en algunos casos; y puede ser causa de muerte fetal y muerte de cuna (Oliveira *et al.*, 1999; Pilmer *et al.*, 2014; González-Melchor *et al.*, 2014). Hasta el 20% de las MSI que son sujetos a autopsia molecular logran explicarse por mutaciones que causan SQTL (Semsarian *et al.*, 2015; Semsarian & Ingles, 2016). Dependiendo de la corriente iónica afectada, el síncope y/o el paro cardíaco pueden desencadenarse con mayor probabilidad durante el reposo o el sueño; o durante el esuerzo físico o el estrés emocional (Hammond-Haley *et al.*, 2016; Cheung *et al.* 2016).

Clínicamente, el SQTL se caracteriza por una prolongación del intervalo QT en el ECG (Krönauer & Friederich, 2015). Convencionalmente, se utiliza la fórmula de Bazett para corregir la duración del intervalo QT de acuerdo con la frecuencia cardiaca ($QTc = QT/\sqrt{RR}$; donde QTc es el intervalo QT corregido por la frecuencia y RR el intervalo entre 2 complejos QRS) (Bazett *et al.* 1920, Nademanee *et al.*, 1997). Sin embargo, también pueden usarse fórmulas alternativas como la de Fredericia, Hodges o Sagie (Fridericia *et al.* 1920; Hodges *et al.* 1983; Sagie *et al.* 1992). Los valores de QTc entre 380 y 430 ms en varones y entre 380 y 450 ms en mujeres son considerados normales; mientras que los un $QTc \geq 450$ ms en hombres y ≥ 470 ms en mujeres se consideran un QTc prolongado (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Valores de QTc corregidos por Bazett

Clasificación	1-15 años (ms)	Hombre adulto (ms)	Mujer adulta (ms)
Normal	<440	<430	<450
Limítrofe	440-460	430-450	450-470
Prolongado	>460	>450	>470

Sin embargo, se ha mostrado que existe un intervalo de QTc ‘limítrofe’ observable tanto en portadores como en sujetos sanos (**Figura 1.4**). Puesto que los valores de QTc limítrofes se encuentran en individuos sanos y en individuos con SQTL, la puntuación de Schwartz (Schwartz *et al.* 1993) permite evaluar la probabilidad de presentar la enfermedad, basándose en criterios electrocardiográficos, clínicos y de antecedentes familiares (**Tabla 1.3**).

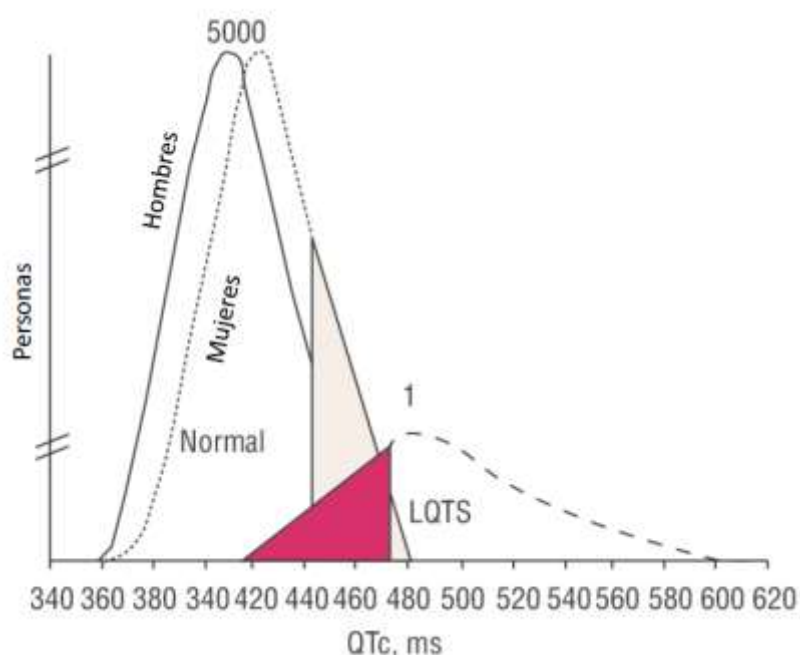


Figura 1.4 Distribución de la duración del intervalo QT corregido por la frecuencia cardíaca (QTc) en pacientes con mutaciones causales de SQTL en los genes *KCNQ1*, *KCNH2* o *SCN5A* (curvas en el lado derecho) y en familiares no afectados (curva en el lado izquierdo) (Medeiros-Domingo *et al.* 2007).

Tabla 1.3 Puntuación de Schwartz

Criterios	Puntaje*
Hallazgos electrocardiográficos	
QT corregido (QTc)	
> 480ms	3
460-479	2
450-460	1
Taquicardia helicoidal (TdP)	2
Alternancia de la onda T	1
Muecas de la onda T en 3 derivaciones del ECG	1
Bradicardia para la edad	0.5
Historia clínica	
Síncope	
Con estrés	2
Sin estrés	1
Sordera congénita	0.5
Historia familiar	
Diagnóstico definitivo de SQT en familiares cercanos	1
MSI antes de los 30 años de edad en familiares cercanos	0.5

* Los criterios diagnósticos de Schwartz utilizan una puntuación del 1 al 9. Si la puntuación es ≤ 1 la probabilidad de presentar la enfermedad es baja; si es 2-3 la probabilidad es intermedia, y si ≥ 4 , es alta. En la valoración de un caso con sospecha de SQT se debe descartar el uso de fármacos que pudieran prolongar el intervalo QT (Schwartz *et al.* 1982).

El SQT tiene un patrón de herencia autosómica *dominante* (síndrome de Romano-Ward) en la mayoría de los casos. Sin embargo, existe una forma más grave y rara que se acompaña de sordera congénita (síndrome Jervell y Lange-Nielsen) que se hereda bajo un patrón autosómico *recesivo* (Crotti *et al.*, 2008), y también se han descrito algunos casos recesivos de Síndrome de Romano-Ward, sin sordera congénita (Priori *et al.*, 1998). Hasta la fecha se conocen 16 genes causales de SQT; aunque la mayor parte de las mutaciones (~90%) suelen localizarse en 3 genes principales: *KCNQ1* (SQT1), *KCNH2* (SQT2) y *SCN5A* (SQT3), que codifican los canales Kv7.1, Kv11.1 (o hERG) y Nav1.5, respectivamente (Nakano & Shimizu, 2016) (**Tabla 1.4**). Pese al gran número de genes identificados como causales de SQT, en el ~20% de los casos no logra identificarse una

mutación en los mismos, lo que sugiere que podrían existir otros genes causales no descritos a la fecha.

Tabla 1.4 Genes causales de síndrome de QT largo

Subtipo	Gen	Locus	Proteína	Efecto funcional	Frecuencia
Síndrome de QT largo (Romano Ward)					
LQT1	<i>KCNQ1</i>	11p15.5	Kv7.1	PDF, reducción de IKs	30-35%
LQT2	<i>KCNH2</i>	7q35-36	Kv11.1	PDF, reducción de IKr	25-30%
LQT3	<i>SCN5A</i>	3p21-p24	NaV1.5	GDF, incremento de INa tardía	5-10%
LQT4	<i>ANKB</i>	4q25-q27	Ankirina B	PDF, altera múltiples canales	< 1%
LQT5	<i>KCNE1</i>	21q22.1	MinK	PDF, reducción de IKs	< 1%
LQT6	<i>KCNE2</i>	21q22.1	MiRP1	PDF, reducción de IKr	< 1%
LQT7	<i>KCNJ2</i>	17q23	Kir2.1	PDF, reducción de IK1	< 1%
LQT8	<i>CACNA1C</i>	12p13.3	Cav1.2	GDF, incremento de ICaL	Raro
LQT9	<i>CAV3</i>	3p25.3	Caveolina 3	Incremento de INa tardía	< 1%
LQT10	<i>SCN4B</i>	11q23.3	Nav4	GDF, incremento de INa tardía	Raro
LQT11	<i>AKAP9</i>	7q21-q22	Yotiao	PDF, reducción de IKs	Raro
LQT12	<i>SNTA1</i>	20q11.2	Sintrofina 1	Incremento de INa tardía	Raro
LQT13	<i>KCNJ5</i>	11q24.3	Kir3.4	PDF, reducción de IK _{ACh}	Raro
LQT14	<i>CALM1</i>	14q32.11	Calmodulina 1	Alteración del manejo de Ca ²⁺	< 1%
LQT15	<i>CALM2</i>	2p21	Calmodulina 2	Alteración del manejo de Ca ²⁺	< 1%
LQT16	<i>CALM3</i>	19q13.32	Calmodulina 3	Alteración del manejo de Ca ²⁺	< 1%
Síndrome Jervell Lange-Nielsen					
JLN1	<i>KCNQ1</i> *	11p15.5	Kv7.1	PDF, reducción de IKs	Raro
JLN2	<i>KCNE1</i> *	21q22.1	MinK	PDF, reducción de IKs	Raro

PDF: Pérdida de la función; GDF: Ganancia de la función; *patrón de herencia recesivo.

1.2.2 Síndrome de Brugada

El Síndrome de Brugada (SBr) es un trastorno genético que provoca alteraciones graves en la repolarización cardíaca que predisponen al desarrollo de taquicardias ventriculares malignas, síncope y MS. Electrocardiográficamente, se caracteriza por la elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales del ECG (Refaat *et al.*, 2016). Se han descrito 3 patrones de elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales del ECG que son característicos de SBr (**Figura 1.5**). Sin embargo, el único patrón considerado patognomónico para el diagnóstico de SBr es el patrón tipo I.

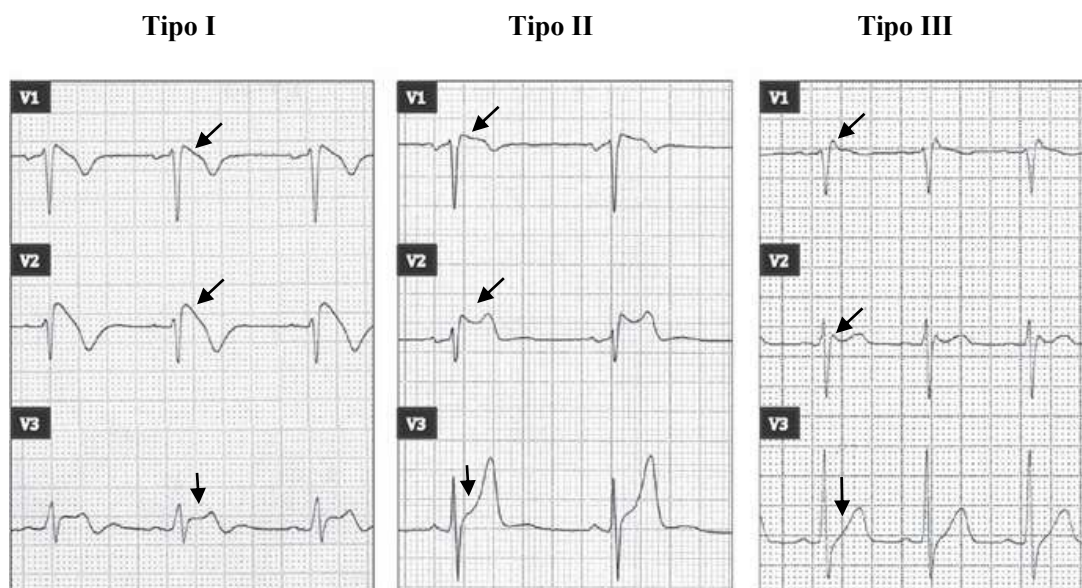


Figura 1.5 Patrones característicos de pacientes con SBr. *Patrón tipo I*: elevación descendente del segmento ST ≥ 2 mm en más de una derivación precordial derecha, con onda T negativas (morfología en “lomo de delfín”). *Patrón tipo II*: elevación del segmento ST ≥ 2 mm en precordiales derechas, con onda T positiva o isobifásica (morfología de “silla de montar”). *Patrón tipo III*: elevación del segmento ST ≤ 1 mm, con onda T positiva. Los tres patrones pueden observarse en el SBr, incluso en un mismo paciente. La elevación de segmento se señala con una flecha en cada caso.

El haber presentado: 1) fibrilación ventricular, 2) taquicardia ventricular polimórfica, 3) la inducibilidad de arritmias ventriculares durante el estudio electrofisiológico, 4) el síncope o respiración agónica nocturna, y/o 5) la historia familiar de MS en edad previa a los 45 años son factores del riesgo de MS en estos pacientes. Los pacientes con SBr pueden presentar el patrón de manera transitoria, por lo que en ocasiones es necesario hacer pruebas farmacológicas de provocación (con bloqueadores del canal de sodio como ajmalina, flecainida o procainamida) para desenmascarar el síndrome (Antzelevitch *et al.*, 2005). Así mismo, el uso de derivaciones altas en el ECG (*i.e.* precordiales derechas en espacios intercostales superiores) aumenta la sensibilidad del ECG para la detección del patrón I de SBr.

Actualmente, la prevalencia del SBr se estima entre 1 y 12 cada 10,000 personas; siendo más prevalente en hombres jóvenes de origen del sudeste asiático (Nademanee *et al.*, 1997) (Sarquella-Brugada *et al.*, 2015). Se calcula que el SBr es la cuasa del 4% de las todas las

MS en población joven, y que podría ser la causa de hasta el 20% de las MSI registradas en jóvenes (Berne & Brugada, 2012). En general, el SBr afecta más a hombres que a mujeres (8:1). Los hombres suelen ser más sintomáticos y presentan mayor riesgo de MS, así como mayor inducibilidad de FV durante el estudio electrofisiológico, lo que potencialmente podría atribuirse a la expresión diferencial canales entre ambos géneros (Shimizu *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2011). Los síntomas suelen aparecer en la cuarta década de la vida típicamente en situaciones de predominio vagal, como el reposo o durante el sueño. El SBr se presenta en individuos con corazones estructuralmente normales (al menos a nivel macroscópico), aunque se ha reportado que algunos pacientes con SBr presentan alteraciones miocárdicas microscópicas, lo que sugiere que puede inducir cambios cardiomiopáticos en algunos pacientes (Frustaci *et al.*, 2005; Frustaci *et al.*, 2009). A la fecha, el único tratamiento que se considera eficaz en pacientes con SBr es la implantación de un desfibrilador automático (DAI). Sin embargo, la quinidina (antiarrítmico con actividad bloqueadora de canales de sodio como Nav1.5 y algunos canales de potasio, como Kv1.4 y Kv4.2 (Ito), y Kv11.1 (IKr) y los fármacos betamiméticos como el isoproterenol (que aumentan la corriente entrante I_{CaL}) están indicados en pacientes asintomáticos, y se consideran una alternativa terapéutica al DAI en niños (Gourraud *et al.*, 2017).

Desde el punto de vista genético, el SBr es una enfermedad con un patrón de herencia autosómica dominante, caracterizado por ser de penetrancia incompleta y expresividad variable, probablemente debido factores ambientales, de género y a la presencia genes modificadores. A la fecha, se conocen 17 genes relacionados con el SBr (**Tabla 1.5**). Las mutaciones que causan una pérdida de función del canal de sodio *SCN5A* son las más frecuentes (15-30% de los casos); mientras que la contribución del resto de genes explica el 10-15% de los casos. Así, una proporción muy alta de pacientes (60-70%) no se detectan mutaciones en los genes causales de SBr (Priori *et al.*, 2000; Juang & Horie, 2016).

Tabla 1.5 Genes vinculados con el síndrome de Brugada

Subtipo	Gen	Locus	Proteína	Efecto funcional	Frecuencia
SBr1	<i>SCN5A</i>	3p21-p24	Nav1.5, INa	LOF	20-25 %
SBr2	<i>GPD1L</i>	3p22.3	G3PD1L	LOF	Raro
SBr3	<i>CACNA1C</i>	2p13.3	Cav1.2	LOF	6-7 %
SBr4	<i>CACNB2</i>	10p12	Cavβ2	LOF	4-5 %
SBr5	<i>SCN1B</i>	19q13.1	Navβ1	LOF	1-2 %
SBr6	<i>KCNE3</i>	11q13.4	MiRP2, Ito/Iks	GOF	< 1 %
SBr7	<i>SCN3B</i>	11q23.3	Navβ3	LOF	Rara
SBr8	<i>KCNH2</i>	7q35	Kv11.1, Ikr	GOF	1-2 %
SBr9	<i>KCNJ8</i>	12p12.1	Kir6.1, IK-ATP	GOF	Rara
SBr10	<i>CACNA2D1</i>	7q21-22	Cava2-1	LOF	Rara
SBr11	<i>RANGRF</i>	17p13.1	MOG1	LOF	Rara
SBr12	<i>KCNE5</i>	Xq22.3	MiRP4, Kv4.3, Ito	GOF	Rara
SBr13	<i>KCND3</i>	1p13.2	Kv4.3, Ito	GOF	Rara
SBr14	<i>HCN4</i>	15q24.1	HCN4, If	LOF	Rara
SBr15	<i>SLMAP</i>	3p21.2-p14.3	SLMAP	LOF	Rara
SBr16	<i>TRPM4</i>	19q13.33	TRPM4	LOF	Rara
SBr17	<i>SCN2B</i>	11q23	Navβ2	LOF	Rara
SBr18	<i>SCN10A</i>	3p22.2	Nav1.8	LOF	2.5-16 %
SBr19	<i>HEY2</i>	6q22.31	SUR2A, IK-ATP	GOF	Rara
SBr20	<i>PKP2</i>	12p11.21	plakofilina 2	LOF	2.5 %
SBr21	<i>ABCC9</i>	12p12.1	SUR2	LOF	4-5 %

LOF: Pérdida de la función; GOF: Ganancia de la función.

1.2.3 Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) es una enfermedad hereditaria caracterizada por la presentación de arritmias malignas (taquicardia ventricular polimórfica bidireccional) que se desarrollan bajo la estimulación adrenérgica durante el ejercicio o estrés emocional (Tanaka *et al.*, 2015). Tiene una tasa de mortalidad de 35% a 50% a la edad de 35 años, por lo que se considera una de las CAs más graves. Su prevalencia en población caucásica es de 1 cada 10,000 individuos (Sumitomo, 2016). El ECG al reposo suele ser normal, aunque en ocasiones presentan bradicardia leve y presencia ondas U (Napolitano *et al.*, 1993). La MS durante el ejercicio puede ser la

primera manifestación de la enfermedad (Tester *et al.*, 2011). El tratamiento primario de la TVPC consiste en la restricción del ejercicio y el uso de beta-bloqueadores, en algunos casos junto con flecainida (Pott *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista genético, se conocen 5 genes causales de la enfermedad (**Tabla 1.6**). La mayoría de los casos (60-70%) son causados por mutaciones en el gen del receptor de rianodina cardíaco (*RYR2*), que causa una forma autosómica dominante de la enfermedad (Zhao *et al.*, 2015). El ~1-5% de los casos tienen un patrón de herencia autosómico recesivo causados por mutaciones en el gen de la calsecuestrina 2 (*CASQ2*), una proteína de unión Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (Faggioni *et al.*, 2012).

Tabla 1.6 Taquicardia ventricular polimórfica Catecolaminérgica por subtipo genético

Subtipo	Gen	Locus	Proteína	Frecuencia de casos
TVPC1	<i>RYR2</i>	1q42.1-q43	RyR2	60-70%
TVPC2*	<i>CASQ2</i>	1p13.3-p11	Calsecuestrina-2	1-5%
TVPC3	<i>KCNJ2</i>	7p22-p14	Kir2.1	Rara
TVPC4*	<i>CALMI</i>	14q32.11	Calmodulina	Rara
TVPC5	<i>TRDN</i>	6q22.31	Triadina	Rara

*Patrón de herencia autosómico recesivo

La mayor parte de las mutaciones reportadas como causales en *RYR2* identificadas en pacientes con TVPC tienen un efecto de ‘ganancia de la función’, que generan canales hiperactivos propensos a liberar Ca^{2+} de forma espontánea en ausencia de la I_{Ca} lo que provoca la generación de post-despolarizaciones tardías (DADs). Entre los mecanismos propuestos que explican esta hiperactividad y la fuga de Ca^{2+} diastólico se encuentra: 1) la disminución del umbral de activación de los canales RyR2, el cual es rebasado únicamente ante la sobrecarga de Ca^{2+} durante la estimulación β -adrenérgica; 2) la eliminación de las interacciones inter-subunidades fundamentales para la estabilización del estado cerrado de RyR2; y 3) la existencia de mutaciones que potencian la disociación de las proteínas RyR2 y FKBP12.6, ésta última una proteína de unión a RyR2 que estabiliza el estado cerrado del canal (Zhao *et al.*, 2015). Por otro lado, la única mutación conocida con un efecto de ‘pérdida de la función’ en RyR2 es la mutación p.A4860G, que disminuye la respuesta al

Ca²⁺ luminal y la probabilidad de apertura de RyR2 en presencia de agonistas completos como el Ca²⁺ y la cafeína (Priori *et al.*, 2002a). Los ratones *RYR2-A4860G^{+/-}* tienen un corazón estructuralmente normal y taquicardia ventricular bidireccional cuando son sometidos a estimulación adrenérgica (Jiang, Chen, Wang, Zhang, & Chen, 2007).

1.2.4 Disfunción del nodo sinusal

La disfunción del nodo sinusal (DNS) se describió hace 60 años como una complicación arrítmica después de la cardioversión o desfibrilación mediante descarga eléctrica (Lown, 1967). Sin embargo, ahora se sabe que se trata de una colección de condiciones en las el impulso cardíaco se genera de una forma anormal (Morris & Kalman, 2014). Este padecimiento se caracteriza por bradicardia sinusal, paro sinusal, incompetencia cronotrópica y susceptibilidad a la taquicardia auricular, especialmente la fibrilación auricular; aunque los episodios de taquicardias auriculares que coexisten con la bradicardia sinusal (síndrome de taquicardia-bradicardia) también son comunes en este trastorno (**Tabla 1.7**) (Martin & Hogg, 2010; Fish, 2000; Benson *et al.*, 2003). El diagnóstico de la DNS es en gran medida electrocardiográfico (Benson *et al.*, 2003). En algunos casos, el diagnóstico puede dificultarse debido a un curso lento y/o errático de la enfermedad; y particularmente, puede no detectarse en las etapas iniciales debido a que sólo se presenta bradicardia sinusal (Ferrer *et al.* 1980).

Tabla 1.7 Manifestaciones electrocardiográficas de la DNS*

Rasgos electrocardiográficos
<ul style="list-style-type: none"> • Bradiarritmias auriculares <ul style="list-style-type: none"> - Bradicardia sinusal (< 60 latidos por minuto) - Paro auricular (con y sin escape de unión) - Bloqueo de salida sinusal (grado I - III) - Bradicardia auricular ectópica - Fibrilación auricular con respuesta ventricular lenta - Pausas mayores a 3 segundos después del masaje carotideo - Pausas prolongadas después de la cardioversión por taquiarritmias auriculares • Taquicardia auriculares <ul style="list-style-type: none"> - Fibrilación auricular - Flutter auricular

- Taquicardia auricular
- Bradicardias y taquicardias alternantes
- Síndrome de bradicardia-taquicardia. Caracterizado por el desarrollo de taquicardias auriculares paroxísticas en pacientes con bradicardia sinusal o bloqueo sinoauricular.
- Retraso o interrupción en la transmisión de un impulso desde las aurículas a los ventrículos (Bloqueo AV, grado I-III)
- Incompetencia cronotrópica (respuesta inadecuada de la frecuencia cardíaca al ejercicio o estrés)

*Documentables en ECG, Holter-24h, prueba de esfuerzo (procesos no invasivos) y/o bajo estimulación cardíaca en estudio electrofisiológico (proceso invasivo).

Los pacientes con DNS a menudo son asintomáticos, pero pueden presentar palpitaciones, disnea, síncope o MS (**Tabla 1.8**); que resultan de la reducción del flujo sanguíneo hacia el cerebro durante los episodios sostenidos de bradicardia y/o taquicardia (Benson *et al.*, 2003; Adan & Crown, 2003). Algunos otros síntomas de la DNS (*e.g.* fatiga, irritabilidad, pérdida de memoria, aturdimiento, palpitaciones o defectos cognitivos) están presentes en otros trastornos comunes en pacientes de edad avanzada, lo que puede provocar que algunos casos de DNS sean diagnosticados erróneamente (Adan & Crown, 2003). El tratamiento farmacológico de la DNS suele ser ineficaz, por lo que una vez que se han descartado trastornos reversibles (**Tabla 1.9**), la terapia primaria es la implantación de un marcapasos (Choudhury *et al.*, 2015a).

**1.8 Síntomas más
comunes en paciente con DNS**

Sistema nervioso central	Sistema cardiovascular	Otras causas
Demencia	<i>Angina pectoris</i>	Fatiga
Irritabilidad	Tromboembolia arterial	Enrojecimiento
Letargia	Accidente cardiovascular	Disnea intermitente
Aturdimiento	Falla cardíaca congestiva	Alteraciones digestivas
Pérdida de la memoria	Palpitaciones	Oliguria o edema periódico
Despertar nocturno		
Síncope o pre-síncope		

Aunque algunos estudios han asociado la DNS a procesos de remodelamiento eléctrico, fibrosis o degeneración del NS (pérdida de las células del NS), al de día de hoy se considera que la mayoría de los casos con DNS son idiopáticos y que su origen puede ser multifactorial (**Tabla 1.9**) (Adan & Crown, 2003; Morris & Kalman, 2014). Este trastorno es mucho más frecuente en adultos mayores, particularmente a partir de la quinta y sexta

década de la vida, presentándose en 1 de cada 600 pacientes cardíacos mayores de 65 años; siendo responsable de $\geq 50\%$ de las implantaciones de marcapasos que existen en países desarrollados (Adan & Crown, 2003; Morris & Kalman, 2014).

Aunque la DNS es más frecuente en adultos mayores, también puede ocurrir en el feto, infantes y niños (Epstein *et al.*, 2008; Choudhury *et al.*, 2015c; Beder *et al.* 1983; Benson *et al.*, 2003). El 80% de los casos de DNS en niños se presenta cuando existe historia previa de cirugía cardíaca, debida a una malformación cardíaca congénita (Benson *et al.*, 2003). Sin embargo, también puede presentarse sin que exista una causa aparente (Nordenberg *et al.* 1976; Ward *et al.* 1984; Choudhury *et al.*, 2015).

La DNS puede ocurrir como un desorden genético en familias o en casos esporádicos (*i.e.* sólo un individuo en la familia se encuentra afectado). Generalmente, tratándose de enfermedades genéticas estos individuos son diagnosticadas en la primera década de la vida (Ishikawa *et al.*, 2017). A la fecha, se ha reportado casos familiares de DNS con herencia autosómica dominante (de penetrancia variable) y casos con un patrón de herencia recesiva (Bharati *et al.*, 1992; Ector & Hauwaert, 1980; Radford & Izukawa, 1975; Scott *et al.*, 1976). Aunque varios estudios han mostrado que las mutaciones en *SCN5A* y *HCN4* explican buena parte (30% y 5%, respectivamente) de los casos familiares o esporádicos de DNS de inicio temprano, son pocos los estudios que han llevado a cabo el escrutinio de todos los genes que participan en la función normal o patológica del NS (Celestino-Soper *et al.*, 2015; Ichikawa *et al.*, 2016; Ishikawa *et al.*, 2017); aunque debe decirse que la contribución relativa de las corrientes iónicas en el NS es aún materia de debate y los mecanismos que contribuyen a su disfunción no están totalmente entendidos (Morris & Kalman, 2014). Sin embargo, ya que la DNS se asocia con distintas taquiarritmias auriculares, en particular la fibrilación auricular (FA), numerosas publicaciones se han centrado en el estudio de la base genética de la DNS en el contexto de la FA y de la remodelación eléctrica (Karst *et al.*, 2008; Choudhury *et al.*, 2015; Bartos *et al.*, 2015) (**Tabla 1.10**).

Tabla 1.10 Genética de la disfunción del nodo sinusal relacionada con FA

Gen	Locus	Proteína	Frecuencia de casos
<i>SCN5A</i>	3p22.2	Subunidad del canal de sodio cardíaco (Nav1.5)	Desconocida
<i>HCN4*</i>	15q24.1	HCN4	Desconocida
<i>KCNQ1</i>	11p15.5	Subunidad α del canal de potasio (Kv7.1)	Desconocida
<i>ANK2*</i>	4q25-q26	Ankirina B	Desconocida
Cx43/45*	6q22.31/ 17q21.31	conexinas	Desconocida
<i>RYR2*</i>	1q42.1-q43	Resceptor de rianodina cardíaco	Desconocida
<i>CASQ2</i>	1p13.3-p11	Calsecuestrina	Desconocida
<i>EMD*</i>	Xq28	Emerina	Desconocida

*La DNS está causada por la pérdida de la función de la proteína

1.3 Diagnóstico genético-molecular de las CAs

El diagnóstico clínico de las CAs puede llegar a ser una tarea complicada de realizar, ya que muchos pacientes pueden tener un patrón electrocardiográfico intermitente o limítrofe y/o ser asintomáticos (Priori *et al.*, 2015). Sin embargo, el análisis genético o diagnóstico molecular de un paciente puede confirmar la sospecha clínica de una CA; mientras que el estudio de segregación de una mutación patogénica (o potencialmente patogénica) puede identificar a familiares en riesgo de MS, y en algunos casos puede tener implicaciones para dirigir su tratamiento (Tester & Ackerman, 2005; Priori *et al.*, 2015). Por otro lado, la análisis genético puede llevarse a cabo *post-mortem* en casos de MSI. La identificación de una mutación causal de CA puede tener importantes implicaciones médico-legales, ya que puede esclarecer la causa de la MSI en el ~30% de los casos que ocurren en población joven; además de mejorar el entendimiento de la muerte y el cierre del duelo en la familia (Miles & Behr, 2016; Scheimberg, 2013).

1.3.1 Problemas para el diagnóstico genético-molecular

El estudio genético-molecular de los pacientes requiere de la estrecha colaboración entre cardiólogos, genetistas clínicos y genetistas moleculares ya que las pruebas genéticas

pueden ser difíciles de interpretar y tienen limitaciones (Hofman & Wilde, 2016; Ackerman, 2015). Uno de los principales problemas en el diagnóstico molecular es la identificación de variantes nuevas con un papel poco claro en la patogenicidad de la enfermedad, ya que su efecto funcional es desconocido. La interpretación funcional puede complicarse aún más si se trata de un polimorfismo raro (que está previamente reportado en controles en otras bases de datos) o son variantes localizadas en regiones de la proteína cuya importancia funcional se desconoce. Por otro lado, la mayoría de las mutaciones descritas para estas enfermedades son privadas, es decir, ocurren en una sola familia, y sus consecuencias funcionales o fisiopatológicas pueden ser inciertas, de tal manera que se describen como “variantes de significancia desconocida” (VUS, por sus siglas en inglés). A la fecha, sólo una pequeña fracción de todas las variantes identificadas en familias o individuos con SQT, SBr y TVPC han sido estudiadas funcionalmente, y una proporción aún menor ha sido estudiada en modelos animales o directamente en cardiomiocitos. Aunque hay programas computacionales que predicen las consecuencias funcionales de las mutaciones, a la fecha ninguno de estos métodos ha sido validado rigurosamente para darle valor clínico. Así, la falta de validación biológica o funcional de los efectos de las mutaciones sigue siendo la limitación más importante en la interpretación de las CAs. Cuando la estructura familiar es adecuada, los estudios familiares pueden ser de gran ayuda en la identificación de genes causales y genes modificadores, al analizar la co-segregación de variantes sospechosas con la enfermedad, aunque la penetrancia incompleta o la expresión subclínica pueden complicar la interpretación de un patrón de segregación en una familia. Esto es particularmente complicado para las enfermedades con baja penetrancia como el SBr (Probst et al., 2009).

Se ha mostrado que algunos polimorfismos pueden modular algunos rasgos electrocardiográficos (*e.g.* duración del intervalo QTc), así como el efecto de otras mutaciones patogénicas que causan CAs. Además, se sabe que algunos polimorfismos pueden modular la respuesta a fármacos, por lo que la elucidación del genotipo exacto puede ser de gran utilidad en el entendimiento de la complejidad y heterogeneidad de las CAs (Wijeyeratne & Behr, 2016; Campuzano *et al.*, 2014).

De manera general, se estima que el 85% de las mutaciones que causan enfermedades mendelianas se encuentran en regiones codificantes y que aproximadamente el 75% de

estas mutaciones son puntuales y de sentido erróneo (Wang, Liu, Yang, & Gelernter, 2013). De acuerdo con ello, la primera estrategia para el estudio molecular de las CAs puede ser la secuenciación de los genes causales conocidos (*i.e.* secuenciación sitio dirigida). Con esta estrategia llegan a encontrarse mutaciones causales o probablemente causales en un rango variable de los casos dependiendo de cada enfermedad: desde el 25% de los casos en SBr hasta el 75-80% de los casos de SCTL. La SNG sitio dirigida generalmente solo incluye regiones codificantes, y no puede detectar alteraciones estructurales importantes (*e.g.* deleciones grandes y transversiones).

1.3.2 Clasificación de patogenicidad de una variante

De manera general, y para cualquier enfermedad mendeliana, las mutaciones que generan corrimiento del marco de lectura o grandes deleciones pueden considerarse patogénicas. En cambio, la determinación de la patogenicidad de las mutaciones de sentido erróneo (no sinónimas) es menos obvia. Sin embargo, se espera que tengan un efecto patogénico o probablemente patogénico cuando cumple uno o más de los siguientes criterios (Hofman *et al.* 2010):

- 1) Si está ausente o tiene una frecuencia alélica baja en un número significativo de controles sanos de la población general (MAF<0.01; consistente con la baja prevalencia de la enfermedad). Existen diversas bases de datos de proyectos poblacionales a gran escala para el estudio de la variación rara y común en la población general que pueden ser de utilidad (*e.g.* 1000 Genomas, ClinSeq, ExAC y ESP); así como bases que incluyen variantes patogénicas (*e.g.* ClinVar y HGMD).
- 2) La variante debe co-segregar con la enfermedad en la familia, es decir, que sólo los portadores de la mutación presenten la enfermedad (*i.e.* el fenotipo empata con el genotipo). Las variantes *de novo* están fuertemente asociadas con patogenicidad.
- 3) Cambios en la polaridad y/o tamaño del aminoácido, así como cambios en una región conservada de la proteína sugiere que tiene una mayor probabilidad de causar la enfermedad. Existen varios programas bioinformáticos que permiten explorar el posible efecto funcional de una variante con base en estas características (*e.g.* Polyphen Harvard, SIFT, *Mutation Tester*).

- 4) Los ensayos funcionales o modelos animales de la variante genética pueden ayudar a establecer el efecto funcional de la variante sobre la proteína. Si bien, ningún modelo *in vitro* o animal recapitulan fielmente la fisiología en seres humanos y las limitaciones económicas y tecnológicas muchas veces hacen prohibitivo el desarrollo de un modelo celular y particularmente animal para cada variante genética, los resultados positivos en este tipo de sistemas constituyen un importante hallazgo que respalda la patogenicidad de una variante.

De acuerdo con lo anterior, para el caso específico de las canalopatías, Campuzano *et al.* (2015b) han propuesto un sistema de puntuación numérica para clasificar una variante como: 1) *patogénica*, 2) *probablemente patogénica*, 3) *de significado clínico desconocido/indefinido* (VUS; del inglés *Variant with Unknown/Undefined Significance*), 4) *probablemente benigna* o 5) *benigna*, con base en la información disponible sobre la misma, considerando la función del gen y/o proteína en la que se encuentra; su efecto sobre la función de la proteína de acuerdo a predicciones *in silico*, y estudios *in vitro* e *in vivo*; la segregación de la mutación en la familia; y la omformación clínica que existe disponible sobre la variante (**Tabla 1.9**).

Tabla 1.9 Clasificación de patogenicidad de variantes genéticas asociadas con canalopatías arritmogénicas de Campuzano *et al.* (2015b)

Criterio	Variación genética	Puntuación
Comprobación clínica	● Identificada en un gen relacionado con la enfermedad	3 puntos
	● Identificada en un gen nuevo	2 puntos
Bases de datos	● Reportada como patogénica en bases de datos internacionales (mínimo dos estudios independientes)	3 puntos
	● Reportada como patogénica en bases de datos internacionales (previamente reportada como patogénica en un solo estudio)	2 puntos
	● No reportada previamente en estudios poblacionales (variante nueva en un gen ligado claramente a una vía funcional en desordenes eléctricos cardiacos)	1 punto
	● Reportadas en estudios poblacionales con una frecuencia del alelo menor (MAF) < 0.01	1 punto
Segregación familiar	● ≥ 5 familiares afectados, en ≥ 3 generaciones	3 puntos
	● ≤ 4 familiares afectados, en ≥ 3 generaciones	2 puntos
	● Presente únicamente en el caso índice	1 punto
	● Mutación <i>de novo</i>	2 puntos

Estudios	● Resultado positivo	2 puntos
<i>in vitro</i>	● Resultado negativo	0 puntos
Estudios	● Resultado positivo	2 puntos
<i>in vivo</i>	● Resultado negativo	0 puntos
Programas de predicción <i>in silico</i>	● Resultado positivo en ≥ 4 bases de datos diferentes	2 puntos
	● Resultado positivo en < 4 bases de datos diferentes	1 puntos
	● Resultado negativo o no disponible en bases de datos diferentes	0 puntos

Actualmente, la compleja correlación entre el genotipo y el fenotipo de las CAs es materia de amplia investigación. Por un lado, para mejorar el rendimiento de las pruebas genéticas es prioridad identificar nuevos genes causales. Dada la enorme variación genética, y la poca representación de poblaciones latinas en este tipo de estudios, es necesario describir el espectro de mutaciones, e investigar entender si algunos polimorfismos en genes de CAs pueden tener un papel modificador del cuadro clínico. Por otro lado, es necesario entender más sobre la fisiopatología de las CAs, los mecanismos que disparan las arritmias, y las implicaciones farmacogenómicas que podría tener el diagnóstico molecular.

II. JUSTIFICACIÓN

La muerte súbita cardíaca (MSC) es una de las principales causas de muerte en adultos jóvenes y niños alrededor del mundo, siendo las canalopatías arritmogénicas (CAs) una de las causas más frecuentes. Diversos estudios han mostrado que hasta un 30% de los casos de muerte súbita inexplicada (MSI) pudieran deberse a CAs. Aunque en las últimas décadas se ha descrito una gran lista de genes implicados en estas enfermedades, en una proporción importante de pacientes con fenotipo claro no se identifican mutaciones en genes conocidos. Esto sugiere que podrían existir nuevos genes y/o nuevos mecanismos implicados en las CAs. Aunque existen reportes aislados de mutaciones en pacientes mexicanos con canalopatías arritmogénicas, el espectro de mutaciones en nuestra población no se ha descrito. La identificación de genes nuevos y nuevas mutaciones causales podría contribuir al entendimiento de la fisiopatología de estas enfermedades y ser de utilidad en el diagnóstico y tratamiento oportuno de los pacientes.

III. HIPÓTESIS

El espectro de mutaciones causales de CAs en la población mexicana podría ser diferente al reportado en otras poblaciones. La secuenciación del exoma y/o del genoma completo puede identificar genes causales nuevos en ciertas familias. El estudio funcional de algunas mutaciones contribuirá al entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos en algunas CAs.

IV. OBJETIVO

Describir el espectro de mutaciones patogénicas y potencialmente patogénicas, y encontrar nuevos genes causales de canalopatías arritmogénicas mediante secuenciación de nueva generación en pacientes mexicanos.

4.1 Objetivos particulares

- Describir el espectro de mutaciones en genes previamente reportados e identificar nuevos genes causales de CAs.
- Determinar la importancia de la variación común en los genes causales de CAs.
- Realizar estudios funcionales e in silico en algunas mutaciones, para contribuir a un mejor entendimiento de la fisiopatología de las CAs.

V. METODOLOGÍA

5.1 Población de estudio

Este proyecto fue aprobado por los Comités de Ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y del Instituto Nacional de Cardiología ‘Ignacio Chávez’ (INCICH) en la Ciudad de México. Se incluyeron todos aquéllos pacientes de ambos sexos con diagnóstico clínico de canalopatía arritmogénica (CA) reclutados entre Junio de 2012 y Diciembre de 2016; así como un caso de probable CA. Los pacientes fueron referidos del INCICH y otras instituciones de salud; o a través de la consulta privada de diferentes médicos cardiólogos de México. Los datos clínicos de pacientes y de los familiares de primer grado que aceptaron participar en el estudio se obtuvieron del expediente médico o a partir de estudios de gabinete. El registro de antecedentes heredofamiliares se llevó a cabo mediante entrevista directa. Durante la entrevista también se generó un árbol genealógico y se tomó una muestra de sangre periférica para extracción de ADN. La **Tabla 5.1** muestra los criterios de inclusión, exclusión y eliminación para la captación de pacientes en este proyecto.

Tabla 5.1 Criterios de inclusión exclusión y eliminación para la captación de pacientes

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
<ul style="list-style-type: none">• Contar con diagnóstico clínico o sospecha de CA.• Aceptar participar en el estudio• Contar con la firma del responsable en el documento de consentimiento informado	<ul style="list-style-type: none">• Tener alteraciones estructurales del músculo cardíaco o diagnóstico de enfermedad cardíaca atribuible a una miocardiopatía congénita o heredada.• No aceptar participar en el estudio• No contar con la firma del responsable en el documento de consentimiento informado	<ul style="list-style-type: none">• Presentar en el transcurso del estudio evidencia de alteraciones estructurales del músculo cardíaco.• Deseo del paciente de retirarse del estudio

5.2 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se extrajo a partir de leucocitos en sangre total en EDTA en todos los casos de CA o probable CA. En cambio, el DNA de un caso de MSI infantil fue extraído a partir células de cordón umbilical almacenadas desde el nacimiento en un banco de células madre. En todos los casos la extracción se hizo con el kit Midi Blood de QIAGEN. La integridad del DNA extraído se observó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.0%,

teñido con bromuro de etidio [0.5 ug/uL], en amortiguador TBE 1X (Tris base 0.089 M; ácido bórico 0.089 M; EDTA, 0.002 M, pH 8.0); y cuantificado por espectrofotometría en Qubit o Nanodrop.

5.3 Secuenciación de Nueva Generación (SNG)

En general, el abordaje inicial para el estudio genético de los casos índice fue la secuenciación de nueva generación (SNG) sitio-dirigida. Sin embargo, para los casos previamente no resueltos mediante DHPLC, la primera estrategia de análisis genético fue la secuenciación de exoma o genoma completo (**Figura 5.1**). Por otro lado, el primer abordaje de análisis genético en un caso de MSI fue la SNG sitio-dirigida.

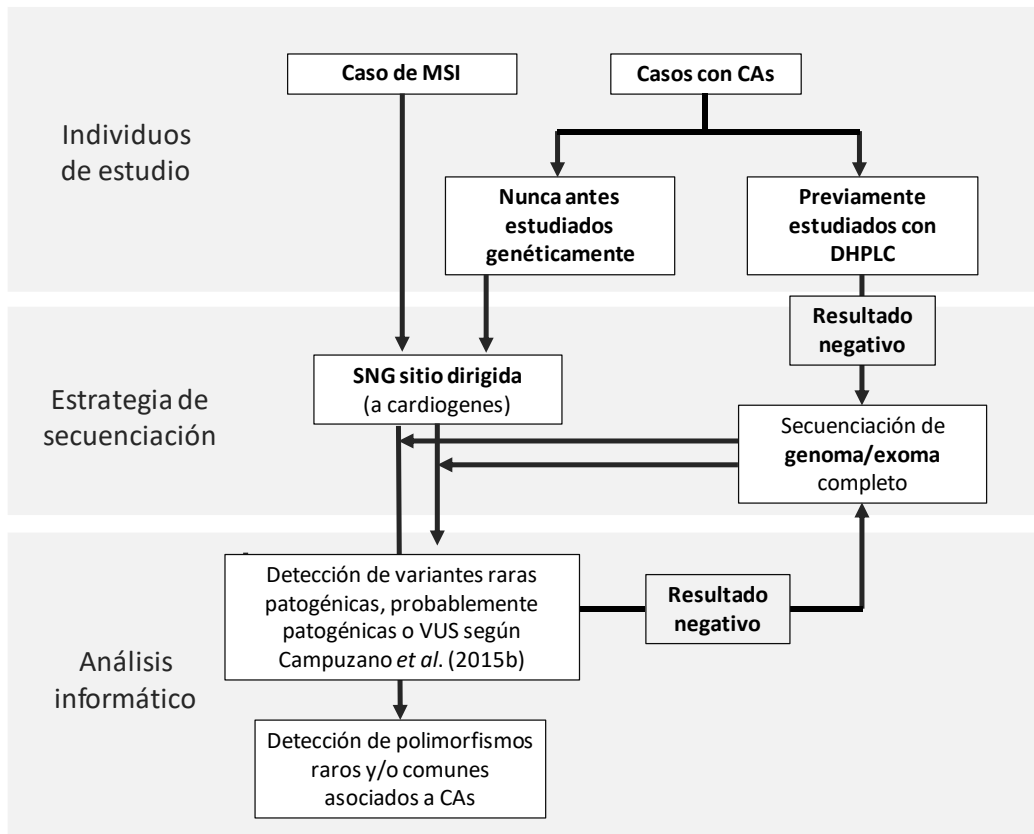


Figura 5.1 Estrategias de secuenciación de nueva generación para la identificación de variantes patogénicas que causan MSC.

5.3.1 SNG sitio-dirigida

La SNG sitio dirigida se llevó a cabo empleando 3 kits de enriquecimiento en 3 etapas distintas (**Anexo III**): Inicialmente se utilizó un panel *AmpliSeq* de Applied Biosystems®, diseñado para secuenciar los exones y la región intrónica flanqueante de 19 cardiogenes causales de CAs. Más adelante, se utilizó otro panel por diseño *Haloplex* de Agilent Technologies®, que incluyó 83 cardiogenes causales de CAs y miocardiopatías (MCs). Finalmente, se empleó un kit comercial de secuenciación TruSight Cardio® de Illumina que permitió secuenciar la región exónica e intrónica flanqueante de 174 genes implicados en diferentes condiciones cardiacas hereditarias (www.illumina.com). El proceso de SNG se realizó en un secuenciador Ion Torrent PGM® para secuenciar muestras enriquecidas con kit Ion Ampliseq, o en un secuenciador Mi-Seq® (Illumina) para secuenciar muestras enriquecidas con kit Haloplex o TruSight Cardio.

5.3.2 Secuenciación de exoma completo y genoma completo

La secuenciación de exoma completo se realizó en la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del INMEGEN, empleando el kit *SureSelect Human All Exon V4*® (No. Cat. 5190-4636) de Agilent o el kit *TruSight Exome*® (No. Cat. FC-150-1001/4) de Illumina para el enriquecimiento de las muestras. El proceso de secuenciación se realizó en un secuenciador Mi-Seq o Hi-Seq (Illumina). La secuenciación del genoma completo fue llevada a cabo por la compañía *Complete Genomics* (Mountain View, California, USA) empleando secuenciación con nanobolas de DNA (Porreca, 2010).

5.3.3 Procesamiento de datos obtenidos por SNG

Los datos crudos del proceso de secuenciación de nueva generación (SNG) se obtuvieron en formato FastQ-Sanger, un formato de texto diseñado para el almacenamiento de secuencias biológicas y su correspondiente puntuación de calidad en escala de probabilidades de error Phred (Cock *et al.*, 2010) (**Figura 5.2; Tabla 5.1**).

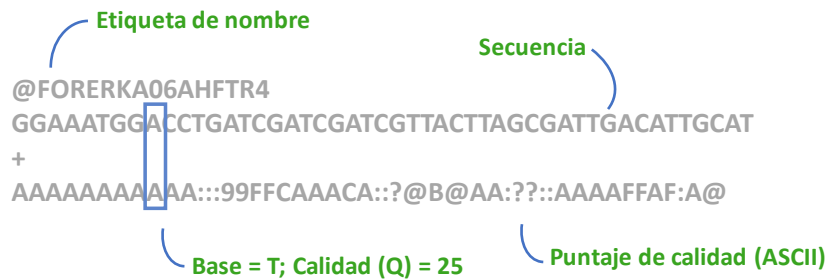


Figura 5.2 Formato FastQ. Se utiliza universalmente para representar bioinformáticamente datos de secuenciación. Consta de 4 líneas para cada lectura: la **línea 1** comienza con un carácter '@' y es seguida por el nombre/identificador asignado por el secuenciador a la lectura. La **línea 2** es la lectura/secuencia cruda de letras; la **línea 3**, que comienza con un '+' y funciona como espaciador. Esta línea es opcional y puede incluir nuevamente el nombre y/o un comentario; y la **línea 4** que codifica los valores de calidad (en escala Phred codificada en formato ASCII) de la secuencia en la línea 2. Debe contener el mismo número de símbolos de la línea 2 (Cock *et al.*, 2010).

Tabla 5.2 Escala de probabilidades de error Phred

Q (Calidad Phred) *	Probabilidad de detección errónea	Precisión de la detección
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1,000	99.9%
40	1 en 10,000	99.99%
50	1 en 100,000	99.999%

*La calidad en escala Phred está vinculada a la probabilidad de que el secuenciador haya nombrado incorrectamente una base. Puede expresarse como la función logarítmica: $Q = -10 \log_{10}P$, donde Q es el puntaje de calidad de Phred y P la probabilidad de que una base haya sido nombrada incorrectamente. Ésta última es calculada mediante la determinación de la forma del pico de fluorescencia y su resolución (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998).

Reporte de calidad

Los reportes gráficos y estadísticos de calidad de los datos de secuenciación se obtuvieron desde los datos crudos en formato FastQ-Sanger con el *software* FastQC (Babraham Bioinformatics, Reino Unido) (Andrews *et al.* 2010). Los datos con un valor Phred ≥ 30 que se encontraron en ambas hebras del DNA (*i.e.* sin sesgo de hebra) y en más de 10 lecturas (*i.e.* profundidad $\geq 10X$) se consideraron de calidad confiable y fueron empleadas para el análisis de datos.

Procesamiento de datos

Los datos crudos en formato FastQ-Sanger fueron procesados a través de una pila de pasos (*i.e. pipeline* bioinformático) en 2 etapas: 1) el alineamiento de las lecturas respecto a un genoma de referencia (en todos los casos hg19, GRCh37); y 2) la detección de variantes (**Figura 5.3**).

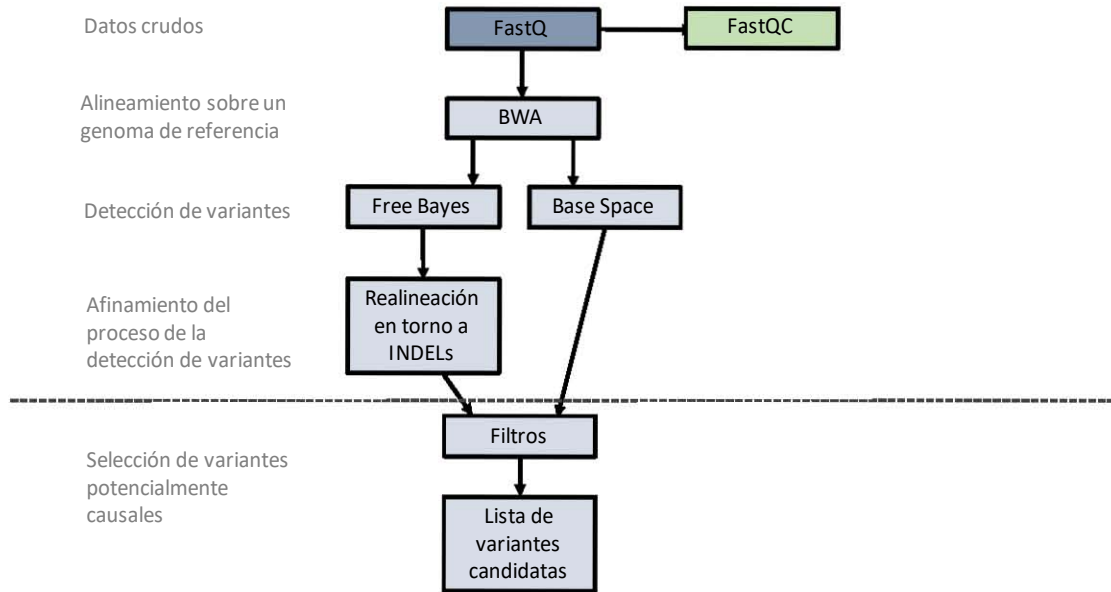


Figura 5.3 Pipeline o tubería informática para el análisis de datos genómicos obtenidos con diferentes tecnologías y plataformas de SNG.

El alineamiento se realizó con el paquete *BWA Enrichment v2.1.0* (Li & Durbin, 2010) usando los parámetros por defecto a través de paquete *BaseSpace* de Illumina o directamente en un *pipeline* bioinformático generado *ex professo*. Como resultado del alineamiento se obtuvo un archivo SAM (*Sequence Alignment/Map*)¹. La recalibración de la calidad de bases, el realineamiento en torno a inserciones/delecciones (InDels), la eliminación de duplicados y la detección de SNPs, SNVs e InDels se llevó a cabo con el

¹ Los **archivos SAM** tienen un formato de texto universal para el almacenamiento de lecturas secuenciadas alineadas respecto a un genoma o secuencia de referencia. Los archivos con este formato especifican la ubicación de cada lectura respecto a la referencia, así como la probabilidad de error en dicha asignación (Li et al., 2009).

programa de código abierto *Genome Analysis Toolkit* (GATK) versión 3-8-0, (software.broadinstitute.org) (DePristo et al., 2011; van der Werf *et al.*, 2012).

Anotación de variantes

La anotación de variantes se realizó con los *softwares* ANNOVAR (Yang & Wang, 2015) y/o *Variant Effect Predictor* (McLaren *et al.*, 2016). Con estos programas se obtuvo la siguiente información de cada variante: 1) el cambio de aminoácido y su posición en la proteína; 2) el posible efecto de la variante sobre la función de la proteína de acuerdo a varios programas computacionales de predicción, como PolyPhen Harvard 2.0 (Adzhubei *et al.*, 2010) y SIFT (Kumar *et al.*, 2009) entre otros; 3) la frecuencia alélica en diferentes poblaciones del mundo según el proyecto *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) (Lek *et al.*, 2016), *1000 Genomes* (Consortium, 2010) y *NHLBI GO Exome Sequencing Project* (ESP) (Fu *et al.*, 2013); y 4) datos clínicos reportados por ClinVar.

Visualización de datos

La visualización de los datos de SNG fue uno de los pasos finales en el procesamiento de los datos (**Figura 5.4**). Se llevó a cabo con el Visualizador Genómico Integrativo (IGV, por sus siglas en inglés), un programa en línea libre que permite ver datos de manera local en la computadora (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013).

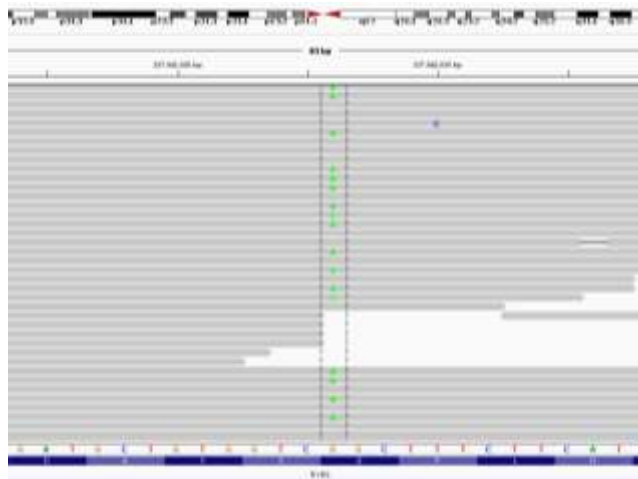


Figura 5.4 Visualización con el IGV. Se muestra la posición 237942026 en el cromosoma 1, donde se localiza la mutación sin sentido *RYR2*-p.G3946S (c.11836G>A) identificada en uno de los casos con TVPC.

Selección de variantes patogénicas

Se consideraron variantes causales o potencialmente causales de CAs a aquellas:

1. Variantes previamente reportadas como patogénicas o como causales de la CA que padece el portador de la variante.
2. Variantes no reportadas como causales, pero encontradas en genes que se sabe son causales de la CA que padece el paciente y que contara con las siguientes características:
 - a) Que interrumpieran o alteraran el marco de lectura abierto (*i.e.* mutaciones de sentido erróneo, sin sentido, InDels o que cambian el marco de lectura) o que se localizaran en un sitio aceptor o donador de *splicing*.
 - b) Para el caso de las mutaciones de sentido erróneo se tomaron en cuenta sólo aquellas que tuvieran una predicción funcional dañina o deletérea en ≥ 4 programas computacionales.
 - c) Que fueran nuevas (no reportadas) o raras (frecuencia del alelo menor < 0.1 de acuerdo con la base ExAc Browser, 1000 Genomes Browser o del proyecto ESP).

Para el análisis de datos, también se tomaron en cuenta:

1. Variantes con las características descritas previamente, pero localizados en genes causales de otras CAs y/o miocardiopatías arritmogénicas (MCPs).
2. Polimorfismos raros ($MAF 0.1 \geq 0.5$) y comunes ($0.5 \geq 1.0$) en genes causales de CAs o MCPs encontrados con mayor frecuencia en la población latina de ExAC Browser.

5.4 Análisis de ancestría global y local de la mutación *KCNH2*-p.T613M

El origen ancestral de la mutación *KCNH2*-p.T613M se llevó a cabo analizando los genotipos de 3 individuos: 1) el caso *SQTL-11*, 2) su hijo (portador de la mutación) y 3) el padre de su hijo (no portador de la mutación). El trío fue genotipificado mediante el microarreglo SNP 6.0 de la plataforma de Affymetrix (que permite identificar 898,723

SNPs). Los controles de calidad pertinentes incluyeron la eliminación de SNPs con las siguientes características: 1) genotipos ausentes en >10% de los casos (*call rate* > 90%), 2) inconsistencias mendelianas en la familia y 3) en desequilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.01$). El número de polimorfismos final con los que se realizó el análisis fue 470,614. Posteriormente, se realizó el análisis de la relación parental con la prueba de 'identidad por descendencia' (IBD por sus siglas en inglés), además del análisis de escalamiento multidimensional (scaling multidimensional analysis) con el programa PLINK (Purcell *et al.*, 2007). Posteriormente, se realizó un análisis de ancestría global con el programa ADMIXTURE (Alexander *et al.*, 2009), tomando como poblaciones de referencia a los individuos CEU y YRI del proyecto de HapMap, así como 4 poblaciones de referencia indígenas (Romero-Hidalgo *et al.*, 2017).

La estimación de la ancestría local para el cromosoma 7 fue realizada con el programa PCAdmix (Brisbin *et al.*, 2012), utilizando como poblaciones de referencia 50 individuos de origen europeo, 50 de origen africano (CEU y YRI, respectivamente) pertenecientes al proyecto del HapMap, además de 50 individuos pertenecientes a poblaciones nativas mexicanas. Debido a que en el análisis de ancestría local se identificó que el fragmento que contiene la mutación es de origen indígena, se decidió evaluar la estructura poblacional de la región con el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), para lo cual se abrió un intervalo de 1Mb (posición física en el cromosoma 7: 149,763,766-151,666,018) que engloba a la región de interés y que contiene 382 SNPs. Para la realización de esta prueba se utilizó como referencia la información de 295 individuos pertenecientes a 4 poblaciones indígenas, cuyo genoma presenta al menos 80% de componente indígena (88 mayas; 102 nahuas; 55 totonacos y 50 zapotecas). Los resultados fueron graficados con el programa R.

5.5 Transfección de células HEK-293

Las construcciones pcDNA3-*SCN5A*, pcDNA3-*SCN5A*-p.T1708N, pcDNA3-*SCN5A*-p.H558R y pcDNA3-*SCN5A*-p.T1708N-H558R fueron donadas por el Dr. Jonathan Makelski de la Universidad de Wisconsin, EUA. La transfección transitoria de cada plásmido se realizó en células HEK-293 con reactivo X-Treme GENE HP de Sigma-Aldrich®. Para ello, el ADN plasmídico (100ng/uL), el reactivo X-treme Gene HP y el

diluyente Opti:MEM se adicionaron a un tubo estéril en una relación 1:3:100, preparando 100 uL de mezcla por cada caja de Petri de 60 mm. La mezcla de transfección se adicionó por goteo a las células. Posteriormente, las cajas que contienen las células se agitaron suavemente para asegurar que la mezcla de transfección se distribuyera uniformemente. Las células se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% por 24-48 horas antes de realizar los experimentos de *patch clamp*.

5.5.1 Registro de las corrientes iónicas

El registro de las corrientes iónicas se realizó a temperatura ambiente (23-25 °C) usando la técnica de fijación de voltaje en su configuración de célula completa. Las micropipetas de registro fueron fabricadas a partir de capilares de vidrio de borosilicato (TW120-3; *WPI*) con un estirador horizontal (P-87, Sutter Instrument Co. Novato, California) y se pulieron empleando una microforja (MF-83, Narishige, Tokio, Japón). Para los experimentos se utilizaron sólo aquellas micropipetas con una resistencia eléctrica entre 1.0 y 2.0 MΩ, una vez llenas con solución interna e inmersas en la solución externa de registro.

Las corrientes iónicas se registraron empleando un amplificador Multiclamp-700B (*Molecular Devices*). La generación de pulsos y la adquisición de datos fueron controlados por el programa pClamp 10.5 (*Molecular Devices*), usando un sistema de adquisición de datos de 16 bits (Digidata 1550A, *Molecular Devices*). Las señales fueron digitalizadas a 100 kHz y filtradas a 5 kHz. La resistencia en serie se compensó electrónicamente al 80%. Se rechazaron los experimentos en los cuales el error en el voltaje excedió los 5 mV, tras haber compensado la resistencia en serie. Las células se perfundieron continuamente con solución de baño (extracelular) que contenía NaCl [140 mM], KCl [4 mM], CaCl₂ [1.8 mM], MgCl₂ [0.75 mM] y HEPES [5 mM] (pH 7.4 fijado con NaOH). La solución de la pipeta (intracelular) contenía CsF [120 mM], CsCl₂ [20 mM], EGTA [5 mM] y HEPES [5 mM] (pH 7.4 fijado con CsOH).

Protocolos de registro

Para estudiar la activación de la corriente de sodio pico (I_{NaP}) se empleó un protocolo de pulsos crecientes despolarizantes de 24 ms, con incrementos de 10 mV en cada paso, partiendo de un potencial de sostenimiento de -140mV (**Figura 5.5**).

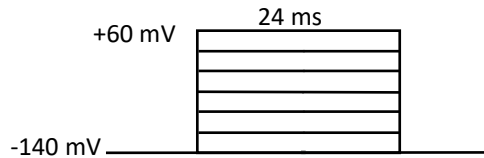


Figura 5.5 Protocolo de activación de la I_{Na} .

La inactivación del estado estacionario de la I_{Na} se estudió utilizando un protocolo que consistió en un pulso fijo de 24 ms a 0 mV, precedido de una serie de pulsos crecientes despolarizantes que fueron desde -150 a 0 mV con incrementos de 10 mV, a un potencial de sostenimiento de -140 mV (**Figura 5.6**).

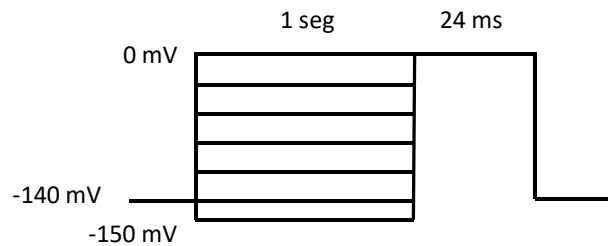


Figura 5.6 Protocolo para estudiar la inactivación del estado estacionario de la I_{Na} .

La recuperación de la inactivación fue evaluada empleando un protocolo de dos pulsos fijos despolarizantes de 24 ms a 0 mV con intervalo de tiempo variable (**Figura 5.7**).

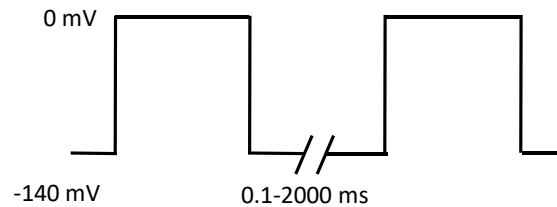


Figura 5.7 Protocolo para estudiar la recuperación de la inactivación de la I_{Na} .

La corriente tardía se estudió utilizando un protocolo a 0 mV con una duración de 250 ms.

Análisis de datos

Las corrientes registradas se analizaron empleando los programas pClamp (*Molecular Devices*) y Origin (*Microcal Software*). La capacitancia de membrana (C_m) y la resistencia de acceso (R_a) fueron obtenidas en línea mediante las herramientas de pClamp. Las diferencias estadísticas se calcularon empleando una prueba ANOVA de una vía, con un valor de significancia $p < 0.05$. Los datos están representados como la media \pm error estándar de la media (ESM).

Para calcular la conductancia iónica de cuerda (G) se utilizó la siguiente ecuación:

$$G_{Na} = \frac{I_{Na}}{V_{test} - E_{Na}}$$

donde I_{Na} es el valor de la corriente de Na (I_{Na}) a un paso de voltaje dado (V_{test}); $V_{test} - E_{Na}$ es la fuerza de conducción para el ión de sodio, por último, E_{Na} es el potencial de equilibrio para sodio.

Se calcularon las conductancias normalizadas y se graficaron en función del voltaje, ajustando los puntos a una función de Boltzmann de la siguiente forma:

$$\frac{G_x}{G_{max}} = \frac{1}{1 + e^{k(V_{test} - V_{1/2})}}$$

donde G_{max} es la conductancia máxima, $V_{1/2}$ es el valor de potencial al cual ocurre el 50% de la conductancia, y k es la pendiente de la curva.

La tau de recuperación de la inactivación fue obtenida mediante un ajuste exponencial a la gráfica de la amplitud de la corriente normalizada del segundo pulso contra la duración del intervalo de tiempo correspondiente.

5.6 Canal recombinante RyR2-p.R2920Q murino

La generación del canal murino recombinante mRyR2-p.R2920Q se llevó a cabo en 3 procesos principales: 1) mutagénesis dirigida, 2) clonación y 3) amplificación.

1) Mutagénesis dirigida

El gen *RYR2* murino (mRyR2) con la mutación p.R2920Q (c.8759G>A) se generó mediante mutagénesis dirigida con el método por sobrelape descrito por Hu *et al.* (Ho *et al.*, 1989), empleando los 4 oligonucleótidos en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3 Oligonucleótidos para mutagénesis dirigida de mRyR2-R2920Q

Clave	Oligonucleótido	Secuencia 5' --> 3'	Tm
A'	Forward	ACTAAGTGCTACAGACATGGCCTTG	57.7°C
A''	Reverso	TAGGCAAATTGCTTCTCAATCGAAG	54.4°C
B'	Forward	TTGAGAAGCAATTTGCCTATAG	58.4°C
B''	Reverso	CCTTCTCTTTGTTGGATGCATGTCC	57.7°C

La *Reacción A* y la *Reacción B* se prepararon independientemente siguiendo la mezcla de reacción descrita en la **Tabla 5.4** y los parámetros descritos en la **Tabla 5.5** para obtener 2 fragmentos de 1,252 pb y 1,811 pb, respectivamente. El volumen resultante de cada reacción fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa TAE-1%, a 120 V durante 45 minutos. Las dos bandas resueltas fueron extraídas de manera independiente con kit para MiniElute (QIAGEN, No. Cat 28604).

Tabla 5.4 Mezcla para la Reacción A y Reacción B mutagénesis dirigida de mRyR2-R2920Q

Reactivo	Volumen
10x Buffer para polimerasa <i>Pfu</i>	10 µl
10 µM dNTPs (25mM)	2 µl
10 µM Primer forward	5 µl
10 µM Primer reverse	5 µl
pCDNA3-mRyR2 (0.33ng/µl)	1 µl
ADN Polimerasa de alta fidelidad <i>Phusion</i> ® (NEB # de catálogo: M0530S)	1 µL
Agua libre de DNasa/RNasa	76 µl
Volumen final	100 µL

Tabla 5.5 Parámetros de PCR para la Reacción A y Reacción B de PCR mutagénesis dirigida de mRYR2-R2920Q

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	30 segundos	
95°C	30 segundos	
50°C	30 segundos	34 ciclos
72°C	1 minutos 20 segundos	
72°C	5 minutos	
4°C	∞	

Los productos purificados de la *Reacción A* y *Reacción B* se combinaron para su reamplificación en la *Reacción C* a partir de la mezcla de reacción mostrada en la **Tabla 5.6** y bajo los parámetros descritos en la **Tabla 5.7**. 12 µL de la reacción final fueron separados mediante electroforesis (en un gel de agarosa TAE1%, a 160 V durante 30 minutos) para confirmar la existencia de una banda de 1,146 pb. Los 88 µL restantes se purificaron con kit MiniElute (QIAGEN, No. Cat 28604), eluyendo el DNA resultante en agua libre de ADNAsas/ARNAsas.

Tabla 5.6 Mezcla de la Reacción C de PCR de mutagénesis dirigida de mRYR2-R2920Q

Reactivo	Cantidad
Buffer para polimerasa <i>Pfu</i> [10X]	10 µl
10 µM dNTPs (25mM)	2 µl
10 µM Primer forward	5 µl
10 µM Primer reverse	5 µl
Producto amplificado 1A	13 µl
Producto amplificado 1B	13 µl
pCDNA3-mRyR2 (0.33ng/µl)	1 µl
ADN Polimerasa de alta fidelidad <i>Phusion</i> ® (NEB # de catálogo: M0530S)	1 µL
Agua libre de DNasa/RNasa	51 µl
Volumen final	100 µl

Tabla 5.7 Parámetros para Reacción C de mutagénesis dirigida de mRYR2-R2920Q

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	30 seg	
95°C	30 seg	
50°C	30 seg	34 ciclos
72°C	1 min 20 seg	
72°C	5 min	
4°C	∞	

2) Clonación de la mutación *mRyR-p.p2920Q*

El producto purificado de la *Reacción C* (1,146 pb) fue digerido con las enzimas *NheI* y *BsWI*. De forma independiente, se digirió un *cassette* (11.8Kb) con la mitad del gen *mRyR2* (1-8,864 pb) en el plásmido *pBlueScript-SKII* (*pBS-mRyR2*; 3Kb. Ambas digestiones se llevaron a cabo de acuerdo con la mezcla descrita en la **Tabla 5.8**.

Tabla 5.8 Mezcla de digestión con *EcoRV*

Reactivo	pBS-NheI-BsWI	Producto
10x Buffer 3 (NEB)	5 µl	5 µl
Albúmina de Suero bovino (BSA), NEB (Cat. No. B9000S)	5 µl	5 µl
<i>EcoRV</i> (NEB, Cat. No. R0195)	2 µl	2 µl
BS-NheI-BsWI (5µg/µl) o producto de pCR	8 µl	10 µl
Agua libre de DNasa/RNasa	30 µl	28 µl
Volumen final	30 µl	28 µl

*La reacción se llevó a cabo a 37°C en baño de agua durante 2 horas.

Los productos de la digestión fueron purificados con kit *QIAEX II* (*QIAGEN* Cat. No 20021) y empleados para una segunda digestión con la enzima *HpaI* (**Tabla 5.9**). Los productos fueron separados mediante electroforesis (en gel de agarosa *TAE-1%* por 45 minutos a 120 volts). Las bandas de 1Kb (producto de PCR digerido, denominada inserto; y porción liberada del *pBS-NheI-BsWI*) y la banda de 10.8Kb, (*pBS-mRyR* digerido; denominado vector) fueron visualizadas con un transiluminador de luz azul *Safe Imager™2.0* (*Thermo-Fisher* No. Cat. G6600) para evitar dañar el DNA. El DNA contenido en las bandas del gel fue extraído con kit *QIAEX-II*.

Tabla 5.9 Mezcla de digestión con *HpaI*

Reactivo	pBS-NheI-BsWI	Producto
10x Buffer <i>CutSmart</i> (NEB)	3 µl	3 µl
<i>HpaI</i> (NEB Cat. No. R0105)	2 µl	2 µl
Fosfatasa alcalina, intestino de ternera (NEB Cat. No. M0290)	0.4 µl	-
pBS-NheI-BsWI o producto de PCR digerido con <i>EcoRV</i>	20 µl	20 µl
Agua libre de DNasa/RNasa	4.6 µl	5.0 µl
Volumen final	30 µl	30 µl

*Ambas mezclas de digestión fueron incubadas en baño a 37°C durante 2 horas.

El inserto y el vector fueron ligados con la mezcla para la *Reacción de Ligación A* (**Tabla 5.10**), para generar el cassette pBS-mR_{YR2}-p.R2920Q con la mutación p.R2920Q.

Tabla 5.10 Mezcla de reacción de ligación A

Reactivo	Volumen
Buffer de ligación 10x	1.5 µl
ADN Ligasa T4	1.5 µl
Vector	4 µl
Inserto	4 µl
Volumen final	14 µl

*La reacción se llevó a cabo a 16°C en baño de agua durante toda la noche.

Para comprobar que la ligación fuera exitosa el plásmido pBS-mR_{YR2}-p.R2920Q se digirió con EcoRV y HpaI y se separó mediante electroforesis (gel de agarosa al 1%-TAE durante 45 minutos a 120 voltios) para confirmar el patrón de bandas. La secuenciación Sanger confirmó la presencia de la mutación p.R2920Q.

3) *Proceso de amplificación*

Se tomaron 50µl de células de *Escherichia coli* (línea NEB® *Stable Competent E. coli*; No. Cat. C3040) y se transformaron con 1.5 µl de pBS-mR_{YR2}-p.R2920Q. La transformación se llevó a cabo por choque térmico: *a*) incubando la mezcla de células y el producto de ligación en hielo por 30 minutos; y *b*) posteriormente en baño de agua a 42°C por exactamente 45 segundos; *c*) y volviendo a incubar inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Posteriormente *d*) se adicionó 1 ml de medio SOC (Invitrogen, No. Cat. 15544034) a las células transformadas. *e*) Finalmente, las células se incubaron en agitación (250 rpm) a 25°C durante 90 minutos y fueron colectadas por centrifugación a 10,000 rpm por 30 segundos, desechando 900 µl del sobrenadante. Los 100 µl de células restantes fueron esparcidos en cajas de agar con ampicilina.

Las colonias resultantes fueron inoculadas en medio LB (Luria-Bertani) adicionado con ampicilina (concentración final: 0.1mg/ml) e incubadas a 37°C toda la noche en rotación (250 rpm); y recuperadas por centrifugación (15,000 rpm por 1 minuto). Los plásmidos fueron extraídos con kit mini prep QIAGEN (No. Cat. 27104).

Para confirmar que la ligación fuera exitosa, el plásmido fue digerido con EcoRI y HpaI y sometido a electroforesis (15 µl del producto de reacción en gel de agarosa al 1%-TAE durante 45 minutos a 120 voltios), confirmando el patrón de bandas en un Transiluminador de Luz Azul Imager 2.0™. Además, su análisis mediante secuenciación Sanger permitió confirmar la presencia de la mutación *R2920Q* (c.7398C>G) en el pCDNA5/FRT/TO-m*R2920Q*.

Generación del plásmido pCDNA5/FRT/TO-mR2920Q

El paso final de la mutagénesis implicó la clonación del fragmento pBS-m*R2920Q* (8Kb) en el plásmido pCDNA5/FRT/TO que contiene el m*R2920Q* completo (20.1Kb). Para ello, el fragmento pBS-m*R2920Q* y el plásmido pCDNA5/FRT/TO-m*R2920Q* fueron digeridos con la enzima BsiWI, siguiendo la mezcla de digestión descrita en la **Tabla 5.11**. Después del primer período de incubación, se añadió 1.5 µl de NheI (NEB R0131) junto con 0.4 µl de fosfatasa alcalina.

Tabla 5.11 Mezcla de digestión con BsiWI y NheI

Reactivo	Plásmidos	
	pBS-m <i>R2920Q</i>	pCDNA5/FRT/TO-m <i>R2920Q</i>
Buffer 2 (NEB) 10x	3 µl	3 µl
Albúmina de suero bovino	3 µl	3 µl
BsiWI (NEB Cat. No. R0553)	1.5 µl	1.5 µl
NheI (NEB Cat. No. R0131)	1.5 µl*	1.5 µl*
Plásmido	11 µl	7 µl
Agua libre de DNasa/RNasa	9.6 µl	13.6 µl

*La reacción se llevó a cabo a 55°C en baño de agua durante 1 hora con la enzima BsiWI; y posteriormente a 37°C en baño de agua durante 2 hora.

Posteriormente, 30 µl de cada producto de digestión con BsiWI y NheI se separaron mediante electroforesis (en gel TAE de agarosa al 0.5%, durante 90 minutos a 120 voltios). La banda de 8KB de pBS-m*R2920Q* (inserto) y 12.1 Kb de pCDNA5/FRT/TO-m*R2920Q* digerido (vector) se visualizaron en un transiluminador de luz azul *Safe Imager 2.0™* para evitar dañar el DNA y se extrajeron con kit QIAEX II, para ser ligados de acuerdo a la mezcla para la *Reacción de Ligación B* descrita en la **Tabla 5.12**, para generar pCDNA5/FRT/TO-m*R2920Q* con la mutación p.R2920Q (denominado pCDNA5/FRT/TO-m*R2920Q*).

Tabla 5.12 Mezcla de
Reacción de Ligación B

Reactivo	Volumen
Buffer de ligación 10x	1.5 μ l
ADN Ligasa T4	1.5 μ l
Vector	4 μ l
Inserto	4 μ l
Volumen final	14 μ l

*La reacción se llevó a cabo a 16°C en baño de agua durante toda la noche.

Las células fueron transformadas como se describió anteriormente. Posteriormente, fueron sembradas en placas de ampicilina durante 2 días a 25°C. Tras este periodo de incubación, las colonias se recogieron e inocularon en 5 ml de caldo de cultivo LB (Luria-Bertani) adicionado con ampicilina (concentración final: 0.1 mg / ml) y fueron incubadas a 25°C durante 2 días en agitación (250 rpm). La pastilla se recuperó por centrifugación a partir de los 5 ml de cultivo, a 15.000 rpm durante un minuto. La extracción del plásmido se llevó a cabo utilizando el kit QIAGEN (Cat. No. 27104).

Confirmación de pCDNA5/FRT/TO-mRYR2-p.R2920Q

Para confirmar que la ligación fuera exitosa, el plásmido fue digerido con EcoRI, XhoI y BamHI y sometido a electroforesis (15 μ l del producto de reacción en gel de agarosa al 1%-TAE durante 45 minutos a 120 voltios), confirmando el patrón de bandas en un Transiluminador de Luz Azul Imager 2.0™. Además, el análisis mediante secuenciación Sanger permitió confirmar la presencia de la mutación RYR2-p.Q2920R (c.8759G>A) en el pCDNA5/FRT/TO-mRYR2.

5.6.1 Generación de línea estable de células HEK inducibles para la expresión de RyR2-Q2920R murino

Se utilizó el kit Flp-In™T-REx™ (Thermo Cat No. K6500-01) para generar la línea estable HEK-RyR2-R2920Q. Las células HEK-Flp (Thermo No. Cat. R750-07) se cultivaron en medio mínimo Eagle con 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 4 mM de L-glutamina, 100 unidades de penicilina/ml, 100 mg de estreptomycin/ml, 25 μ g/ml de hidrocloreuro de ciprofloxacina, 4.5 g de glucosa/litro y suero fetal bovino al 10%.

Posteriormente, fueron co-transfectadas con el reactivo FuGENE HD (Roche Diagnostics), empleando el plásmido pcDNA5/FRT/TO (con mRyR2-wt o el cDNA de RyR2-R2920Q) y el vector pOG44 (que codifica la recombinasa Flp) en una relación 1:9 (e.g. 1.5 µg : 13.5 µg, por cada plato de cultivo de 100 mm). Las células transfectadas se mantuvieron en *medio selectivo* (Thermo Cat. No. 10687010), que contenía 200 µg/ml de higromicina. Éste se cambió cada 3-4 días, hasta alcanzar la cantidad deseada de células (aproximadamente el día 14). Las células resistentes a la higromicina se agruparon en un matraz de cultivo de células (T75) y se cultivaron hasta que alcanzaran una confluencia del ~85%. Se almacenó una alícuota a -80°C, mientras que otra se mantuvo en cultivo para ensayos subsecuentes.

Inducción de la línea estable de células HEK-p.R2920Q

Las células de la línea estable e inducible HEK-p.R2920Q fueron descongeladas en baño de agua a 37°C por 1 minuto y mantenidas en medio completo DMEM. Al alcanzar una confluencia de 90%, las células fueron separadas con PBS y resuspendidas en DMEM para un volumen total de 20 ml. 1 ml de la suspensión celular + 9 ml de DMEM completo se añadieron a platos de cultivo de tejido de 10 cm (20 platos en total). Para la expresión de mRyR2-WT o mRyR2-R2920Q las células se incubaron 24-48 horas en medio inducible a 37°C, CO₂ al 5% para la expresión de RyR2.

Solubilización de mRyR2-WT y mRyR2-R2920Q

Las células de la línea estable HEK-R2920Q inducible se solubilizaron con amortiguador de lisis que contenía Tris 25 mM/Hepes 50 mM (pH 7.4), NaCl 137 mM, CHAPS al 1%, fosfatidilcolina 0.5%, DTT 2.5 mM e inhibidores de la proteasa consistentes en 1 mM de benzamidina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml de pepstatina-A, 2 µg/ml de aprotinina y 0.5 mM de PMSF. Las células fueron lisadas por sonicación (3 veces durante 10 segundos, dejando 10 segundos entre cada pulso de sonicación) e incubadas a 4°C durante en rotación durante 1 hora. Posteriormente fueron centrifugadas a 15.000 g en microcentrífuga e incubadas a 4°C durante 15 minutos para eliminar el material no solubilizado.

5.9 Western Blot de RyR2

La proteína solubilizada (50 µg) se resuspendió en amortiguador Laemmli y fue separada mediante electroforesis SDS-PAGE en geles *Criterion* 4-20% de geles prefabricados (Bio-rad, Upland, CA). Las proteínas resueltas con SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 25 V durante 16-18 h a 4°C. Posteriormente, las membranas se bloquearon a temperatura ambiente y durante 1 hora, en PBS-T (en mmol/L, 3 KH₂PO₄, 10 Na₂HPO₄, 150NaCl, pH 7,2-7,4, 0,1% Tween 20) con leche desnatada en polvo al 5%. Las membranas se incubaron durante 2 horas en PBS-T una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-RyR2 (dilución 1: 2,000) o con anti-GAPDH monoclonal en ratón (dilución 1: 10,000). Posteriormente, se lavaron 3 veces durante 10 min en PBS-T e incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón o anti-conejo (IgG) conjugado a peroxidasa en PBS-T durante 40 min (Calbiochem, La Jolla, CA; 1: 20,000). Tras un del lavado, las reacciones proteína-anticuerpo se detectaron mediante quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) y se formaron imágenes utilizando Gel Doc™ XR + System (Bio-rad, Upland, CA). Las densidades de proteína se midieron utilizando el software de laboratorio de imágenes (Bio-Rad). Los puntos de datos fueron media ± SEM.

5.10 Ensayo de unión a RyR2 [³H]

La unión de la molécula de [³H]-rianodina a los canales RyR2 se considera un índice confiable para determinar su activación, pues la [³H]-rianodina puede unirse únicamente cuando RyR2 se encuentra el estado abierto inducido por Ca²⁺. De acuerdo con ello, el ensayo de [³H]-rianodina se llevó a cabo sobre lisados celulares de acuerdo con el protocolo descrito por (Loaiza et al., 2013). La mezcla de unión a RyR2 [³H] contenía 30 µl de lisado y una mezcla estándar: de KCl 200 mM, Tris 25 mM / Hepes 50 mM (pH 7,4), MgATP 3 mM, EGTA 1 mM, [³H] y CaCl₂ necesario para llevar la solución a un *p*Ca entre 8 y 3. La relación Ca²⁺/EGTA se calculó usando Max-Chelator (www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html). La reacción se incubó durante 2.5 horas a 36°C y se filtró con filtros de vidrio Whatman GF/B (Whatman, Clifton, NJ, EUA). Posteriormente se prensó con polietilenimina al 1% y se lavó dos veces con 5 ml de agua destilada, usando gel Brandel M24-R Cell Harvester (Gaithersburg, MD, EUA). La unión

no específica se determinó en presencia de 20 mm de rianodina no marcada radioactivamente y se restó de cada muestra.

5.11 Modelo de la proteína KCNQ1 (Kv7.1)

La secuencia de Kv7.1 silvestre se descargó de UniProtKB (The UniProt Consortium, 2017) ID P51787, la cual es idéntica a la secuencia ENST00000155840 en *Ensembl Browser* (www.ensembl.org/index.html); (Aken *et al.*, 2016). Las estructuras de la secuencia de aminoácidos se exploraron con ProSite (Sigrist *et al.*, 2013). Las estructuras homólogas o parciales de Kv7.1 se obtuvieron en el Banco de Datos de Proteínas (*i.e.* *Protein Data Bank*, PDB) (PDB ID: 3BJ4, 3HFE, 4V0C, 2A79, 2R9R, 4JTC) (Long *et al.*, 2004; Banerjee *et al.*, 2005; Wiener *et al.*, 2008; Xu & Minor, 2009; Sachyani *et al.*, 2014). BLAST (Altschul *et al.*, 1990) se usó para comparación de secuencias y alineamiento. GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) se usó para la predicción de estructura secundaria. Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) se usó para el ‘enhebrado’ de secuencias, para determinar homología y para la modelación *ab initio*. Las alineaciones de secuencia iniciales se realizaron con Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). Todas las demás tareas de modelación, edición estructural y visualización se realizaron con el paquete *Molecular Operating Environment* (MOE) (2013). El alineamiento fue ajustado con base en la estructura para favorecer la ubicación de inserciones/delecciones (InDel) en las asas externas. Cien estructuras iniciales se construyeron al azar, seleccionando los segmentos de cadena principal compatibles y las conformaciones de aminoácidos de las bibliotecas MOE, para modelar regiones InDel y reemplazos de cadena lateral, respectivamente. La energía de los modelos iniciales se minimizó en MOE utilizando el campo de fuerza CHARMM27, con una descripción dependiente de la distancia de la electrostática (MacKerell *et al.*, 2004). La minimización se completó cuando el gradiente de energía promedio alcanzó 0.05 kcal/(mol·Å). La mejor estructura según los parámetros de plegado de MOE se refinó aún más hasta que el gradiente de energía estuviera por debajo de 0.01 kcal/(mol·Å). Todas las estructuras fueron validadas y no se observaron inconsistencias estereoquímicas. Se construyeron modelos detallados de la región transmembrana tetramérica (TM) para las seis combinaciones posibles con monómeros silvestre/A300T, usando la estructura PDB 2R9R

como molde y construyendo cada monómero en presencia de los otros. Los efectos estructurales de p.A300T se estimaron como la distancia cuadrática media (DCM) entre los carbonos alfa silvestres (WT) y las estructuras mutantes. El Némó se utilizó para análisis de movilidad estructural (Suhre & Sanejouand, 2004). La movilidad se estimó a partir de la combinación de los primeros 100 modos normales de vibración con el mayor grado de movimiento colectivo. Los factores individuales B o de temperatura de cada átomo en la estructura se estimaron como $B = (8\pi^2/3)\langle R^2 \rangle$, donde $\langle R^2 \rangle$ representa el desplazamiento atómico promedio desde su posición inicial (Trueblood *et al.*, 1996).

VI. RESULTADOS

6.1 Población de estudio

Entre junio de 2012 y diciembre de 2016 se capturaron 51 pacientes mexicanos mestizos con fenotipo (claro o probable) de CA, incluyendo: 29 pacientes con SQTL, 6 pacientes con SBr, 13 pacientes DNS de inicio temprano (<35 años), 2 pacientes con TVPC, y 1 caso con taquicardia ventricular monomórfica catecolaminérgica (TVMC). De éstos, 42 fueron captados en el Instituto Nacional de Cardiología ‘Ignacio Chávez’ (INCICH), 6 en la consulta privada de diferentes cardiólogos, 1 en el Hospital General Naval de Alta Especialidad de la Ciudad de México, 1 en el Hospital Militar de Monterrey, Nuevo León, y 1 en el Hospital General de PEMEX en Veracruz, México. Todos fueron referidos al Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para su estudio genético.

6.2 Proceso general de SNG

El primer abordaje de análisis genético fue la SNG sitio-dirigida. En cambio, la secuenciación de exoma o genoma completo se llevó a cabo sólo en 5 casos, cuando la SNG sitio-dirigida u otro método de análisis previo (*e.g.* DHPLC, secuenciación Sanger) no reveló mutaciones potencialmente patogénicas. El análisis de calidad de datos mostró que el porcentaje de *cobertura* de la región blanco fue >95% en todos los datos provenientes de genoma, exoma o SNG sitio-dirigida de este estudio. Sin embargo, la *profundidad* (*i.e.* número de veces que cada base fue leída) fue notablemente baja empleando el panel Haloplex (**Tabla 6.1**), por lo que algunas muestras requirieron ser re-secuenciadas con otros paneles.

Todas las variantes clasificadas como patogénicas o potencialmente patogénicas según los criterios de Campuzano fueron confirmadas por secuenciación Sanger (*i.e.* no se encontró ningún falso positivo). La mayor parte de éstas eran variantes de sentido erróneo (no sinónimas) de un sólo nucleótido (SNVs). Una menor proporción fueron InDels, mutaciones sin sentido (codones de paro) y variantes que eliminan el codón de paro natural.

Tabla 6.1 Calidad de los procesos de secuenciación con diferentes paneles y estrategias de SNG empleadas en este estudio

	Ion Torrent	Haloplex	TruSight	Exoma completo (INMEGEN)	Genoma Completo (Complete Genomics)
Plataforma de secuenciación	Ion PGM	MiSeq	MiSeq	MiSeq	HiSeq
Número de genes analizados	19	84	174	~ 20,000	~ 20,000
Número total de lecturas	~8,000	~ 1,000,000	~3,700,000	80,000,000	12,000,000,000
Porcentaje de duplicados	6.7 %	97 %	86 %	7 %	10 %
Número de lecturas mapeadas sobre el panel (pb)	95 %	96 %	58 %	95 %	95 %
Profundidad (1X)	100 %	10 %	100 %	100 %	100 %
Profundidad (10X)	99.9 %	2.7 %	99.9 %	99.9 %	99.9 %
Profundidad (50X)	99.9 %	1.5 %	99.9 %	99.9 %	99.9 %
Profundidad Promedio	20X	1X	30X	30X	30X
Porcentaje de lecturas con QPHRED 30	~ 100%	~ 90%	~ 90%	~ 98%	~ 98%

6.3 Análisis Genético en casos con SQTL

Se captaron 28 pacientes mestizo-mexicanos con fenotipo de SQTL Romano-Ward (SQTL-RW) y 1 con fenotipo de Jervell Lange-Nielsen (SQTL-JLN). El 53% de los casos fue de sexo masculino. El síncope fue el síntoma más recurrente entre los casos (73%), mientras que el 23% presentó un evento de MS. Todos los casos tuvieron una puntuación de Schwartz ≥ 4 (Tabla 6.2). La mayor parte (90%) recibía tratamiento con β -bloqueador y poco menos de la mitad (43%) era portador de un DAI.

Tabla 6.2 Puntuación de Schwartz de pacientes con diagnóstico clínico de SQTL

Diagnóstico (Sexo)	QTc (ms)	Síntomas y eventos documentados	Historia familiar de MSC y SQTL	Puntuación de Schwartz
SQTL-JNL (Femenino)	533ms	Síncope (esfuerzo físico)	Positiva	7 puntos
SQTL-01 (Masculino)	560 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	7 puntos
SQTL-02 (Femenino)	505 ms	Síncope y TdP (esfuerzo físico)	Negativa	6 puntos
SQTL-03 (Masculino)	460 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Positiva	6.5 puntos
SQTL-04 (Femenino)	487 ms	MSR (en reposo)	Negativa	5 puntos
SQTL-05 (Femenino)	653 ms	Síncope (estrés emocional)	Positiva	4.5 puntos
SQTL-06 (Femenino)	625 ms	Síncope, TdP y MSR (esfuerzo físico).	Negativa	6 puntos
SQTL-07 (Femenino)	560 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	5 puntos

SQTL-08 (Masculino)	490 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Positiva	6.5 puntos
SQTL-09 (Masculino)	481 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	6 puntos
SQTL-10 (Masculino)	501 ms	Ninguno	Negativa	5 puntos
SQTL-11 (Femenino)	560 ms	MSR (reposo)	Negativa	5 puntos
SQTL-12 (Masculino)	486ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	7 puntos
SQTL-13 (Masculino)	520 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	5 puntos
SQTL-14 (Femenino)	502 ms	Ninguno	Positiva	4 puntos
SQTL-15 (Masculino)	575 ms	Síncope, MSC y TdP (esfuerzo físico)	Negativa	7.5 puntos
SQTL-16 (Masculino)	560 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	7 puntos
SQTL-17 (Masculino)	590ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	5 puntos
SQTL-18 (Femenino)	532 ms	Síncope (estrés emocional)	Positiva	6.5 puntos
SQTL-19 (Masculino)	506 ms	Síncope (reposo)	Positiva	6 puntos
SQTL-20 (Femenino)	-	Síncope y MS (esfuerzo físico)	Negativa	No aplica (caso de MSI)
SQTL-21 (Masculino)	502 ms	Síncope y TdP (esfuerzo físico)	Positiva	9 puntos
SQTL-22 (Masculino)	540 ms	Ninguno	Positiva	4.5 puntos
SQTL-23 (Femenino)	621 ms	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	5 puntos
SQTL-24 (Masculino)	516 ms	Ninguno	Positiva	5 puntos
SQTL-25 (Femenino)	554 ms	Síncope y TdP (reposo)	Negativa	5 puntos
SQTL-26 (Femenino)	515 ms.	Síncope (reposo)	Negativa	5 puntos
SQTL-27 (Masculino)	550 ms	Síncope (reposo)	Negativa	5.5 puntos
SQTL-28 (Femenino)	574 ms	Síncope (reposo)	Negativa	5.5 puntos

La prueba genética en pacientes con SQTL se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Estrategia de SNG en casos con SQTL

Caso	SNG sitio-dirigida			Genoma o exoma completo
	I. Torrent (9 genes)	Haloplex (84 genes)	TruSight (174 genes)	
<i>SQTL-JLN</i>	*			
<i>SQTL-01</i>		*		
<i>SQTL-02</i>	*	*		
<i>SQTL-03</i>		*	*	*
<i>SQTL-04</i>		*		
<i>SQTL-05</i>			*	
<i>SQTL-06</i>			*	
<i>SQTL-07</i>			*	
<i>SQTL-08</i>		*		
<i>SQTL-09</i>	*	*		
<i>SQTL-10</i>			*	
<i>SQTL-11</i>	*			*
<i>SQTL-12</i>		*		
<i>SQTL-13</i>			*	
<i>SQTL-14</i>		*		
<i>SQTL-15</i>		*		
<i>SQTL-16</i>		*		
<i>SQTL-17</i>			*	

SQTL-18		*		
SQTL-19	*			*
SQTL-20		*		
SQTL-21			*	
SQTL-22		*	*	
SQTL-23		*	*	
SQTL-24		*		
SQTL-25	*	*		
SQTL-26	*	*		
SQTL-27			*	
SQTL-28	*	*		

Resultado del proceso de ‘filtrado de variantes’ se identificó al menos una variante nueva o rara (*i.e.* MAF < 0.01) en un cardiogen causal de MSC en 28 (96%) de los 29 pacientes con SQTL (**Tabla 6.4**). Sin embargo, sólo 22 fueron portadores de una (o más) variante(s) en un gen causal de SQTL.

De manera general, *KCNH2*, *KCNQ1*, *ANK2* y *RYR2* fueron los 4 genes con mayor variación. Notablemente, sólo los 3 primeros son genes causales de SQTL, mientras que *RYR2* se conoce como gen causal de TVPC (**Figura 6.1**).

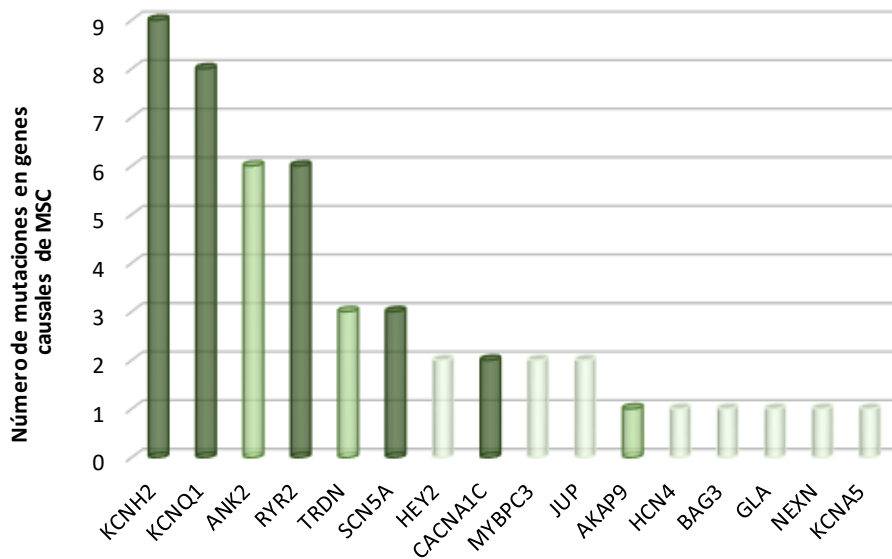


Figura 6.1 Distribución de mutaciones raras (MAF < 0.01) y no conocidas en genes causales de SQTL (color oscuro), otras CAs (color medio) y MCPs (color claro) en casos con SQTL (RW y JLN).

Entre las variantes en genes causales de SQTL, 14 (58%) estaban reportadas como patogénicas, y 4 (17%) fueron definidas como tal en el presente estudio; tras mostrar su efecto mediante modelación *in silico* (*Apartado 6.9*) y/o su co-segregación con la enfermedad en la familia (**Tabla 6.5**).

Tabla 6.4 Mutaciones no conocidas y raras (MAF < 0.01)
Identificadas en casos con SQT

	Variantes en genes causales de SQT				Variantes en genes causales de CAS				Variantes en genes causales de MCPs			
	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad
SQTL-JLN (Femenino)	<i>KCNQ1</i>	p.G168R (homocigota)	rs179489 ENST00000155840	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-01 (Masculino)	AKAP9	p.A458P	rs143894795 7_91630603_G/C	VUS (5 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-02 (Femenino)	<i>CACNA1C</i>	p.L762F	Reportada (sin id) 12_2693728_C/T ENST00000347598	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-03 (Masculino)	<i>KCNH2</i>	p.A429GX	Nueva 7_150649784_GC/G ENST00000262186	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-04 (Femenino)	<i>CACNA1C</i>	p.R585H	rs786205753 12_2702421_G/A ENST00000347598	Probablemente patogénica (10 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-05 (Masculino)	<i>KCNQ1</i>	p.D446E	rs199472780 11_2610029_C/G ENST00000155840	VUS (6 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-06 (Masculino)	<i>KCNH2</i>	p.A614V	rs199472944 7_150648640_G/A ENST00000262186	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-07 (Masculino)	<i>SCN5A</i>	p.R1644H	rs28937316 3_38592932_C/T ENST00000413689	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-08 (Masculino)	<i>KCNH2</i>	p.D609N	LQT_NM_000238.2 c. 1825G>A 7_150648656_C/T ENST00000262186	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-09 (Masculino)	<i>KCNQ1</i>	p.S277L	rs199472730 11_2594125_C/T ENST00000155840	Probablemente patogénica (11 puntos)	<i>TRDN</i>	p.V24E	rs201097255 6_123892229_A/T ENST00000398178	VUS (6 puntos)	-	-	-	-
SQTL-10 (Masculino)	<i>SCN5A</i>	p.R1644H	rs28937316 3_38592932_C/T ENST00000413689	Probablemente patogénica (11 puntos)	<i>HCN4</i>	p.S935F	rs775803239 15_73615630_G/A ENST00000261917	VUS (8 puntos)	-	-	-	-
SQTL-11 (Femenino)	<i>KCNH2</i>	p.T613M	rs199473524 7_150648643_C/T ENST00000262186	Patogénica (14 puntos)	<i>RYR2</i>	p.A2725P	Nueva 1_237821287_G/C ENST00000366574	VUS (6 puntos)	-	-	-	-

Tabla 6.4 Mutaciones no conocidas y raras (MAF < 0.01) identificadas en casos con SQT (continuación)

	Variantes en genes causales de SQT				Variantes en genes causales de CAs				Variantes en genes causales de MCPs			
	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad
SQTL-12 (Masculino)	<i>KCNH2</i>	p.W585C	rs199473430 7_150648726_C/G ENST00000262186	Probablemente patogénica (11 puntos)	<i>RYR2</i>	Splice donor	rs555960226 1_237765412_G/T ENST00000366574	VUS (6 puntos)	<i>MYBPC3</i>	p.R1205Q	rs730880596 11_47354130_G/A ENST00000545968	VUS (6 puntos)
SQTL-13 (Masculino)	<i>SCN5A</i>	p.Y1009D	Nueva 3_38622625_A/C ENST00000413689	VUS (7 puntos)	-	-	-	-	<i>NEXN</i>	p.Q535R	Nueva 1_78407838_A/G ENST00000334785	VUS (6 puntos)
SQTL-14 (Femenino)	<i>ANK2</i>	p.E1458G (homocigota)	rs72544141 4_114269433_A/G ENST00000357077	Pb. patogénica (10 puntos)	-	-	-	-	<i>BAG3</i>	p.Q251X	Nueva 10_121432010_C/T ENST00000369085	VUS (6 puntos)
SQTL-15 (Masculino)	<i>ANK2</i>	p.Q3281R	Nueva 4_114279616_A/G ENST00000357077	VUS (8 puntos)	-	-	-	-	<i>JUP</i>	p.T32N	Nueva 17_39928012_G/T ENST00000393931	VUS (5 puntos)
SQTL-16 (Masculino)	<i>KCNQ1</i>	p.A341V	rs12720459 11_2604765_C/T ENST00000155840	Patogénica (14 puntos)	-	-	-	-	<i>HEY2</i>	p.V264F	rs773396810 6_126080724_G/T ENST00000368364	VUS (6 puntos)
SQTL-17 (Masculino)	<i>KCNH2</i>	p.R885S	rs143512106 7_150645571_G/T ENST00000262186	Patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-18 (Femenino)	<i>KCNH2</i>	p.Q391X	Nueva 7_150649899_G/A ENST00000262186	Patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>ANK2</i>	p.E1458G	rs72544141 4_114269433_A/G ENST00000357077	Probablemente patogénica (10 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-17 (Masculino)	<i>KCNH2</i>	p.R885S	rs143512106 7_150645571_G/T ENST00000262186	Patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>KCNH2</i>	p.T1019P	Nueva 7_150644513_T/G ENST00000262186	VUS (8 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-19 (Masculino)	<i>KCNQ1</i>	p.D446E	rs199472780 11_2610029_C/G ENST00000357077	VUS (8 puntos)	<i>TRDN</i>	p.S80F	Nueva 6_123869751_G/A ENST00000398178	VUS (6 puntos)	-	-	-	-
	<i>ANK2</i>	p.G2221E	rs185384934 4_114276436_G/A ENST00000357077	Probablemente patogénica (9 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.4 Mutaciones no conocidas y raras (MAF < 0.01) identificadas en casos con SQT (continuación)

	Variantes en genes causales de SQT				Variantes en genes causales de CAS				Variantes en genes causales de MCPs			
	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad	Gen	Cambio	Identificador	Patogenicidad
SQTL-20 (Femenino)	<i>KCNQ1</i>	p.P535T	Nueva 11_2797202_C/A ENST00000155840	Patogénica (12 puntos)	-	-	-	-	<i>HEY2</i>	p.A299G	rs138413872 6_126080830_C/G ENST00000368364	VUS (6 puntos)
	<i>KCNQ1</i>	p.A300T	rs120074187 11_2594193_G/A ENST00000155840	Patogénica (14 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-21 (Masculino)	<i>KCNH2</i>	p.G546S	Nueva 7_150648845_C/T ENST00000262186	Probablemente patogénica (9 puntos)	-	-	-	-	<i>KCNA5</i>	p.V514I	COSM245134 12_5154853_G/A ENST00000252321	VUS (6 puntos)
	<i>ANK2</i>	p.L2510R	rs557294831 4_114277303_T/G ENST00000357077	VUS (6 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-22 (Masculino)	-	-	-	-	<i>RYR2</i>	p.H877P	rs561321743 1_237670026_A/C ENST00000366574	VUS (7 puntos)	-	-	-	-
SQTL-23 (Femenino)	-	-	-	-	<i>RYR2</i>	p.T4287N	rs19009333 1_237947871_T/A ENST00000366574	VUS (7 puntos)	-	-	-	-
SQTL-24 (Masculino)	-	-	-	-	<i>RYR2</i>	p.M1300I	Reportada sin identificador 1_237754032_G/A ENST00000366574	VUS (7 puntos)	-	-	-	-
SQTL-25 (Femenino)	-	-	-	-	<i>RYR2</i>	p.R2920Q	Nueva 1_237838075_G/A ENST00000366574	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-
	-	-	-	-	<i>TRDN</i>	p.E251X	rs761702716 6_123824906_C/A ENST00000398178	VUS (7 puntos)	-	-	-	-
SQTL-26 (Masculino)	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>MYBPC3</i>	p.L979Q	Nueva 11_47355531_A/T ENST00000545968	VUS (6 puntos)
SQTL-27 (Masculino)	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>JUP</i>	p.R86Q	rs782341732 17_39925881_C/T ENST00000393931	VUS (7 puntos)
SQTL-28 (Femenino)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.5 Mutaciones en genes causales de SQTL en casos con SQTL

Mutaciones previamente reportadas en casos con SQTL o en ensayos <i>in vitro</i> [§]	Mutaciones con efecto patogénico mostrado en este estudio [§]	VUS*
<p><i>ANK2</i>- E1458G[£] <i>CACNA1C</i>-p.L762F <i>CACNA1C</i>-p.R585H <i>KCNQ1</i>-p.G168R <i>KCNQ1</i>-p.S277L <i>KCNQ1</i>-p.A300T <i>KCNQ1</i>-p.A341V <i>KCNH2</i>-p.D609N <i>KCNH2</i>-p.W585C <i>KCNH2</i>-p.G546S <i>KCNH2</i>-p.T613M <i>KCNH2</i>-p.R885S <i>KCNH2</i>-p.A614V <i>SCN5A</i>-p.R1644H[£]</p>	<p><i>KCNQ1</i>-p.P535T <i>KCNH2</i>-p.A429GX <i>KCNH2</i>-p.Q391X <i>ANK2</i>-p.G2221E</p>	<p><i>AKAP9</i>-p.A458P <i>ANK2</i>-p.L2510R <i>ANK2</i>-p.Q3281R <i>KCNQ1</i>-p.D446E[£] <i>KCNH2</i>-p.T1019P <i>SCN5A</i>-p.Y1009D</p>

[§] Mutaciones con predicción funcional dañina en ≥ 4 programas computacionales.

[£] Mutaciones encontradas en ≥ 1 caso índice con diagnóstico clínico de SQTL, no emparentados entre sí.

* De acuerdo con los criterios de Campuzano.

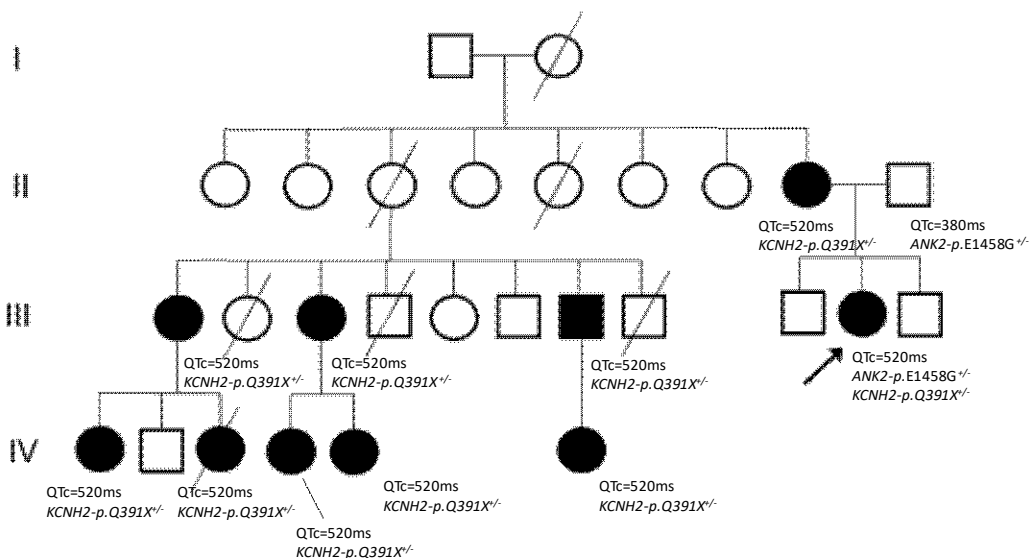
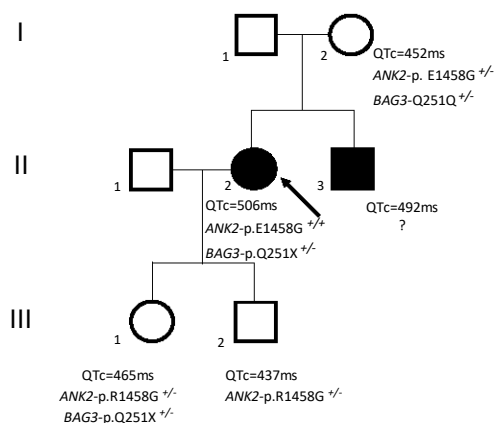
Casos homocigotos y heterocigotos compuestos

Los casos *SQTL-17* y *SQTL-20* fueron heterocigotos compuestos para mutaciones en *KCNQ1* y *KCNH2*; y el caso *SQTL-14* homocigoto para una mutación en *ANK2* (**Figura 6.2**). El único caso con SQTL Jervell Lange-Nielsen (*SQTL-JLN*) fue homocigoto para una mutación (p.G168R) en *KCNQ1*.

Casos sin mutaciones en genes causales de SQTL

De los 7 pacientes sin mutaciones en genes causales de SQTL, 4 fueron portadores de una mutación en *RYR2* (**Tabla 6.3**). Ninguna de éstas estaba previamente estudiada funcionalmente. Sin embargo, el análisis preliminar de la variante p.*RYR2*-R2920Q mostró su posible efecto patogénico (*Apartado 6.7*). Entre los tres pacientes restantes, uno tuvo un resultado genético completamente negativo en genes causales de MSC. Los otros 2 fueron portadores de una variante rara en el gen *MYBPC3* (causal de miocardiopatía hipertrófica) o en el gen *JUP* (gen causal de displasia arritmogénica del ventrículo derecho), aunque el significado clínico de estas variantes es desconocido.

A



B

Figura 6.2 Segregación de la mutación ANK2-p.R1458G en casos con SQT-LRW. A. Árbol familiar del caso *SQT-L14*. Se muestran en figuras negras los individuos con un QTc prolongado en el ECG en reposo. Las 12 derivaciones estándar del ECG en I-2, III-1 y III-2 fueron tomadas al reposo a la edad de 62, 5 y 3 años, respectivamente. **B.** Árbol familiar del caso *SQT-L18*. Se muestran en figuras negras los individuos con un QTc prolongado en el ECG en reposo.

6.4 Análisis Genético en casos con DNS

Se capturaron 13 casos con DNS diagnosticados a una edad temprana (<35 años; 11 de ellos durante la primera década de la vida) (Tabla 6.6). El 83 % de los casos fueron de sexo masculino. Las arritmias auriculares asociadas fueron: taquicardia auricular (46%), fibrilación auricular (23%), *flutter* auricular (46%) y en sólo un paciente se documentó

taquicardia ventricular, que requirió la implantación de un DAI. El 17% tuvo prolongación del intervalo QT y el 8 % trastornos de la conducción intraventricular. Los casos *DNS-02*, *DNS-03*, *DNS-09*, *DNS-12* y sus familiares presentaron fenotipos mixtos, incluyendo DNS, QTc prolongado y/o elevación del intervalo ST. Todos los pacientes tuvieron un corazón estructuralmente sano, excepto un caso con fibrosis y parálisis auricular documentada en resonancia magnética. El 92% de los casos índice requirió marcapasos.

Tabla 6.6 Historia clínica y antecedentes heredofamiliares de pacientes con diagnóstico clínico de DNS de inicio temprano

	Edad de diagnóstico	Síntomas	Hallazgos en el ECG y episodios documentados	Antecedentes heredofamiliares de MS o de arritmia cardiaca	Tratamiento
DNS-01 (Masculino)	14 años	MSR en esfuerzo	QTc prolongado, flutter auricular, FV, trastornos intraventriculares. Parálisis auricular. Aurículas fibróticas.	Ninguno	Marca pasos
DNS-02 (Masculino)	5 años	Palpitaciones en esfuerzo	Flutter auricular Taquicardia auricular. DNS con respuesta cronotrópica inadecuada	QTc prolongado y bloqueo AV en familiares de 1° y 2° grado	Marca pasos
DNS-03 (Masculino)	4 años	Síncope en esfuerzo	Pausas sinusales. TV y trastornos intraventriculares	DNS de inicio temprano (4 años) en familiar de 1° grado	Marca pasos
DNS-04 (Masculino)	5 años	Ninguno	Taquicardia auricular Bloqueo AV	Ninguno	Marca pasos
DNS-05 (Masculino)	15 años	Síncope y palpitaciones en el esfuerzo	Síncope y palpitaciones. Flutter auricular. Bloqueo AV. Trastornos de la conducción intraventricular Prueba de esfuerzo con incompetencia cronotrópica. Pausas sinusales. Alteración de la refractariedad	Ninguno	Marca pasos
DNS-06 (Masculino)	16 años	Síncope y palpitaciones en el esfuerzo	Flutter auricular Bloqueo AV	Ninguno	Marca pasos
DNS-07 (Masculino)	31 años	Síncope en reposo	Pausas sinusales Taquicardia auricular Fibrilación auricular	Ninguno	Marca pasos
DNS-08 (Masculino)	3 años	Palpitaciones	Taquicardia y fibrilación auricular	MSR infantil en familiar 2° grado con DNS	Marca pasos
DNS-09 (Masculino)	1 año	Síncope en esfuerzo	DNS, QTc prolongado, flutter auricular, FA, TVM, trastornos intraventriculares	Ninguno	Marca pasos
DNS-10 (Femenino)	4 años	Síncope en esfuerzo	Taquicardia auricular	MS en familiares de 1° grado	Marca pasos
DNS-11 (Masculino)	9 años	Síncope y palpitaciones en el esfuerzo	Taquicardia auricular Bloqueo AV	Ninguno	β -bloqueadores Marca pasos
DNS-12 (Femenino)	25 años	Síncope en el esfuerzo	Retraso de la conducción y pausas sinusales. Taquicardia ventricular. Prueba de esfuerzo con incompetencia cronotrópica.	MS en familiares de 1° grado	DAI
DNS13 (Femenino)	2 años	Síncope en reposo	Pausas sinusales	Ninguno	Marca pasos

MSR: Muerte súbita revertida; DNS: Disfunción del nodo sinusal; QTc: QT corregido; TVM: Taquicardia ventricular monomórfica; DAI: Desfibrilador automático implantable AV: aurículo-ventricular.

La prueba genética en pacientes con DNS se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG (**Tabla 6.7**).

Tabla 6.7 Estrategia de SNG en casos con DNS

<i>Caso</i>	Ion Torrent	Haloplex	TruSight	Exoma completo
<i>DNS-01</i>	*	*		
<i>DNS-02</i>	*	*		
<i>DNS-03</i>		*		*
<i>DNS-04</i>	*	*		
<i>DNS-05</i>			*	
<i>DNS-06</i>			*	
<i>DNS-07</i>			*	
<i>DNS-08</i>		*		
<i>DNS-09</i>		*		
<i>DNS-10</i>	*	*		
<i>DNS-11</i>		*	*	
<i>DNS-12</i>	*	*	*	
<i>DNS-13</i>			*	

Tras el análisis de datos, se identificó al menos una variante nueva o rara (*i.e.* MAF < 0.01) en un cardiogen causal de MSC en 11 de los 13 pacientes con DNS (**Tabla 6.8**). Sin embargo, sólo 9 fueron portadores de ≥ 1 variante en un gen conocido de DNS: *SCN5A* o *HCN4*. La mayoría de éstas se clasificaron como patogénicas o probablemente patogénicas según los criterios de Campuzano (**Tabla 6.9**).

Tabla 6.9 Mutaciones en genes causales de DNS en casos con DNS

Mutaciones previamente reportadas en casos con CAs o en ensayos <i>in vitro</i>	Mutaciones con efecto patogénico mostrado en este estudio [§]	VUS*
<p><i>SCN5A</i>-p.R179X <i>SCN5A</i>- p.V240M^{§‡} <i>SCN5A</i>- p.S1710L[§]</p>	<p><i>SCN5A</i>-p.T1708N ^{§‡}</p>	<p><i>SCN5A</i> -p.R881C <i>SCN5A</i> -p.D1741fs <i>SCN5A</i> -p.A1778D <i>HCN4</i>-p.I479T</p>

[§] Mutaciones con predicción funcional dañina en ≥ 4 programas computacionales.

[‡] Mutaciones encontradas en ≥ 1 caso índice con diagnóstico clínico con CA en este estudio, no emparentados entre sí.

* De acuerdo con los criterios de Campuzano.

Entre las mutaciones identificadas en genes causales de DNS, la mayor parte (90%) se localizaron en el gen *SCN5A* (**Figura 6.3**).

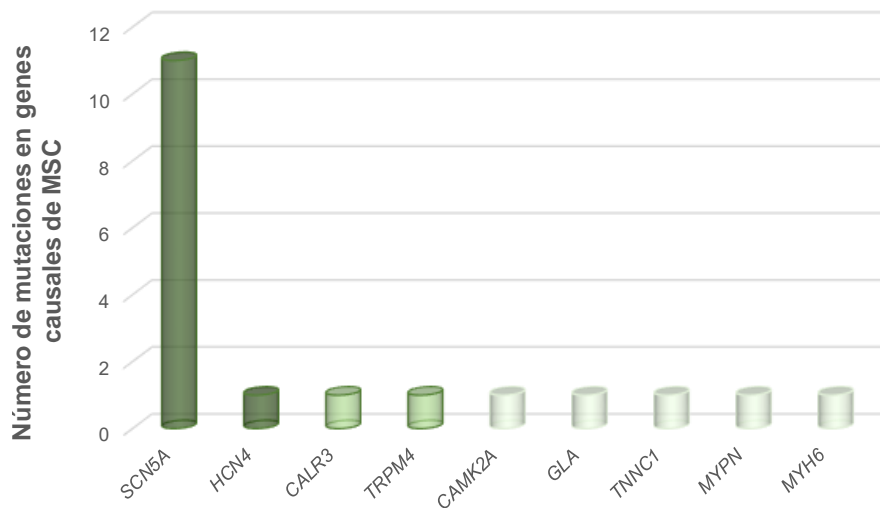


Figura 6.3 Distribución de mutaciones raras (MAF < 0.01) y no conocidas en genes causales de DNS (color oscuro), otras CAs (color medio) y MCPs (color claro) en casos con DNS de inicio temprano.

Casos heterocigotos compuestos

El caso *DNS-03* fue el único heterocigoto compuesto para 2 mutaciones en *SCN5A*: p.D1741fs y p.V240M. Éstas fueron clasificadas como VUS y probablemente patogénica, respectivamente, según los criterios de Campuzano. La variante p.V240M no tiene efecto funcional conocido, aunque ha sido reportada previamente en pacientes con SBr y SQT.

Casos sin mutaciones en genes causales de DNS

De los 4 casos sin mutaciones en genes de DNS, uno fue portador de las mutaciones *TRPM4*-p.K914X y *CAMK2A*-p.A483V, y otro portador de la mutación *TNNC1*-p.G70C.

Segregación de las mutaciones *SCN5A*-p.D1741fs y *SCN5A* -p.V240M en la familia del caso *DNS-03*

El análisis de segregación en la familia del caso *DNS-03* mostró que la variante *SCN5A*-p.D1741fs (c.5221dupG) fue heredada por rama paterna y la variante *SCN5A*-p.V240M (c.2431C>T; rs199473076) por rama materna. Hasta ahora no existen antecedentes de arritmias, síncope o MS por rama materna. La madre y la hermana del caso índice portadoras de la variante p.V240M no presentaron alteraciones en el ECG. El padre y un hermano portadores de la mutación p.D1741fs son aparentemente asintomáticos, aunque se refiere que una sobrina paterna tiene una CA estudiada en otro hospital (**Figura 6.4**).

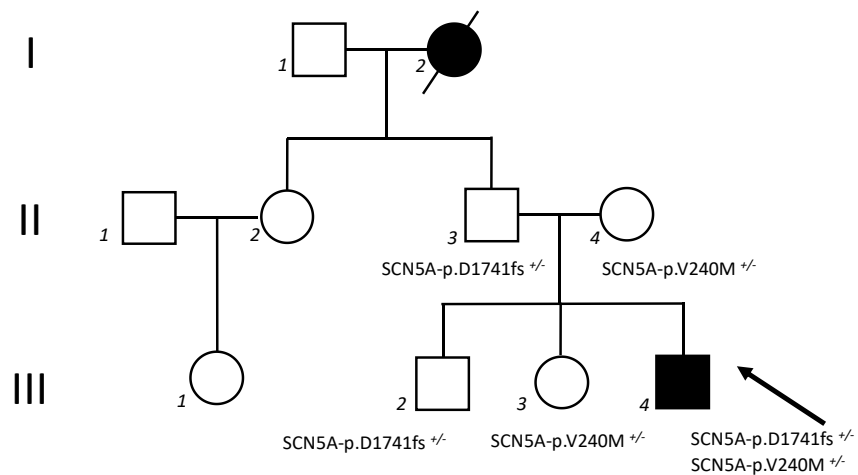


Figura 6.4. Árbol familiar del caso *DNS-03* que muestra la segregación de las variantes *SCN5A*-p.D1741fs y *SCN5A*-p.V240M.

6.5 Análisis Genético en casos con SBr

Se captaron 6 pacientes con diagnóstico clínico de SBr; 4 de ellos presentaron un patrón Brugada tipo I en el ECG en el reposo y 2 durante la prueba con ajmalina. La mayor parte (83%) fue de sexo masculino. El 50% de los casos índice había presentado un evento de síncope. El 83% recibía tratamiento con β -bloqueador y el 67% fue portador de un DAI, evidenciando un cuadro grave de la enfermedad (**Tabla 6.10**).

Tabla 6.10 Historia clínica y antecedentes heredofamiliares de pacientes con diagnóstico clínico de SBr

	Sintomatología y nosología	Hallazgos en el ECG	Episodios electrofisiológicos documentados	Historia familiar de MS o CA	Tratamiento
<i>SBr-01</i> (Masculino)	Síncope y palpitaciones en reposo	Patrón Brugada tipo II en reposo. Patrón tipo I con ajmalina. Bloqueo AV completo	TSV. Estudio electrofisiológico negativo para TV	Negativa	Ninguno
<i>SBr-02</i> (Masculino)	Síncope en reposo	Patrón Brugada tipo I Bloqueo AV Bradicardia sinusal	Ninguno	Síncope en familiares de 1° grado	β -bloqueadores
<i>SBr-03</i> (Masculino)	Ninguno	Patrón Brugada tipo I	Ninguno	MS en familiares de 1° grado	β -bloqueadores
<i>SBr-04</i> (Femenino)	MSR	Patrón Brugada tipo I	Ninguno	MS en familiares de 1° grado	β -bloqueadores
<i>SBr-05</i> (Masculino)	Síncope	Patrón Brugada tipo I	Mínima fibrosis interventricular y en el tercio basal medio	MS en familiares de 2° grado	β -bloqueadores
<i>SBr-06</i> (Masculino)	Palpitaciones en esfuerzo físico	Patrón de Brugada tipo II en reposo y tipo I con ajmalina	Ninguno	Hermana con Wolf-Parkinson White	β -bloqueadores

MSR: Muerte súbita revertida; TV: Taquicardias ventriculares; TSV: Taquicardia supraventricular; EFF: Estudio electrofisiológico; AV: aurículo-ventricular.

La prueba genética en pacientes con SBr se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG (**Tabla 6.11**).

Tabla 6.11 Estrategia de SNG en casos con DNS

Caso	Ion Torrent	Haloplex	TruSight	Exoma completo (BGI)
<i>SBr-01</i>	*	*		
<i>SBr-02</i>	*	*		
<i>SBr-03</i>	*	*		
<i>SBr-04</i>		*	*	*
<i>SBr-05</i>		*		
<i>SBr-06</i>	*	*		

Tabla 6.12 Mutaciones no conocidas y raras (MAF < 0.01)
Identificadas en casos con SBr

	Mutaciones en genes causales de SBr				Mutaciones en genes causales de CAs				Mutaciones en genes causales de MCPs			
	Gen afectado	Cambio en la proteína	Identificador del cambio	Clasificación de patogenicidad	Gen afectado	Cambio en la proteína	Identificador del cambio	Clasificación de patogenicidad	Gen afectado	Cambio en la proteína	Identificador del cambio	Clasificación de patogenicidad
<i>SBr-01</i> (Masculino)	<i>SCN5A</i>	p.T1708N	Reportada (sin id) 3_38592740_C-A ENST00000413689	Patogénica (12 puntos)	<i>ANK2</i>	p.M3111I	Nueva 4_114279107_G/T ENST00000357077	VUS (7 puntos)	-	-	-	-
<i>SBr-02</i> (Masculino)	<i>SCN5A</i>	p.S1710L	rs137854604 3_38592734_C-T ENST00000413689	Probablemente patogénica (11 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SBr-03</i> (Masculino)	<i>SCN5A</i>	p.E44fs	Nueva 3_38674667_CT/C ENST00000413689	VUS (8 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SBr-04</i> (Femenino)	<i>SCN2B</i>	p.S64C	Nueva ENST00000278947 11_118039346_G/C	VUS (8 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SBr-05</i> (Masculino)	-	-	-	-	<i>SNTA1</i>	p.R402W	rs373387978 20_31997974_G/A ENST00000217381	VUS (7 puntos)	-	-	-	-
<i>SBr-06</i> (Masculino)	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>VCL</i>	p.R433C	rs139559937 10_75849901_C/T ENST00000211998	VUS (5 puntos)

En todos los pacientes con SBr se encontró al menos una variante nueva o rara (*i.e.* MAF < 0.01) en un cardiogen causal de MSC (**Tabla 6.12**). Sin embargo, sólo 4 (67%) fueron portadores de una variante en un gen de SBr: *SCN5A* o *SCN2B*.

Entre las variantes identificadas en genes causales de SBr, la mayor parte se localizaron en el gen *SCN5A* (**Figura 6.5**).

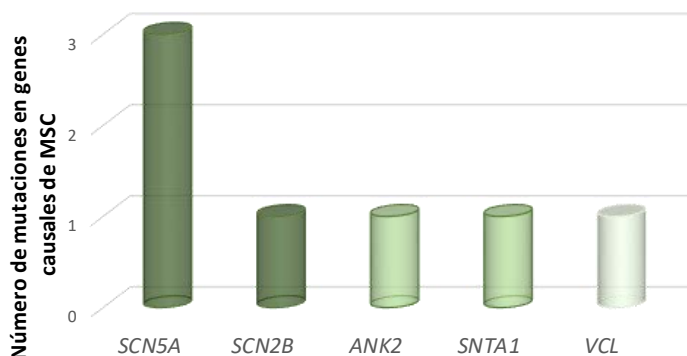


Figura 6.5 Distribución de mutaciones raras (MAF < 0.01) y no conocidas en genes causales de SBr (color oscuro), otras CAs (color medio) y MCPs (color claro) en casos con SBr

Entre los cambios en *SCN5A*, la mutación p.S1710L (c.5129C>T; rs137854604) fue clasificada como patogénica y era conocida por su efecto funcional; y la mutación p.T1708N (c.5123C>A) se clasificó como probablemente patogénica una vez mostrado su efecto funcional, como se describe más adelante (*Apartado 6.9*). Los cambios restantes se clasificaron como VUS (**Tabla 6.13**).

Tabla 6.13 Mutaciones en genes causales de SBr en casos con SBr

Mutaciones previamente reportadas en casos con CAs o en ensayos <i>in vitro</i>	Mutaciones con efecto patogénico mostrado en este estudio [§]	VUS*
<i>SCN5A</i> -S1710L [§]	<i>SCN5A</i> -p.T1708N [§] £	<i>SCN2B</i> -S64C <i>SCN5A</i> -E44EX

[§] Mutaciones con predicción funcional dañina en ≥ 4 programas computacionales.

£ Mutaciones en ≥1 caso con CA en este estudio (no emparentados entre sí).

* De acuerdo con la clasificación de Campuzano

Casos sin mutaciones en genes causales de SBr

En los casos *SBr-05* y *SBr-06* no se identificaron mutaciones en genes de SBr. En cambio, fueron portadores de las variantes *SNTA1*-p.R402W (c.1471C>A; rs373387978) y *VCL*-p.R433C (c.1297C>T; rs139559937), respectivamente.

6.6 Análisis Genético en casos con TVs polomórficas

Se captaron 3 casos con diagnóstico clínico de taquicardia ventricular (TV), que incluyeron: 2 casos con taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC); y 1 caso con TV monomórfica catecolaminérgica (TMVC). Los 2 casos con TVPC fueron mujeres. El caso con TMVC fue un hombre con TV documentada durante la prueba de esfuerzo. Todos presentaron un QTc normal. Los 3 casos estaban tratados con β -bloqueadores y ambos casos con TVPC eran portadores de un DAI (**Tabla 6.14**).

Tabla 6.14 Características clínicas de casos con diagnóstico de TV catecolaminérgica

	Diagnóstico clínico	Sintomatología	Episodios electrofisiológicos documentados	Historia familiar de CA o MS	Tratamiento
TMVC-01 (Masculino)	TMVC	Palpitaciones en el esfuerzo	Prueba de esfuerzo: positiva para TV	Ninguno	β -bloqueadores
TVPC-01 (Femenino)	TVPC	MSR y síncope en esfuerzo físico-estrés	Prueba de esfuerzo: positiva para TV. EEF: positivo para TV	Ninguno	β -bloqueadores DAI
TVPC-02 (Femenino)	TVPC	Síncope en esfuerzo físico-estrés	Ninguno	Ninguno	β -bloqueadores DAI

MSR: Muerte súbita revertida, TVPC: taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, TVC; taquicardia ventricular catecolaminérgica, TV: taquicardia ventricular, EEF: Estudio electrofisiológico, DAI: desfibrilador automático implantable.

Los 3 casos con diagnóstico clínico de TV catecolaminérgica fueron estudiados exclusivamente con SNG sitio-dirigida (**Tabla 6.15**).

Tabla 6.15 Estrategia de SNG en casos con TVP

Caso	Ion Torrent	Haloplex
TMVC-01	*	*
TVPC-01	*	*
TVPC -02	*	

No se encontró ninguna mutación en los 84 cardiogenes analizados en el único caso con TMVC. En cambio, se encontró que ambos casos con TVPC fueron portadores de una

mutación en *RYR2* (Tabla 6.16). Ambas variantes codificaron un residuo de aminoácido localizado (p.S408P y p.G3946S) en un *hotspot* de RyR2 (Figura 6.6).

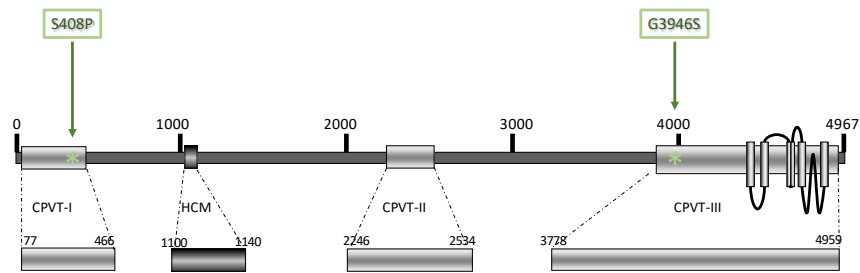


Figura 6.6 Localización de las variantes *RYR2*-p.S408P y *RYR2*-p.G3946S en la secuencia del canal RyR2. Los recuadros inferiores señalan los *hotspots* de RyR2 que albergan la mayor parte de las mutaciones causales de TVPC.

La mutación *RYR2*-p.G3946S (c.11836G>A) se clasificó como patogénica según los criterios de Campuzano. Esta mutación se identificó únicamente en el caso índice, quien es el único individuo con TV documentada en la familia, evidenciando un evento mutacional *de novo* (Figura 6.7).

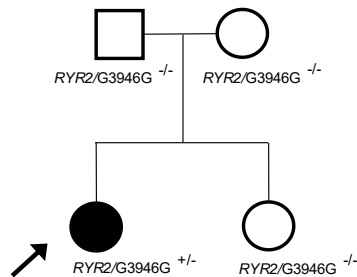


Figura 6.7 Árbol familiar del caso *TVPC-02* que muestra la segregación de la mutación p.G3946S en el gen *RYR2*. La presencia o ausencia de la mutación se comprobó mediante secuenciación Sanger en los 4 individuos de la familia analizados.

Tabla 6.16 Mutaciones no conocidas y raras (MAF < 0.01) identificadas en casos con TV catecolaminérgica

	Variantes en genes causales de TVPC				Variantes en genes causales de otras CAs				Variantes en genes causales de MCPs			
	Gen afectado	Cambio en la proteína	Identificador del cambio	Clasificación de patogenicidad	Gen afectado	Cambio en la proteína	Identificador del cambio	Clasificación de patogenicidad	Gen afectado	Cambio en la proteína	Identificador del cambio	Clasificación de patogenicidad
TVMC-01 (Masculino)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TVPC-01 (Femenino)	<i>RYR2</i>	p.S408P	Nueva 1_237608752_T/C ENST00000366574	Probablemente patogénica (9 puntos)	-	-	-	-	<i>ACTN2</i>	p.R721S	rs149433837 1_236920792_C/A ENST00000366578	VUS (5 puntos)
TVPC-02 (Femenino)	<i>RYR2</i>	p.G3946S	Reportada (sin identificador) 1_237942026_G/A ENST00000366574	Probablemente patogénica (9 puntos)	-	-	-	-	-	-	-	-

CA: Canalopatías arritmogénicas, CMP: Cardiomiopatía

6.7 Mutación *RYR2*-p.R2920Q en un caso con SQT

La mutación *RYR2*-p.R2920Q (c.8759G>A) se encontró en el caso *SQTL-25*, quien muestra un QTc sostenidamente prolongado en el ECG (QTc máximo = 532 ms) y ha sufrido un episodio documentado de TdP. Esta paciente aparentemente no es portadora de mutaciones en genes causales de SQT, por lo que el objetivo de esta sección fue determinar las propiedades funcionales del canal RyR2 p.R2920Q, a fin de aportar evidencia adicional que permita definir si *RYR2* es un gen causal de SQT. Para ello, se generó el gen murino mRyR2-p.R2920Q mediante mutagénesis dirigida y se creó una línea estable de células HEK inducibles para expresar el canal recombinante. Los ensayos de Western Blot en células HEK inducibles solubilizadas con CHAPS permitieron visualizar una banda de ~560 kDa correspondiente a las proteínas mRyR2-p.R2920Q o mRyR2-WT en estas células, evidenciando una expresión similar entre ambas proteínas (Figura 6.8A).

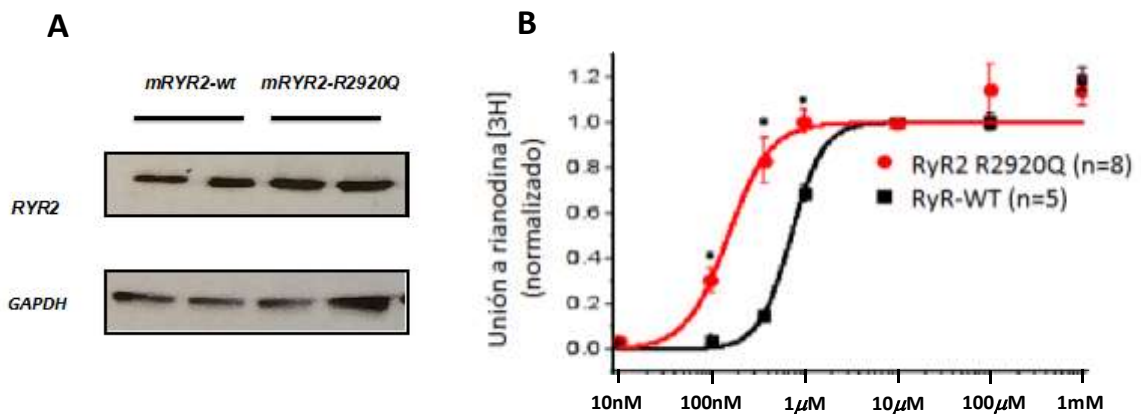


Figura 6.8 A. Figura representativa de los ensayos de Western Blot ($n=3$) de mRyR2 silvestre (WT) y mRyR-p.R2920Q. Se empleó la misma cantidad de proteína total obtenida 48 horas después a la transfección. La proteína mRyR-p.R2920Q se reveló con anticuerpos anti-RyR2. GAPDH fue inmunorevelada como control testigo. **B.** Curvas de unión a [3 H]-rianodina a los canales mRyR2-p.R2920Q y mRyR2-WT en función de la concentración de Ca^{2+} . La concentración efectiva para alcanzar el 50% de saturación (CE50) fue de 210 nM \pm 4.0 en los canales mRyR2-p.R2920Q, significativamente menor a la de los canales WT, donde la CE50 = 715 nM \pm 0.7, $p < 0.01$.

Así mismo, encontramos que la mutación p.R2920Q parece generar mRyRs hipersensibles al Ca^{2+} . El ensayo de unión de la molécula de [3 H]-rianodina realizado en canales mRyR2-WT y mRyR2-p.R2920Q sometidos a diferentes concentraciones de

Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) mostró que la concentración efectiva para alcanzar el 50% de saturación (CE_{50}) en los canales mRyR2-p.R2920Q ($\text{CE}_{50} = 210 \text{ nM} \pm 4.0$) fue significativamente menor a la que observó en los canales WT ($\text{CE}_{50} = 715 \text{ nM} \pm 0.7$; $p < 0.01$) (**Figura 6.8B**).

6.8 Ancestría de la mutación *KCNH2-p.T613M*

La mutación *KCNH2-p.T613M* (rs199473524) se identificó en el caso *SQTL-11*, una mujer de 34 años con una forma grave de *SQTL-RW* ($\text{QTc} > 500 \text{ ms}$) con historia de síncope y cuadros convulsivos desde los 11 años, desencadenados por ruidos fuertes durante el reposo. Con antecedentes familiares de MS en la familia paterna, tiene un puntaje de Schwartz de 8.5. La secuenciación del genoma completo de esta paciente e integrantes de su familia permitió identificar la mutación *KCNH2-p.T613M* como causal del síndrome (**Figura 6.9**); la cual había sido pasada por alto mediante el análisis genético con DHPLC.

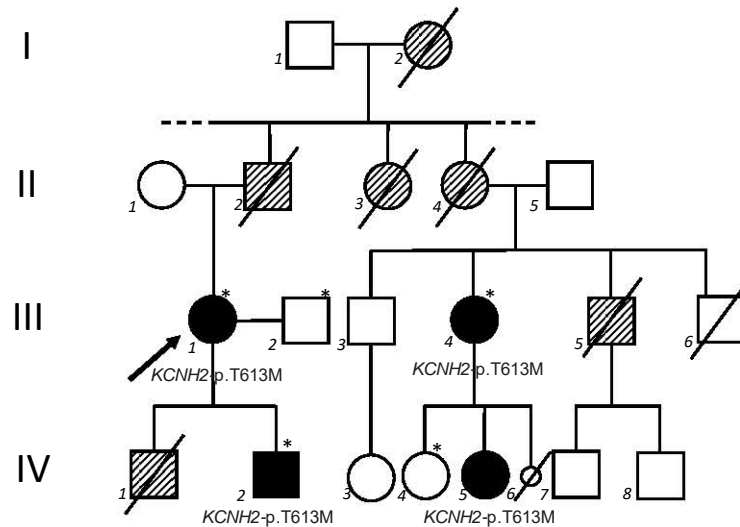


Figura 6.9 Segregación de la mutación *KCNH2-p.T613M* en la familia del caso *SQTL-11*. Se marca con un asterisco los individuos cuyo genoma completo fue secuenciado. Las figuras en negro indican a los individuos con QTc prolongado. Las figuras a rayas muestran casos de MS sin datos electrocardiográficos ni genéticos. El círculo pequeño indica aborto espontáneo.

El análisis de ancestría global realizado sobre caso índice *SQTL-11*, esposo e hijo (portador de la mutación) mostró que los 3 son individuos son genéticamente mestizos, con ~55% de ancestría indígena, ~39% de ancestría europea y ~6% de ancestría africana (**Figura 6.10**).

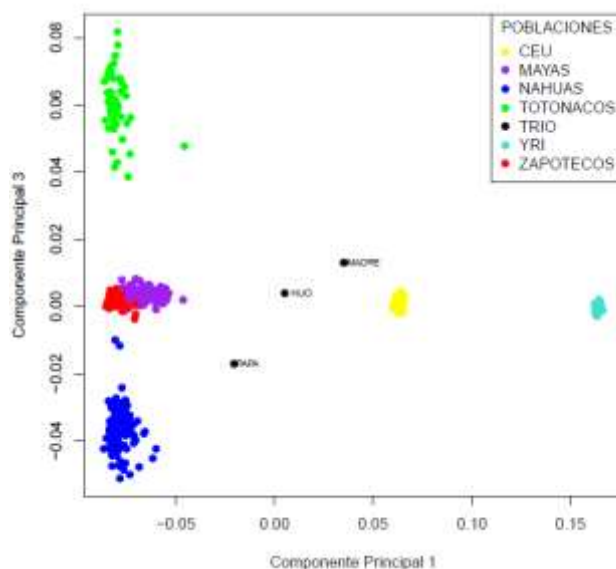


Figura 6.10 Análisis de componentes principales donde se distinguen las 6 poblaciones empleadas como referencia: europeos (CEU), africanos (YRI), mayas, nahuas, totonacos y zapotecos). Se observa que el caso índice *SQTL-11*, su esposo y su hijo afectado son individuos mestizos, que se agrupan entre la población europea y Nativa Americana, particularmente la maya y zapoteca.

Posteriormente, el análisis de ancestría local reveló que la mutación *KCNQ1*-p.T613M ocurrió en un fragmento de 10 Mb con 99.9% de probabilidad de ser de origen indígena. Con base en ello, se realizó el análisis de ancestría global de un subfragmento de 1Mb que contiene la mutación *KCNQ1*-p.T613M (**Figura 6.11**). Este segmento mostró tener 88% de componente de origen maya, 9% totonaco, 2% nahua y 1% zapoteco.

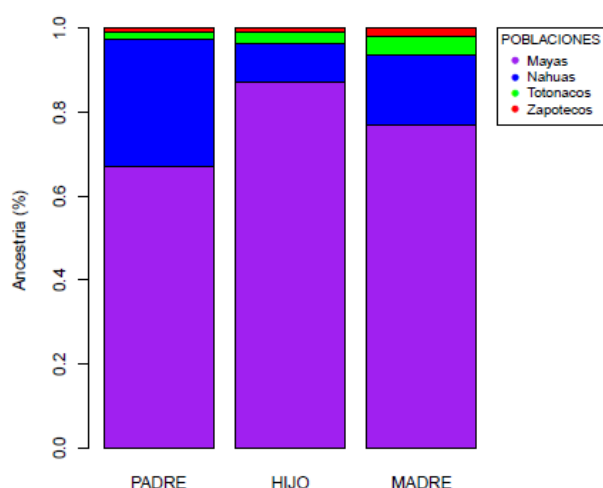


Figura 6.11 Análisis de ancestría global de un fragmento (1 Mb) que contiene la mutación *KCNH2*-p.T613M en el caso *SQTL-11* (madre), su hijo y esposo. Este fragmento es en su mayoría de origen maya (morado).

6.9 Caracterización funcional de la mutación *SCN5A*-p.T1708N en 3 familias con fenotipo mixto

La mutación p.T1708N (c.5123C>A) en *SCN5A* se encontró en 3 casos aparentemente no emparentados entre sí: 1) *SBr-01*, 2) *DNS-02* y 3) *DNS-09*. Los 3 casos fueron además portadores del polimorfismo p.H558R (c.1673A>G; rs1805124) en *SCN5A*. La **Tabla 6.13** resume las características clínicas de los 3 casos y de aquellos familiares portadores de la mutación *SCN5A*-p.T1708N. La segregación de la mutación *SCN5A*-p.T1708N en cada familia se ilustra en la **Figura 6.12**.

Tabla 6.13 Rasgos electrocardiográficos de los portadores de la mutación p.T1708N en *SCN5A*

Caso	Hallazgos en el ECG
<i>SBr-01</i>	SBr (Patrón I), bradicardia, bloqueo AV grado I, QTc=420, PR=272
Hallazgos en el ECG	
<i>DNS-02</i>	Bradicardia, bloqueo de rama derecha, elevación del ST en V1, QTc=458, PR=190
Madre	Bradicardia, QTc=395, PR=184
Hermano	Desorden de la repolarización, Bradicardia, bloqueo de rama derecha, onda U prominente, QTc=433, PR=150
Hallazgos en el ECG	
<i>DNS-09</i>	Bloqueo de rama izquierda, Flutter auricular 3:1, QTc=531, PR=200
Hermana	QTc=465, PR=180
Hermano	Bloqueo de rama derecha, Flutter auricular, QTc=458, PR=200
Tía materna	QTc=478, PR=240
Hermana	QTc=488, PR=220
Sobrino	QTc=483, PR=180

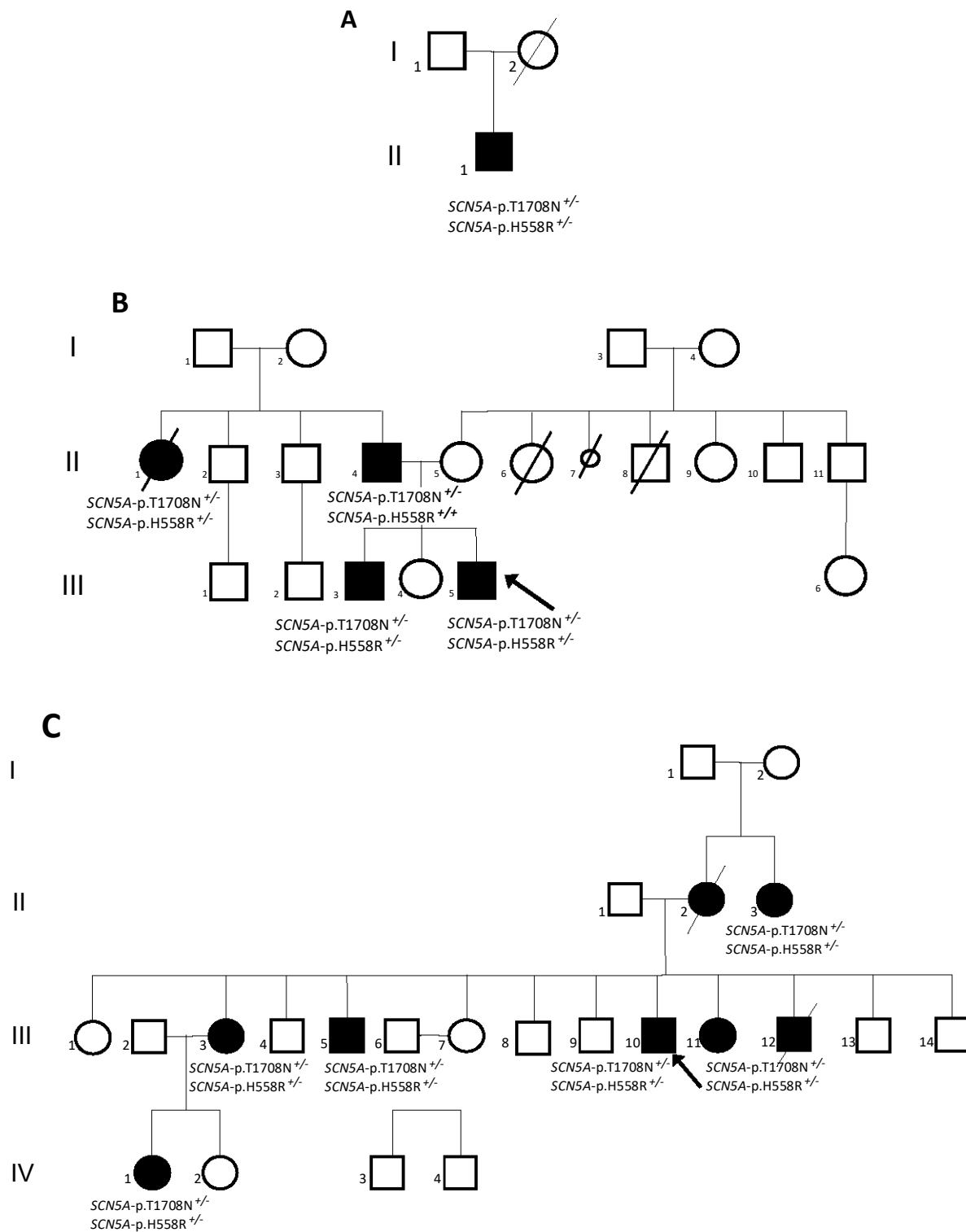


Figura 6.12 Árboles de familias portadoras de la mutación *SCN5A-p.T1708N*. **A.** Familia del caso *SBr-01*. **B.** Familia del caso *DNS-02*. **C.** Familia del caso *DNS-09*. Las figuras en negro indican a los portadores de la mutación *SCN5A-p.T1708N*. La línea diagonal indica casos de muerte súbita.

Caracterización Funcional

Para estudiar los efectos de la mutación p.T1708N y el polimorfismo p.R558H del canal Nav1.5 sobre la cinética de la corriente de sodio (INa) se obtuvieron registros electrofisiológicos de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con *SCN5A*-WT, -p.H558R, -p.T1708N y -p.H558R + p.T1708N. La dependencia de voltaje de la INa se estudió con el protocolo de activación (material y métodos). Los ejemplos representativos de las familias de corrientes registradas en cada caso se muestran en la **Figura 6.13A**.

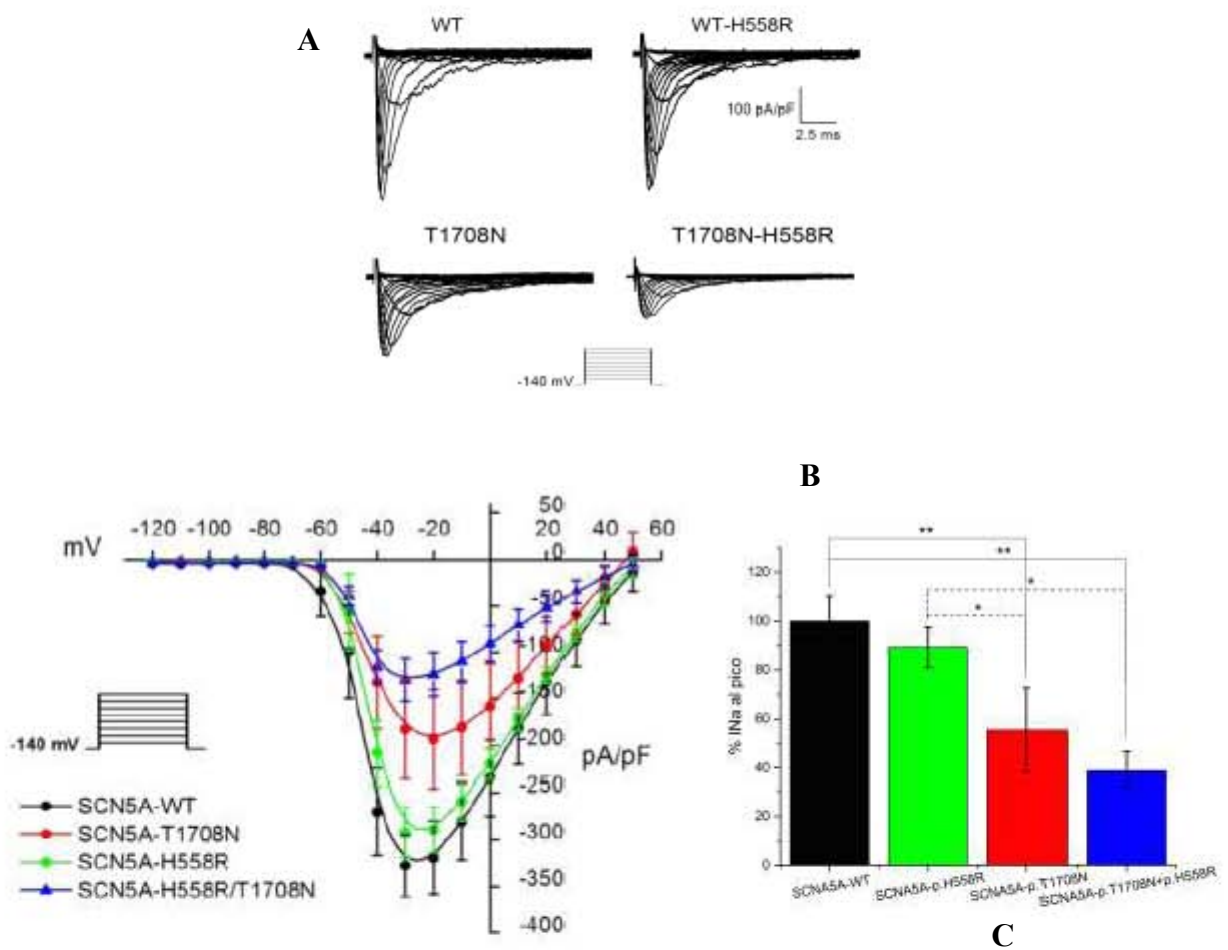


Figura 6.13 A. Trazos representativos de la INa en canales Nav1.5-WT (negro), -p.H558R (verde), -p.T1708N (rojo) y H558R+p.T1708N (azul) en células HEK-293. B. Curvas de densidad de corriente contra voltaje de la INa al pico para cada genotipo. C. Gráfica de barras del porcentaje de la densidad de corriente de cada caso. En B y C se graficaron los promedios \pm ESM (* $p < 0.005$; ** $p < 0.01$).

Las curvas de densidad de corriente (pA/pF) contra voltaje para cada genotipo se construyeron a partir de la normalización de la amplitud de la corriente al pico en función del tamaño celular (capacitancia) (**Figura 6.13B**). En todos los casos la densidad de corriente máxima se registró a -30 mV y el potencial de inversión a +50 mV. La curva de densidad de corriente de Nav1.5-WT fue similar a la obtenida previamente por Hua *et al.* (2005). La densidad de corriente máxima de los canales Nav1.5-p.H558R (polimorfismo) no fue significativamente distinta a la de los canales silvestres (WT). En cambio, las densidades de corriente máxima de las variantes *SCN5A*-p.T1708N (mutante) y *SCN5A*-p.T1708N+p.H558R (mutante + polimorfismo) disminuyeron significativamente respecto a la WT ($p < 0.01$) y a la p.H558R ($p > 0.05$) (**Figura 6.13C**).

La inactivación de los canales Nav1.5-WT, -p.H558R, -p.T1708N y -p.H558R+p.T1708N se estudió con la amplitud de la corriente al pico registrada en el pulso fijo a 0 mV del protocolo de inactivación. Los datos obtenidos se ajustaron a una ecuación de Boltzmann para obtener los valores de voltaje medio ($V_{1/2}$) y la pendiente (k) (**Figura 6.14**). No encontramos diferencias significativas ni en el $V_{1/2}$ ni en k para ninguno de los genotipos.

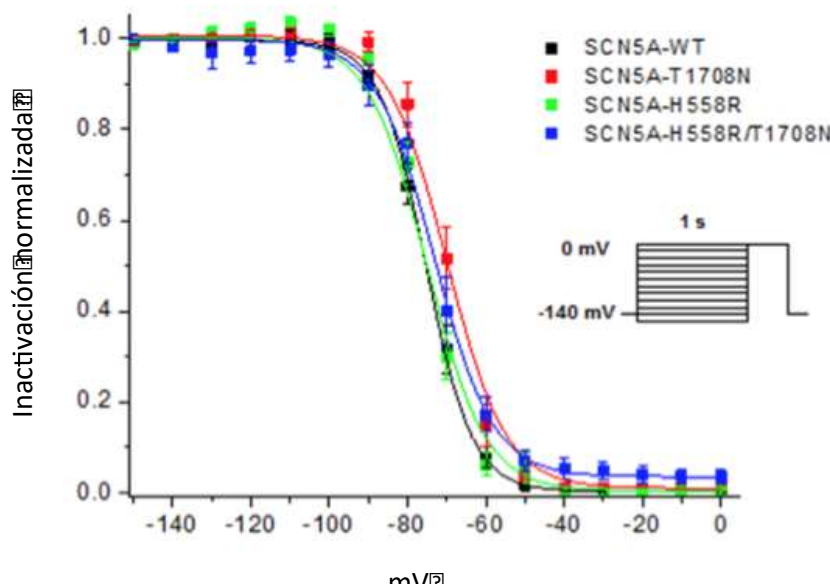


Figura 6.14 Curvas de inactivación de los canales Nav1.5-WT (negro), -p.H558R (verde), -p.T1708N (rojo) y -p.H558R+p.T1708N (azul) construidas con el protocolo mostrado en el inserto. Se muestran los promedios \pm ESM.

Para estudiar si la mutación y/o el polimorfismo alteraron la recuperación de la inactivación del canal Nav1.5, se midieron las amplitudes de las corrientes al pico. La I_{Na} al pico registrada con el primer pulso se empleó para normalizar el pico del segundo pulso a los diferentes tiempos. La corriente normalizada se graficó en función del intervalo de tiempo entre pulsos correspondiente. La ecuación que describió mejor estos datos fue una función de dos exponenciales (**Figura 6.15**).

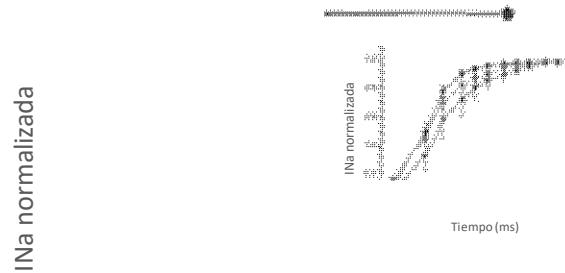


Figura 6.15 Recuperación de la inactivación de los canales Nav1.5-WT (negro), -p.T1708N (rojo) y H558R+p.T1708N (azul) obtenida con el protocolo mostrado en el inserto. Se graficaron los promedios \pm ESM (* $p < 0.005$; ** $p < 0.01$).

La corriente tardía se estudió con un pulso a 0 mV y una duración de 250 ms. La corriente registrada con este protocolo en los canales Nav1.5-p.T1708N+p.H558R y -p.T1708N aumentó significativamente respecto a la del canal WT ($p < 0.05$; **Figura 6.16**).

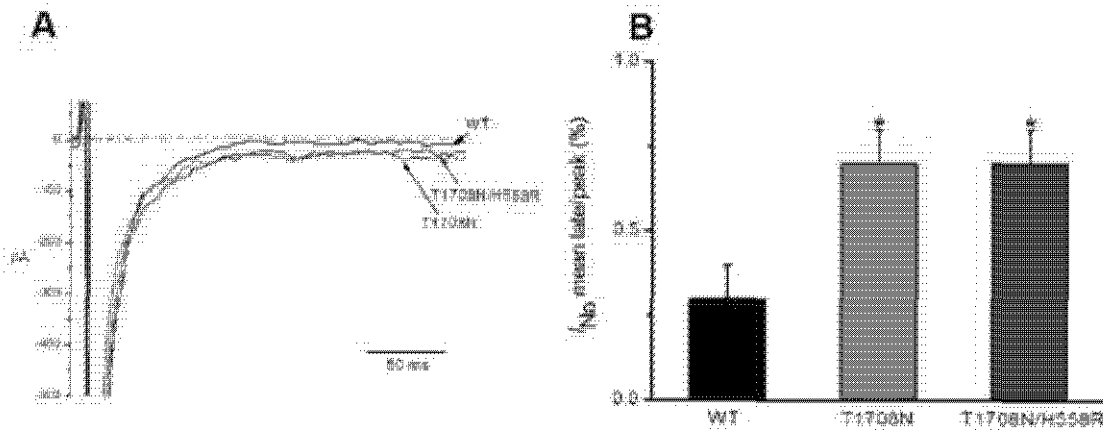


Figura 6.16 A. Corriente tardía de los canales Nav1.5-WT (negro), -p.T1708N (rojo) y H558R+p.T1708N (azul). B. Gráfica de barras de la corriente tardía normalizada al pico (una vez hecha la sustracción de la corriente de fuga). Se muestran los promedios \pm ESM (* $p < 0.005$).

6.10 Autopsia molecular de un caso de MSI: modelación *in silico* de *Kv7.1/p.A300T/p.P535T*

Los padres de una niña (caso *SQTL-20*) que murió repentinamente a los 7 años acudieron al INMEGEN buscando la posibilidad de un diagnóstico *post-mortem*. La niña tenía historial de síncope autolimitado durante la actividad física. Se diagnosticó con disautonomía a los 6 años y fue tratada con propranolol, permaneciendo asintomática durante el tratamiento farmacológico. Más tarde, fue retirado el tratamiento y la niña sufrió un paro cardíaco durante el esfuerzo físico. La medición post-paro cardíaco del QTc en un ECG en la sala de urgencias fue de 454 ms; aunque fue poco fiable debido a la hipotermia terapéutica inducida y el desequilibrio electrolítico. Los padres rechazaron una autopsia. Meses después, a sugerencia de su médico, buscaron pruebas genéticas que pudieran evidenciar la presencia de un síndrome arritmogénico hereditario. Gracias a que la sangre del cordón umbilical de la niña había sido almacenada en un banco de sangre al momento de nacer fue posible realizar pruebas genéticas *post-mortem*. En el interrogatorio, se encontró una historia familiar sin incidentes. Ambos padres y el hermano menor fueron asintomáticos, con exámenes físicos, ECG y ecocardiogramas normales en reposo. Sin embargo, durante la prueba de esfuerzo se observó un aumento significativo en la longitud del intervalo QTc y anomalías de repolarización en la madre (**Figura 6.17**).

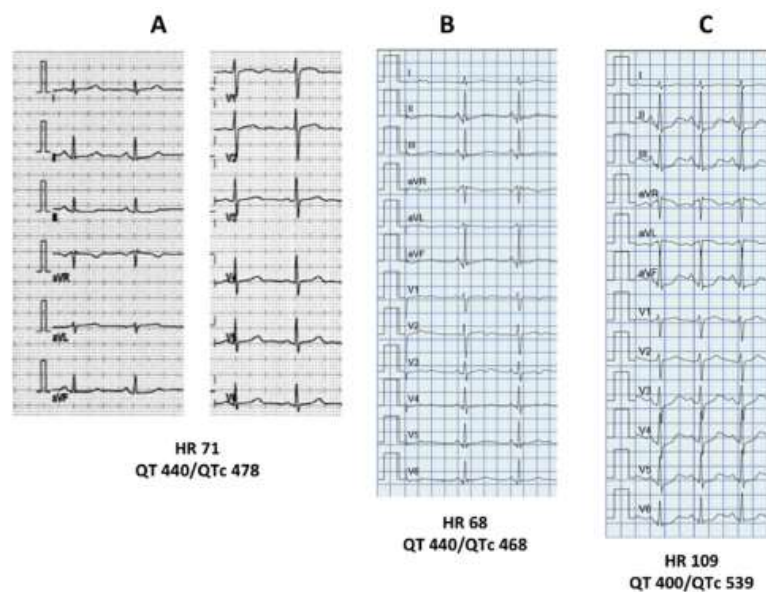


Figura 6.17 ECG de la madre del caso *SQTL-20*. **A.** ECG basal de 12 derivaciones. **B.** ECG basal durante la prueba de esfuerzo. **C.** Intervalo QTc en el minuto 3 de recuperación después de la prueba de esfuerzo del ejercicio.

La SNG sitio dirigida reveló que la niña era heterocigota compuesta para una variante rara *KCNQ1*-p.A300T (rs120074187) y una variante nueva en el mismo gen, *KCNQ1*-p.P535T. La secuenciación de Sanger confirmó la presencia de ambos cambios en el caso índice; y mostró que el padre y hermano eran portadores heterocigotos de la variante *KCNQ1*-p.A300T, y la madre portadora heterocigota de la variante *KCNQ1*-p.P535T (**Figura 6.18**).

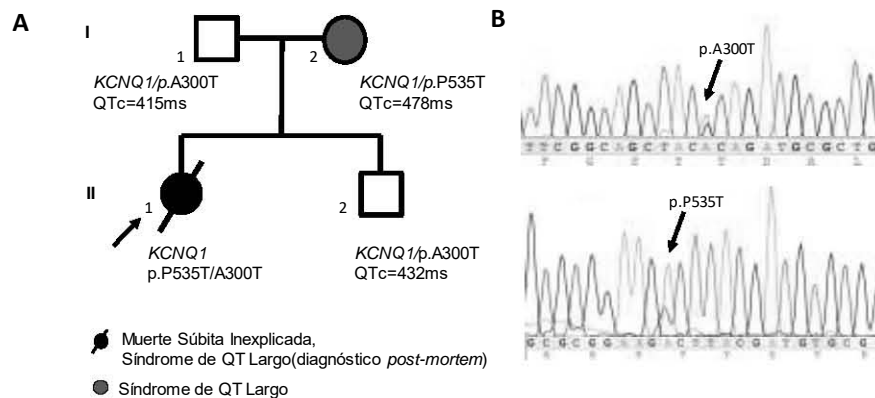


Figura 6.18 Análisis de segregación de las mutaciones p.A300T y p.P535T en *KCNQ1*. **A.** Árbol familiar del caso índice. **B.** Electroferogramas de *KCNQ1* que muestran el genotipo del caso índice.

Modelo in silico del canal Kv7.1

Se obtuvieron 10 modelos en diferentes ensayos no determinísticos a partir de la secuencia completa de Kv7.1 (UniProtKB ID: P51787), empleando el servidor Phyre2 en modo de *modelado intensivo*. El 16-30% de la secuencia tuvo un 29-100% de identidad con otras estructuras previamente resueltas del *Protein Data Bank*. El mejor modelo generado se muestra en la **Figura 6.19A**. La secuencia de aminoácidos de Kv7.1 se analizó en seis regiones o dominios estructurales diferentes: El *dominio D1* en el extremo N-terminal conformado por 118 aminoácidos (aa). Este dominio no presenta homología con las estructuras cristalizadas y está intrínsecamente desordenado debido a su alto contenido de residuos de prolina. El *dominio D1* está seguido por 2 dominios transmembranales (TM): el *dominio D2* (127 aa) y *dominio D3* (109 aa) homólogos al canal de potasio Shaker (Kv1.2) cristalizado (PDB 2A79 y 2R9R). Estos dominios corresponden al arquetipo estructural del dominio del poro de todos los canales Kv: con 4 hélices TM (*segmentos S1* a *S4*) en D2, y 2 hélices TM (*segmentos S5* y *S6*) en el

dominio D3, los cuales al tetramerizarse forman el canal de potasio (**Figura 6.19B**). El dominio 4 (D4) contiene dos hélices: hélice A (43 aa) y hélice B (39 aa), separadas por un dominio de 103 residuos de aminoácido (D5) (**Figura 6.19C**). Finalmente, el dominio D6 en la región C-terminal está constituido por 137 residuos de aminoácido, formado por dos hélices que pueden tetramerizar, tal como se está determinado por la estructura PDB 3BJ4 resuelta mediante cristalografía de rayos X. De acuerdo con nuestro modelo, la variante A300T se encuentra en D3 frente al espacio extracelular, mientras que la variante P535T está localizada en la región citoplasmática hacia el final de D4, a una distancia de $> 40 \text{ \AA}$ del residuo de A300. De acuerdo con nuestro modelo, la variante p.A300T se localiza en el *dominio D3* dando la cara hacia el espacio extracelular; mientras que la variante p.P535T se localiza en la región citoplasmática hacia el final del *dominio D4*, a una distancia de $>40\text{\AA}$ del aminoácido A300 (*i.e.* no interactúan entre sí).

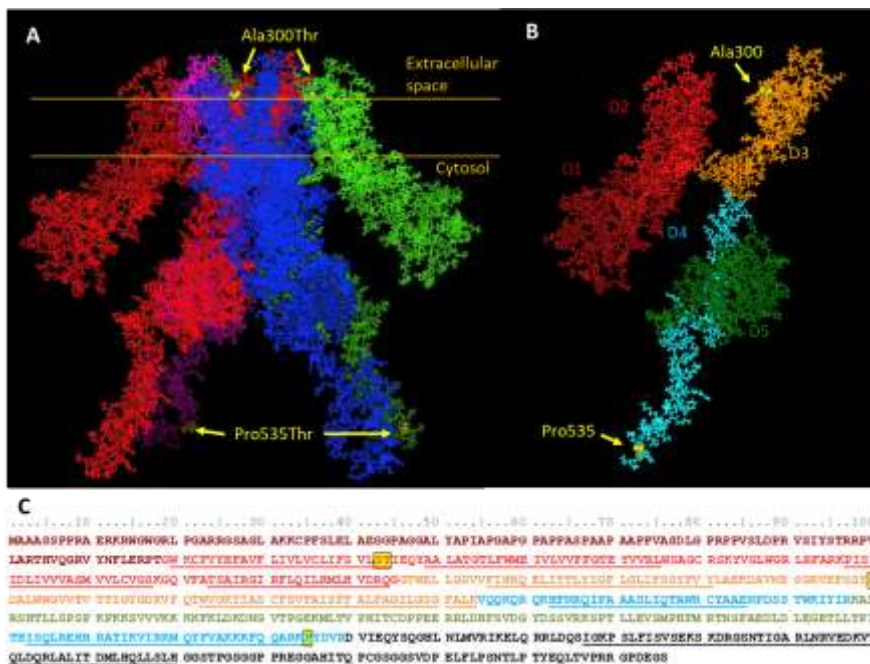


Figura 6.19 Modelo molecular de Kv7.1. **A.** Modelo molecular de las regiones estructurales o dominios de una cadena monomérica. La posición de los residuos A300 (D3) y P535 (D4) están marcados en amarillo. No se muestra el dominio D6. **B.** Modelo molecular del tetrámero embebido en la membrana celular. **C.** La secuencia de residuos de aminoácidos de Kv7.1 (676 residuos). El código de color de la secuencia es el mismo utilizado para reconocer los dominios en el panel A. Los residuos subrayados corresponden a las hélices relevantes: hélices transmembranales (TM) S1-S4 en D2 (rojo); hélices TM S5 y S6 en D3 (naranja); hélices A y B en D4 (azul); y la hélice de tetramerización D6 (negro). Los residuos S143, T144, A300 y P535 están en recuadros amarillos.

Modelo del canal Kv7.1/p.A300T

La estructura del tetrámero Kv7.1 formado por 4 monómeros mutantes T300 se muestra en la **Figura 6.20**. Se observa que el residuo T300 se localiza en la región reentrante de un asa (asa-P) que existe entre los *segmentos S5 y S6* del *dominio D3*. La mutación da la cara hacia la interfaz con otro monómero, en la región extracelular (**Figura 6.20A y B**). Se observa que a diferencia de lo que ocurre en el canal silvestre, los grupos hidroxilo del residuo T300 forman puentes de hidrógeno con los aminoácidos S143 y T144 del *segmento S1* (en el *dominio D2*) del monómero adyacente, causando una distorsión conformacional de los monómeros implicados. Esta distorsión afecta ligeramente la conformación de la cadena principal alrededor de la posición 300 (RMSD = 0.26 Å para los residuos 297-303) y una redistribución notoria de la región S143/T144 de la cadena vecina (RMSD = 1,14 Å para los residuos 140-147) (**Figura 20C**).

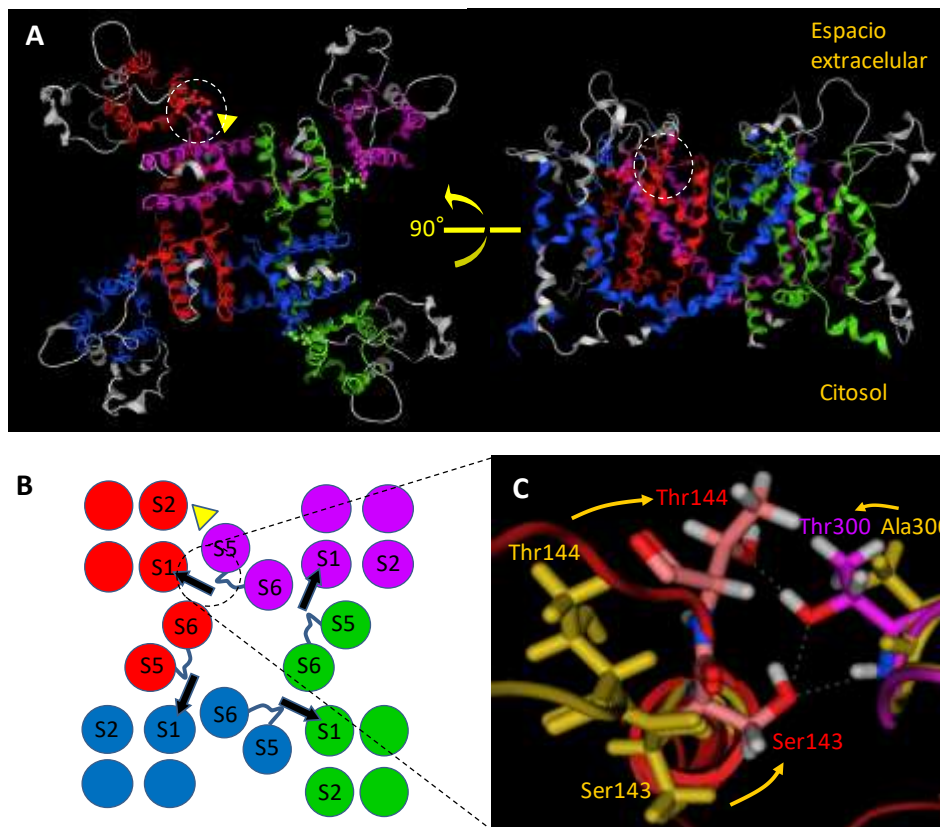


Figura 6.20 Modelo detallado de la región transmembranal del tetrámero cuádruple mutante T300. Cada monómero se representa en un color diferente. El triángulo amarillo marca los sitios de unión a la subunidad accesoria *KCNE1* (minK). A. Vista superior y lateral del tetrámero. Se indica con círculos punteados la interacción entre T300 (subunidad magenta) y S143-T144 (subunidad roja). Las cintas blancas denotan las regiones de movilidad altamente alterada inducida por T300. B. Representación esquemática de los segmentos transmembranales. Las flechas negras indican la dirección del efecto estructural de T300 sobre las cadenas vecinas. C. Detalle atómico de la interacción entre el residuo magenta T300 y los residuos S143-T144 rojos. La comparación con la estructura silvestre (amarillo) muestra el reordenamiento conformacional de los segmentos 140-147 y 297-303 en el monómero adyacente. Las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno.

Perfiles de Movilidad

La **Figura 6.21A** muestra los 6 posibles tetrámeros en un portador heterocigoto de la mutación p.T300A, modelados sin considerar el posible efecto de la variante p.P535T (en la región citoplasmática). La **Figura 6.21B** representa las diferencias en movilidad por átomo (factor ΔB) para uno de los monómeros (delineado en rojo) en cada tetrámero mutante posible (*b, c, d, e* y *f*) en comparación con la movilidad del mismo monómero en un tetrámero WT (*a*). Las regiones inter-helicoidales del *dominio D2* (i.e. regiones entre los segmentos helicoidales S1-S4) de los monómeros adyacentes al monómero mutante T300 mostraron aumentos y disminuciones en la movilidad, hasta 20 veces mayor en magnitud, que los cambios en el segmento que contiene el residuo T300. Los tetrámeros formados por 3 ó 4 monómeros mutantes (*e, f*) o por 2 monómeros mutantes adyacentes entre sí (*d*) mostraron los mayores cambios de movilidad; mientras que la movilidad de los tetrámeros formados por uno (*b*) o dos monómeros mutantes alternados (*c*) se vio afectada en menor medida. El factor ΔB por átomo de los monómeros *verde, magenta y azul* (**Figura 6.21B**) en cada posible tetrámero muestran en el **Anexo I**.

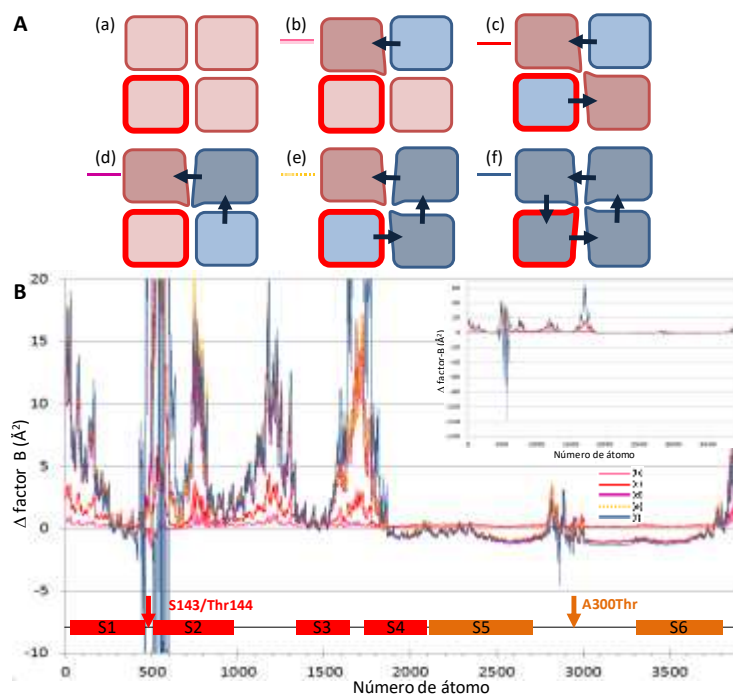


Figura 6.21. Diferencias de movilidad en los tetrámeros mutantes vs silvestre. A. Seis posibles combinaciones de un tetrámero en un individuo heterocigoto de p.A300T y p.P535T. Las flechas indican la distorsión estructural causada por la mutación p.T300 en el monómero adyacente (en tono más oscuro). B. Diferencia del factor B (Δ factor-B) en todos los átomos del monómero *rojo* (panel A) de cada tetrámero mutante (*b, c, d, e* y *f*) en comparación con el tetrámero silvestre (*a*). Los segmentos correspondientes a los segmentos transmembranales del canal Kv7.1 se muestran en rojo (S1-S4 de una subunidad) y naranja (S5-S6 en la subunidad adyacente). Las flechas muestran las posiciones de los residuos S143-T144 y T300. El recuadro superior derecho muestra el mismo gráfico a escala completa.

Modelo del canal Kv7.1/p.P535T

La variante p.P535T se encontró hacia el final del *dominio* D4 en la región citoplasmática del canal. Este dominio fue modelado con base en la estructura PDB 4V0C, dominio C-terminal proximal de Kv7.1 resuelto por cristalografía de rayos X en complejo con la proteína calmodulina (CaM). Nuestro modelo se generó considerando que las *hélices* A y B (del *dominio* D4) del mismo monómero interactúan de forma antiparalela. Tal interacción generó una estructura tipo horquilla que forma un sitio de unión a CaM, donde el dominio D5 podría actuar como una bisagra (**Figura 6.22 A y B**). La *hélice* A se extendió hacia el citosol como un cuerpo rígido, delimitado por un pliegue producido por el residuo P369. Los residuos A533, L534 y P535 produjeron una fuerte señal de finalización para la hélice B del canal Kv7.1-WT. GORIV predijo que la treonina en la posición 535 IV se elonga (**Figura 6.22**). La hélice B elongada chocaría con el asa citoplásmica que conecta los segmentos S4 y S5 en el *dominio* D3, limitando su correcta interacción con la *hélice* A y, por tanto, evitando por impedimento estérico la formación del sitio de unión a CaM.

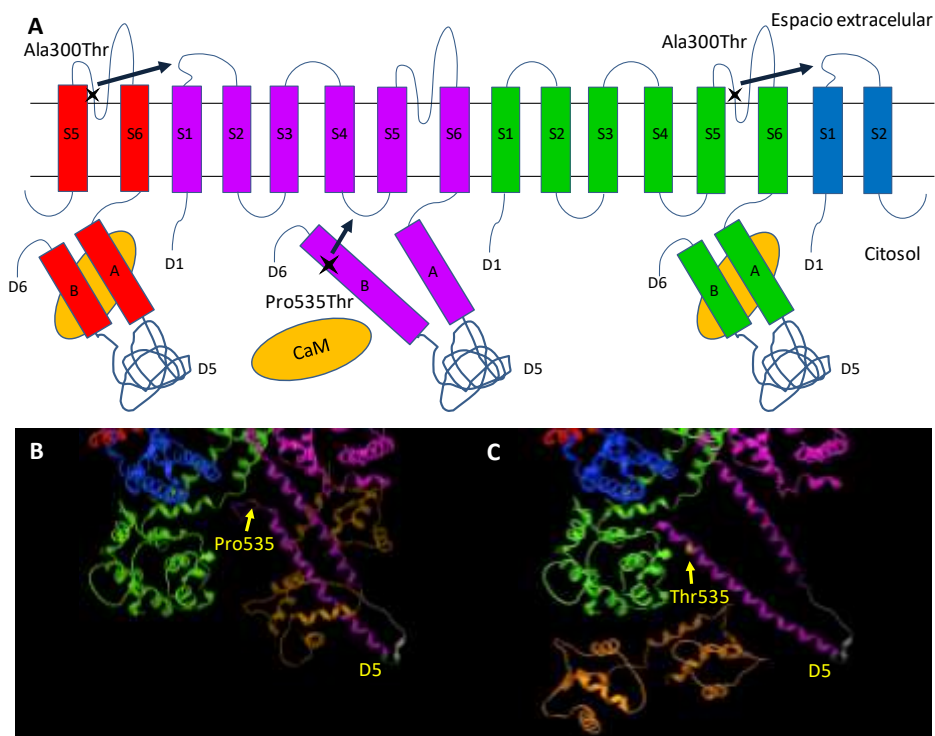


Figura 6.22 Efecto predicho para la variante p.P535T. **A.** Topología simplificada del tetrámero Kv7.1 conformado por monómeros Thr300 y Thr535. El modelo predice que la treonina en la posición 535 elonga la hélice **B**. La hélice elongada chocaría con el asa interhélices, impidiendo la formación de un sitio de unión a calmodulina (CaM). La CaM está representada como una elipse naranja. **B.** Modelos del dominio 4 WT en color magenta unido a CaM (naranja). **C.** Modelo de la mutante T535 en el dominio 4 (monómero magenta) no unido a CaM. D5 (103 aminoácidos) se omitió y está representado como un fragmento verde oscuro.

6.11 Identificación de polimorfismos asociados a CAs

Diez variantes de un sólo nucleótido (SNVs) identificadas en casos con CAs y con mayor frecuencia reportada en las poblaciones latinas de ExAC Browser fueron seleccionadas para su genotipificación en 478 controles mexicanos y 51 casos con CAs, con la finalidad de determinar su posible asociación con CAs (**Tabla 6.13**). La variante *KCNQ1*-p.D446E (rs199472780) se encontró en 2 casos con SQT, mientras que estuvo ausente en controles del estudio GEA. Dicha diferencia tuvo significancia estadística bajo el modelo dominante ($p=0.00003$). Así mismo, las variantes: *RYR2*-p.H887P (rs561321743) y *CASQ2*-p.V76M (rs10801999) mostraron ser más frecuentes en casos con CAs vs controles; con una tendencia a la significancia bajo el modelo dominante y recesivo, respectivamente (**Tabla 6.14**). *CASQ2*-p.V76M se encontró más frecuentemente en casos con SQT ($n=13$), además de que los únicos 4 individuos homocigotos para este SNP también fueron casos con SQT. Para el resto de las SNVs no se encontraron diferencias significativas en las MAF entre casos y controles.

Tabla 6.13 SNVs frecuentes en población latinoamericana según ExAC Browser identificados en casos con CAs

ExAC								
	Latinos	Asia del este	Asia de sur	África	Europeos	Europeos de Finlandia	Otros	Global
<i>MYP3</i> -p.Q998E (rs11570112)	0.09 (90-1000; 4)	0.032 (43-1336; 2)	0.0008 (7-8214; 0)	0.0004 (1-2790; 0)	0.0002 (3-13064; 0)	0 (0-856; 0)	0 (0-240; 0)	0.005 (144-27500; 6)
<i>KCNQ1</i> -p.D446E (rs199472780)	0.0008 (9-11368; 1)	0 (0-8566; 0)	0 (0-16078; 0)	0 (0-9998; 0)	0 (0-65374; 0)	0 (0-6478; 0)	0 (0-876; 0)	0.0008 (9-118734; 1)
<i>MYH6</i> -p.M1431I (rs201016285)	0.018 (210-11576; 4)	0 (0-8654; 0)	0 (0-16512; 0)	0 (0-10406; 0)	0.00001 (1-66736; 0)	0 (0-6614; 0)	0.001 (1-908; 0)	0.0018 (212-121406; 4)
<i>RYR2</i> -p.H877P (rs561321743)	0.008 (88-10734; 0)	0 (0-7830; 0)	0 (0-14842; 0)	0 (0-9086; 0)	0.00001 (1-62042; 0)	0 (0-6420; 0)	0 (0-848; 0)	0.0008 (89-111802; 0)
<i>CASQ2</i> -p.V76M (rs10801999)	0.16 (1936-11578; 181)	0.06 (564-8638; 24)	0.011 (191-16512; 4)	0.002 (24-10406; 0)	0.002 (152-66740; 1)	0.02 (157-6614; 2)	0.02 (18-908; 0)	0.02 (3042-121396; 212)
<i>NOTCH1</i> -p.R1608H (rs76371972)	0.19 (380-1966; 3)	0 (0-2296; 0)	0.0002 (2-8600; 0)	0.001 (6-3264; 0)	0.001 (26-15460; 0)	0.007 (3-396; 0)	0.008 (2-230; 0)	0.013 (419-32212; 13)
<i>NOTCH1</i> -p.V2285I (rs61751489)	0.16 (1030-11432; 157)	0 (0-8522; 0)	0 (98-16472; 2)	0.006 (50-8982; 0)	0.01 (916-63410; 6)	0.006 (43-6490; 0)	0.018 (15-864; 0)	0.025 (2950-116172; 165)
<i>SCN5A</i> -p.V1951L (rs41315493)	0.042 (476-11148; 6)	0.003 (25-8272; 0)	0.002 (31-14932; 0)	0.004 (38-9602; 0)	0.0006 (43-64556; 0)	0.001 (7-6502; 0)	0.0083 (7-842; 0)	0.005 (627-115854; 6)
<i>CACNA1C</i> -p.R1889C (rs185788586)	0.07 (837-11494; 36)	0 (0-8592; 0)	0.0001 (13-16390; 0)	0.001 (11-9696; 0)	0.0006 (41-66264; 0)	0 (0-6604; 0)	0.006 (6-888; 0)	0.007 (898-119928; 36)
<i>TCAP</i> -p.R106C (rs45578741)	0.17 (1953-11200; 177)	0.0003 (3-8478; 0)	0.001 (29-16214; 1)	0.002 (22-9704; 0)	0.004 (245-62976; 0)	0.0001 (1-5992; 0)	0.008 (7-840; 0)	0.02 (2260-115404; 178)

Se muestra la frecuencia alélica de cada SNP (número de alelos raros identificados - número de alelos totales; número de individuos homocigotos).

Tabla 6.14 Frecuencia alélica de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en casos con CAs en casos y controles mexicanos del estudio GEA

	Controles GEA (n=480)				Casos CAs (n=51)				Modelo de herencia	
	Homo* (ancestral)	Het*	Homo* (alt.)	MAF* (HW)	Homo* (ancestral)	Het*	Homo* (alt.)	MAF* (HW)	Dominante (p)	Recesivo (p)
<i>MYPC3</i> -p.Q998E (rs11570112)	438	35	3	0.043	45	6	0	0.059	0.354	0.569
<i>KCNQ1</i> -p.D446E (rs199472780)	437	0	0	0	49	2	0	0.020	0.00003	1
<i>MYH6</i> -p.M1431I (rs201016285)	453	22	1	0.025	49	2	0	0.020	0.771	0.743
<i>RYR2</i> -p.H877P (rs561321743)	471	5	0	0.005	49	2	0	0.020	0.099	1
<i>CASQ2</i> -p.V76M (rs10801999)	343	118	14	0.154	33	14	4	0.216	0.259	0.068
<i>NOTCH1</i> -p.R1608H (rs76371972)	408	59	6	0.075	43	8	0	0.078	0.703	0.419
<i>NOTCH1</i> -p.V2285I (rs61751489)	350	109	14	0.145	36	14	0	0.140	0.760	0.218
<i>SCN5A</i> -p.V1951L (rs41315493)	438	35	0	0.037	46	4	0	0.040	0.878	1
<i>CACNA1C</i> -p.R1889C (rs185788586)	411	65	2	0.072	43	7	0	0.070	0.997	0.647
<i>TCAP</i> -p.R106C (rs45578741)	348	120	8	0.143	35	16	0	0.157	0.495	0.351

Homo (ancestral): Número de individuos homocigotos para el alelo ancestral o común; **Homo (alt.):** Número de individuos homocigotos para el alelo raro o alternativo; **Het:** Número de individuos heterocigotos; **MAF:** Frecuencia alélica del alelo menor; **HW:** Equilibrio de Hardy-Weinberg (calculada con una prueba de Pearson).

VII. DISCUSIÓN

7.1 El estudio de las CAs en México

Hasta hace pocos años, la mayoría de los estudios genéticos sobre CAs realizados en México consistían en el análisis de genes candidatos, usando DHPLC o secuenciación Sanger como método de identificación de variantes genéticas. Sin embargo, el índice de falsos negativos con DHPLC resulta mayor que con cualquier otro método; mientras que la secuenciación Sanger (con una tasa de error baja) limita el análisis a segmentos pequeños del genoma en cada proceso, convirtiéndola en una estrategia costosa que requiere mucho tiempo si se desea analizar un número importante de genes. En este contexto, algunos grupos en México han comenzado el estudio de enfermedades mendelianas a través de SNG, aunque en una alta proporción de casos la secuenciación y análisis de datos continúa realizándose fuera de nuestro país. Pese a ello, este estudio genético en pacientes mexicanos con CAs conforma el primer esfuerzo en este campo en realizarse en México. Así, el diseño de un *pipeline* informático para el análisis de exoma y genoma completo permitió generar una estrategia reproducible para la identificación de variantes implicadas en CAs y otras enfermedades cardíacas a partir de datos provenientes de cualquier plataforma y que fueron generados con distintas tecnologías de secuenciación.

En algunos centros de estudios genómicos el primer abordaje es la secuenciación del exoma/genoma. Sin embargo, en este trabajo la SNG sitio-dirigida mostró ofrecer ventajas como estrategia inicial. Primeramente, permitió obtener mayor profundidad (mayor número de lecturas de secuenciación) a un menor costo, y evitó el ruido genético que se obtiene con la secuenciación de exoma o genoma completo. Además, identificó mutaciones hasta en el 85% de los casos con SQTL y en más del 30% de los casos con SBr, similar a lo reportado en estudios de secuenciación de exoma o genoma completo en pacientes con CAs. Por otro lado, secuenciar un mayor número de genes no necesariamente aumenta las probabilidades de identificar genes causales nuevos (en este trabajo no se identificaron genes nuevos mediante secuenciación de genoma o exoma completo), a menos que exista una estructura familiar adecuada, con individuos afectados y no afectados, en donde pueda observarse co-segregación de una mutación sospechosa. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos no existe dicha estructura familiar, generando la necesidad de complementar los estudios genéticos con estudios

funcionales, que muchas veces son sólo relevantes si la función de la proteína es conocida en el contexto cardiaco. De hecho, desde 2006, la secuenciación del exoma solo ha permitido identificar 3 genes nuevos causales de CAs (*CALM1*, *CALM2* y *CALM3*) (Crotti *et al.* 2013; Reed *et al.* 2015). Pese a ello, puesto que la SNG sitio-dirigida identificó mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas en una proporción alta de casos, los casos no resueltos podrán ser analizados posteriormente con estrategias alternativas, como la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA, por sus siglas en inglés), que puede identificar inserciones o deleciones mayores a 150-200 pb que no son detectables mediante NGS.

Finalmente, la SNG permitió la resolución de un caso de MSI mediante autopsia genético-molecular en DNA obtenido de células de cordón umbilical, congeladas al momento del nacimiento; la identificación de familiares en riesgo de MS, y permitirá ofrecer opciones terapéuticas a los individuos en quienes se logró el diagnóstico genético. Adicionalmente, el análisis genético-molecular de pacientes con CAs identificó variantes comunes y raras que potencialmente asociadas a MSC y que podrían explicar la expresividad variable y penetrancia incompleta en familias portadoras., apoyando la hipótesis de que algunos casos de CAs tienen un origen oligogénico, que no serían resueltos mediante la búsqueda de variantes de alta penetrancia.

7.1.2 Epidemiología de las CAs en pacientes mexicanos

La enfermedad más frecuente entre los casos referidos en este estudio fue el SQTl-RW, consistente con la su elevada prevalencia (1:2,000 individuos) respecto a otras CAs en otras poblaciones del mundo (Priori *et al.*, 2015). Los casos de DNS de inicio temprano conformaron el segundo grupo de casos más grande (24%) en nuestro estudio, conformado por casos de inicio temprano con corazones estructurales normales, salvo por un caso con aurículas fibróticas. Los casos de SBr y TVPC fueron menos frecuentes, consistente con la baja prevalencia estimada para ambas enfermedades en otras poblaciones del mundo (alrededor de 1-12: 10,000 y 1: 10,000, respectivamente) (Sumitomo, 2016; Gourraud *et al.*, 2017). Sin embargo, la captación de pacientes con SBr quedó limitada por la existencia de otros protocolos en el INCICH enfocados al estudio genético de esta enfermedad en particular.

7.2 Espectro de mutaciones en casos con SQTL

El 79% de los casos con SQTL fue portador de una mutación en un gen causal de SQTL, clasificada como patogénica, potencialmente patogénica o VUS según los criterios de Campuzano *et al.* (2015b). Este rendimiento fue similar al reportado en estudios sobre grandes cohortes de casos con SQTL de origen caucásico-europeo, en los que el >90% de las mutaciones potencialmente causales suelen encontrarse en 3 genes: *KCNQ1* (SQTL tipo 1; 30-35%), *KCNH2* (SQTL tipo 2; 25-30%) y *SCN5A* (SQTL tipo 3; 5-10%) (Kapplinger *et al.*, 2009; Tester *et al.*, 2010). En comparación, en nuestro grupo de casos los genes causales de SQTL con mayor variación rara fueron: *KCNH2*, *KCNQ1*, *ANK2*, y *SCN5A*; llamando la atención la elevada frecuencia de variantes en *CACNA1C* y *AKAP9*, respecto a lo reportado en la literatura (**Figura 7.1**).

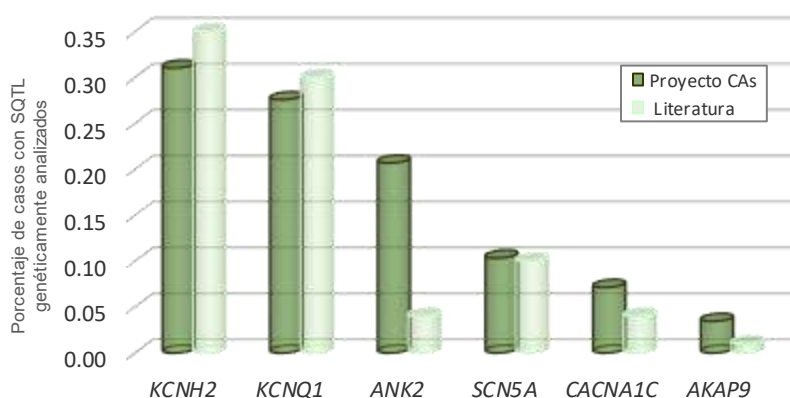


Figura 7.1 Distribución de mutaciones en genes reportados como causales de SQTL en este estudio (color oscuro) y en la literatura (color claro).

Aunque la clasificación de Campuzano resultó una herramienta útil en la determinación sistemática del efecto de algunas variantes, las mutaciones *KCNH2*-p.Q391X, *KCNH2*-p.A429GX y *KCNH2*-p.G546fs fueron clasificadas como VUS, aun cuando co-segregaron claramente con la enfermedad (en familias con varios individuos afectados). Esto estriba en que la mayoría de los programas de predicción computacionales disponibles están diseñados para el análisis de mutaciones de sentido erróneo, pero no se mutaciones sin sentido o InDels, por lo que éstas no pueden ser puntuadas adecuadamente. Así mismo, esta clasificación no hace distinción entre mutaciones de efecto dominante y recesivo; ni considera la posibilidad de penetrancia incompleta, lo que complicó la valoración de la patogenicidad de algunas variantes en casos potencialmente digénicos u oligogénicos (*i.e.* *SQTL-14*, *SQTL-19*).

Interesantemente, entre los genes no causales de SQT, *RYR2* fue el gen con mayor variabilidad genética entre casos con SQT; particularmente, entre los casos sin mutaciones en genes causales de SQT.

7.2.1 Posible nuevo gen de SQT: *RYR2*

El receptor de rianodina cardíaco RyR2 es uno de los canales iónicos más grandes en el genoma humano, conformado por 4,967 aminoácidos (codificados por 105 exones) (Kushnir & Marks, 2010). De acuerdo con ExAC Browser, *RYR2* es un gen aparentemente sujeto a *restricción genética*,² ya que alberga menos variación que la esperada al azar (Lek *et al.*, 2016). Sin embargo, en este estudio se encontró una mutación rara en *RYR2* de 6 casos con SQT-RW (**Figura 7.3**), lo que equivale a 20 veces más variación de la que se espera encontrar de acuerdo con ExAC Browser.

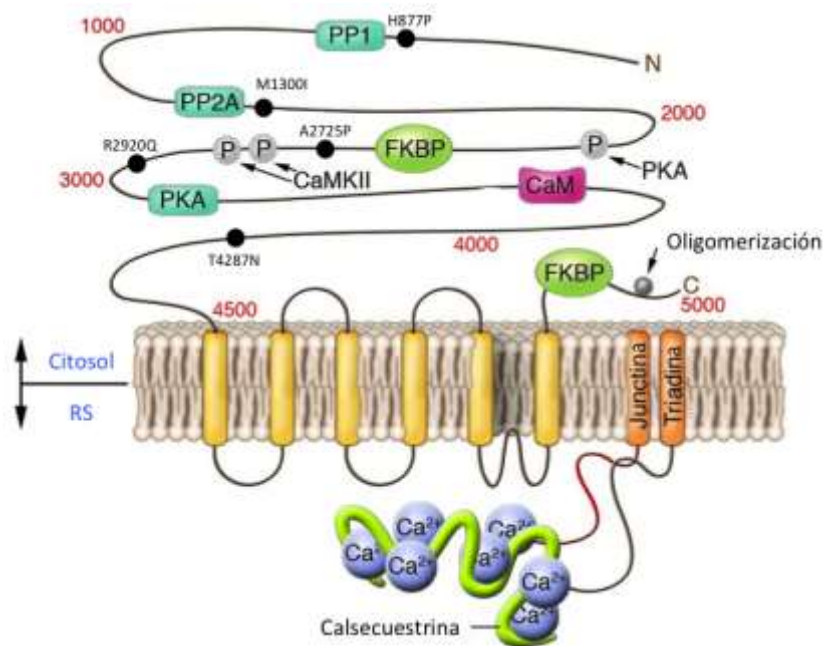


Figura 7.2 Mutaciones en RyR2 en pacientes mexicanos con SQT. Se muestran las mutaciones p.H887P, p.A2725P, p.R2920Q, p.T4287N y p.M1300T sobre la secuencia proteica del receptor de rianodina cardíaco, RyR2. Se omite la mutación g.237765412G>T identificada en un sitio donador de *splicing* del intrón 35. La figura no representa la estructura cuaternaria 3D descrita para el canal. **PP**: proteína fosfatasa, **P**: sitios de fosforilación, **CaM**: calmodulina, **CaMKII**: proteína quinasa II dependiente de calmodulina (Priori & Napolitano, 2005).

² La **restricción genética** se refiere a la intolerancia de un gen a la variación. Puede ser evidencia de un proceso de selección negativa y los genes que la presentan suelen tener mayor probabilidad de participar en enfermedades (Lek *et al.*, 2016).

RYR2 es el principal gen causal de TVPC, y se ha mostrado que la mayoría de las mutaciones en *RYR2* que causan TVPC se agrupan en 3 dominios o *hotspots* mutacionales: I (residuos 77-466), II (residuos 2246-2534) y III (residuos 3778-4959) (Medeiros-Domingo *et al.*, 2009). La mayor parte de estas mutaciones generan canales hipersensibles o hiperactivos (ganancia de la función en RyR2) que liberan Ca^{2+} de forma aberrante y espontánea, provocando post-despolarizaciones tardías; posiblemente como resultado del efecto despolarizante del intercambiador NCX (que transporta 3Na^+ al interior de la célula por cada Ca^{2+} extruido) (Zhao *et al.*, 2015).

En contraste, los cardiomiocitos ventriculares obtenidos de ratones transgénicos que portan la mutación RyR2-A4860G^{+/-} (la única mutación causal de TVPC con efecto de pérdida de la función) presentan un PA prolongado bajo estimulación adrenérgica (con isoproterenol: 300 nmol L^{-1}) (Zhao *et al.* 2014). Pese a ello, *RYR2* no está considerado un gen causal de SQTl, aunque su posible papel en la fisiopatología del SQTl es aún materia de debate (Kushnir & Marks, 2010; Nakano & Shimizu, 2016).

En los últimos años, 3 casos con diagnóstico de SQTl portadores de una mutación potencialmente dañina en *RYR2* (p.V4299M, p. p.K4594Q y p. p.K4594Q), resultaron negativos para mutaciones en genes causales de SQTl (Kaufenstein *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2015; Taniguchi *et al.*, 2017). Adicionalmente, Watanabe *et al.* (2016) reportó un caso de TVPC con valores de QTc prolongado tras la administración de epinefrina, portador de la mutación en *RYR2*-p.T2390I). Finalmente, los estudios en modelos de SQTl en conejos transgénicos (mutantes en *KCNQ1*) han mostrado que los canales RyR2 hiperactivos aumentan el índice de TVs polimórficas (Carter *et al.*, 2011; Ginsburg *et al.*, 2013; Terentyev *et al.*, 2014).

A la fecha ninguna mutación en *RYR2* en pacientes con SQTl ha sido estudiada funcionalmente, ni se ha estudiado su efecto directo sobre el PA cardíaco o el QTc. Sin embargo, en este trabajo se estudió el efecto funcional de la mutación *RYR2*-p.R2920Q, identificada en el caso *SQTl-25* (quien aparentemente no es portadora de otras mutaciones en genes causales de SQTl). De acuerdo con los ensayos de unión a [H^3]-rianodina, la mutación p.R2920Q genera canales hipersensibles al Ca^{2+} citosólico en comparación a los canales WT; sin que este efecto esté relacionado con alteraciones en la expresión del canal. Adicionalmente, los estudios preliminares realizados por el Dr.

Valdivia y la Dra. Valdivia en la Universidad de Michigan han revelado que los cardiomiocitos derivados de células madre pluripotenciales transfectadas con mR_{YR2}-p.R2920R tienen un PA más prolongado que el de aquellas no transfectadas o transfectadas con el mR_{YR2}-WT (datos no publicados), apoyando la noción de que R_{YR2} podría participar en la patogénesis del SQTL.

Por otro lado, aunque hasta ahora no hemos estudiado el efecto funcional del resto de las mutaciones en R_{YR2} identificadas en pacientes con SQTL sin mutaciones en genes causales de SQTL, hay algunas consideraciones de interés. La mutación p.T4287N (identificada en el caso *SQTL-23* con un QTc=621 ms) está localizada cerca de la mutación R_{YR2}-p.V4299M reportada en un caso inequívoco de SQTL-RW (ambas en el en el tercer *hotspot* de RyR2) (Kaufenstein *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2015). Por otro lado, la mutación R_{YR2}-p.M1300I identificada en el caso *SQTL-24* (sin mutaciones aparentes en genes causales de SQTL) está localizada fuera de los *hotspots* de RyR2 causales de TVPC, por lo que será interesante determinar si otros dominios de RyR2 tienen un papel fisiopatológico. Finalmente, será interesante explorar el efecto de variantes comunes en R_{YR2} asociadas a fenotipos arritmogénicos, pues algunas variantes en R_{YR2} se han asociado a la liberación de Ca²⁺ y TdP de corta duración (Fujii *et al.*, 2017); y la variante R_{YR2}-p.H887P (rs561321743) identificada en el 1.6% (80 de 5,367) de la población latina de ExAC Browser fue más frecuente en casos con SQTL vs controles mexicanos con una tendencia a la significancia bajo el modelo dominante ($p=0.099$).

7.2.2 Posible nuevo gen de SQTL: BAG3

La variante p.Q251X en *BAG3* (gen causal de miocardiopatía dilatada) se encontró en el caso *SQTL-14*. Esta paciente también era portadora homocigota de la variante ANK2-p.E1458G (rs72544141), que fue la primera variante en ANK2 considerada causal de SQTL (Mohler *et al.*, 2003; Schott *et al.*, 1995). Sin embargo, en nuestro estudio ningún familiar heterocigoto para ANK2-p.E1458G presentó alteraciones ECG importantes, sugiriendo que se trata de una variante con un efecto lo suficientemente discreto para causar SQTL en forma heterocigota (Priori *et al.*, 1998; Antúñez-Argüelles *et al.*, 2017).

Por otra parte, se sabe que las mutaciones en el gen *BAG3* causan miopatía fibrilar (MF) y miocardiopatía dilatada (MCD); y no está considerado como causal de SQTl (Lee *et al.*, 2012; Toro *et al.*, 2016). Sin embargo, Lee *et al.* (2012) reportaron el caso de un niño con un cuadro grave de MF, MCD y QTc prolongado (570 ms), portador de las variantes p.P209L y p.R258W en *BAG3*. Los antecedentes heredofamiliares del caso fueron reportados como poco notables, exceptuando que el padre tenía un QTc persistentemente prolongado (QTc máximo de 490 ms). Interesantemente, el padre resultó portador heterocigoto de la mutación *BAG3*-p.R258W.

A la fecha, todas las mutaciones sin sentido en *BAG3* (p.R90X,; p.R123X, y p.Q309X) causan MCD (Norton *et al.*, 2011; Chami *et al.*, 2014). Sin embargo, de acuerdo con estos hallazgos, es posible que *BAG3*-p.Q251X pueda jugar un papel relevante en la prolongación del intervalo QTc; aunque será necesario determinar si el SQTl de la paciente SQTl-14 se debe al efecto sumado de *BAG3*-p.Q251X y de *ANK2*-p.E1458G en ‘doble dosis’. A sus 37 años, la paciente *SQTl-14* no ha presentado trastornos miopáticos ni CMD. Sin embargo, debe considerarse que algunos portadores de mutaciones sin sentido en *BAG3* se han diagnosticado después de los 40 años, mientras que algunos polimorfismos se han asociado a miocardiopatías en individuos con >60 años (Citro *et al.*, 2013).

7.2.3 Posible hotspot mutacional en *KCNH2*

La mutación *KCNH2*-p.T613M (rs199473524) se identificó como causal de SQTl en la familia del caso *SQTl-11*. Esta mutación había sido identificada previamente en varias familias de ascendencia caucásico-europea y asiática; y se identificó como un evento mutacional *de novo* en un paciente ruso y otro latinoamericano, siendo una de las mutaciones más frecuentemente encontradas en pacientes con SQTl (Huang *et al.*, 2001; Ildarova *et al.*, 2012; Jongbloed *et al.*, 1999; Laitinen *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2009).

El análisis de ancestría global de *SQTl-11*, su hijo (portador de la mutación) y esposo mostró que los 3 individuos son mestizos (con un 51-60% de componente indígena, 36-42 % europeo y 4-8% africano); mientras que el análisis de ancestría local seguido de otro análisis de ancestría global sobre un subfragmento que incluye *KCNH2*-p.T613M,

mostraron que la mutación tiene una alta probabilidad de ser de origen maya, sugiriendo que se generó a través de un evento mutacional independiente al reportado en otras familias. En este contexto, se sabe que el 70-80% de las citosinas que forman parte de las islas CpGs en el genoma se encuentran metiladas, y que pueden desaminarse espontáneamente dando lugar a una timina (Cooper *et al.*, 2010; Sassa *et al.*, 2016). De acuerdo con ello, es posible que el cambio del codón aCg>aTg que genera el cambio p.T613M pueda ser causado por dicho fenómeno, lo que explicaría la alta prevalencia en casos con SQTL que son portadores de esta mutación.

7.3 Espectro de mutaciones en casos con DNS

Los casos de DNS conformaron el segundo grupo más grande (24%) en este estudio. Este grupo se constituyó por 13 casos diagnosticados a una edad temprana (<35 años). La DNS puede atribuirse a una gran variedad de enfermedades cardíacas, presentándose más comúnmente como un rasgo complejo en gente de mayor edad (>50 años) (de Marneffe *et al.*, 1993). Sin embargo, en familias con DNS de inicio temprano la enfermedad suele ser atribuible a mutaciones en genes que codifican canales iónicos (Benson *et al.*, 2003; Groenewegen *et al.* 2003; Lei *et al.* 2007; Schulze-Bahr *et al.* 2003; Smits *et al.* 2005; Veldkamp *et al.* 2003), lo cual es consistente con que el 75% de los casos con DNS de este estudio fueran portadores de una variante en un gen con un papel primordial en la función del NS: *SCN5A* y *HCN4* (Lei *et al.*, 2008; Bartos *et al.*, 2015).

Los genes *SCN5A* y *HCN4* se consideran los más prevalentes de DNS; siendo *SCN5A* el gen que más frecuentemente se reporta como causal (Ishikawa *et al.*, 2017). Actualmente, son pocos los estudios genéticos en series de casos con DNS de inicio temprano, y la mayor parte están dirigidos a la búsqueda de variación en *SCN5A*, probablemente debido al uso de la secuenciación capilar como método de detección de variación genética (**Tabla 7.1**). De acuerdo con estos estudios, las mutaciones en *SCN5A* explican hasta el 30-40% de los casos familiares o de inicio temprano con DNS; mientras que las mutaciones en *HCN4* explican sólo el 4% de los casos (Abe *et al.*, 2014; Benson *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2017). En comparación, en nuestro estudio el 69% de los casos resultó portador de variantes raras en *SCN5A*. En comparación, se encontró una frecuencia similar de casos con cambios en *HCN4* (8% de los casos). La

Tabla 7.1 Estudios genéticos en series de casos de DNS de inicio temprano reportados en la literatura

Estudio	Genes explorados	Estrategia de secuenciación	Hallazgos principales	Mutaciones identificadas	Frecuencia de mutaciones	Referencia
7 familias con bradicardia sinusal (4 <i>in utero</i>) e implantación de marcapasos. Los 4 casos <i>in utero</i> tenían defectos cardiacos congénitos (<i>i.e.</i> estenosis aórtica, estenosis pulmonar; síndrome de heterotaxia)	Región codificante e intrónica flanqueante de SCN5A	Secuenciación capilar Sanger	Identificación de 6 mutaciones (con heterocigocidad compuesta) en SCN5A en 3 familias. La edad de diagnóstico de los portadores fue 2-9 años.	En SCN5A : <ul style="list-style-type: none"> • G1408R + P1298L • R1632H (rs199473286) + T220I (rs45620037); • R1632H (rs199473286)+ F1617del 	43% en SCN5A	Benson et al. 2003
15 casos índice y familiares con DNS de origen japonés	Región codificante e intrónica flanqueante: SCN5A, HCN4, KCNQ1, KCNH2, KCNJ3, MYH6, GJA5 y IRX3	Secuenciación capilar Sanger	Identificación de 6 mutaciones en SCN5A en 5 familias. La expresión de la enfermedad en los portadores fue variable (<i>e.g.</i> asintomáticos; con DNS; con SQT, SBr o flutter auricular, sin DNS)	En SCN5A : <ul style="list-style-type: none"> • M1880V+ 801_803del/ins R219H • D1275N • L1786fsX2 • E1784K 	33% en SCN5A	Abe et al. 2014
Estudio en: <ul style="list-style-type: none"> • 2 familias con DNS y • 7 familias con alteraciones de la conducción 	246 cardiogenes	SNG en panel Agilent por diseño	Identificación de variantes reportadas como causales de enfermedades cardiacas, incluyendo la ECC en 3 pacientes sin DNS.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Paciente con bloqueo cardiaco completo (bloqueo AV 3° grado):</i> LDB3-D117N (rs121908338) + TRPM4-G844D (rs200038418) • <i>Paciente con Bloqueo AV:</i> TRPM4-G844D (rs200038418) + ABCC9-V734I (rs61688134) • <i>Paciente con bloqueo AV congénito:</i> SCN5A-T220I (rs45620037) + APOB-R3527Q (rs5742904) 	Ninguna mutación en los casos con DNS (diagnosticados antes de los 12 y 22 años)	Celestino-Soper et al., 2015b

Tabla 7.1 Estudios genéticos en series de casos de DNS de inicio temprano reportados en la literatura (continuación)

Estudio	Genes explorados	Estrategia de secuenciación	Hallazgos principales	Mutaciones identificadas	Frecuencia de mutaciones	Referencia
Estudio caso-control: 30 casos esporádicos de DNS vs 80 controles de población coreana. Los casos excluyeron pacientes con: <ul style="list-style-type: none"> • FA • FV • Flutter auricular • Bloqueo AV • SBr • Anormalidades cardíacas 	Región codificante (exón 2-28) de <i>SCN5A</i>	Secuenciación capilar Sanger	Identificación de 4 mutaciones raras (2 nuevas) en <i>SCN5A</i> . La edad promedio de los pacientes fue 55 ± 8.8 años (no se especifica el uso de marcapasos)	En <i>SCN5A</i> : <ul style="list-style-type: none"> • E1025D • D1275N • F1616Y • S1710L (rs137854604) 	13 % en <i>SCN5A</i>	Lee et al. 2016
535 casos con distintas CAs y MCPs, incluyendo 22 casos con DNS/FA.	Análisis genético dirigido al gen <i>ANK2</i>	SNG con panel de 46 cardiogenes; y exoma completo	La mutación <i>ANK2</i> -I1855R fue identificada en un hombre diagnosticado con DNS a los 44 años.	En <i>ANK2</i> : <ul style="list-style-type: none"> • I1855R 	4.5% en <i>ANK2</i>	Ichikawa, Et al. 2016
<ul style="list-style-type: none"> • 38 familias japonesas con DNS. 	Región codificante de: <i>SCN5A</i> , <i>LMNA</i> y <i>HCN4</i>	Secuenciación capilar Sanger	Se identificaron 2 mutaciones en <i>HCN4</i> en dos familias, y 3 mutaciones en <i>SCN5A</i> en 3 familias	En <i>HCN4</i> : <ul style="list-style-type: none"> • R393H • G482R En <i>SCN5A</i> : <ul style="list-style-type: none"> • N1354K • N1372R 	7.8 % en <i>SCN5A</i> 5.2% en <i>HCN4</i>	Ishikawa et al. 2017

mayor frecuencia de mutaciones en *SCN5A* en contraste con otras series reportadas podría deberse a los distintos criterios de inclusión/exclusión entre estudios (*e.g.* en el presente estudio fueron excluidos casos con alteraciones estructurales) y a la gravedad de nuestros casos (todos fueron portadores de un marcapasos/DAI, la mayoría a una corta edad). Sin embargo, esta frecuencia podría cambiar al aumentar el número de casos estudiados.

7.3.1 Espectro de mutaciones en casos de DNS de acuerdo a la edad de inicio

Los casos con mutaciones en *SCN5A* fueron diagnosticados a edades más tempranas (≤ 16 años) en comparación con el único portador de una mutación en *HCN4*, diagnosticado hasta los 31 años; lo cual resulta similar a lo reportado en otros estudios, donde los portadores de mutaciones en *HCN4* requieren la implantación de marcapasos a una edad más avanzada en comparación con los portadores de mutaciones en *SCN5A* (Ishikawa *et al.*, 2016; Macri *et al.*, 2014; Milano *et al.*, 2014; Schweizer *et al.*, 2014). Por otro lado, los portadores homocigotos compuestos de mutaciones en *SCN5A* con DNS suelen presentar síntomas durante en la primera década de la vida, consistente con la DNS temprana en *DNS-03*.

7.3.2 Fenotipos mixtos en portadores de mutaciones en *SCN5A*

La mayor parte de las mutaciones en *SCN5A* se localizaron en la región más distal del canal de Nav1.5, incluyendo el asa-P del dominio IV que forma parte del filtro de selectividad del canal de sodio (p.T1708N, p.S1710L y p.D1741fs) y la región C-terminal (p.A1778D) importante para la inactivación del canal (**Figura 7.3**). Notablemente, las mutaciones *SCN5A*-p.T1708N y *SCN5A*-p.S1710L (rs137854604) se encontraron en pacientes con otras CAs, sugiriendo que esta región podría estar implicada en el desarrollo de fenotipos mixtos (Abriel & Zaklyazminskaya, 2013).

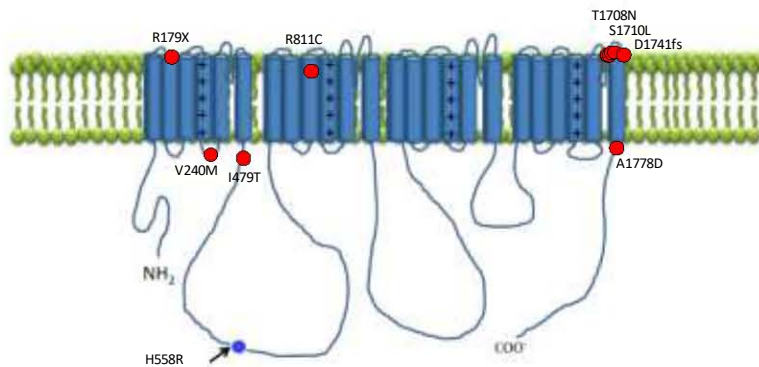


Figura 7.3 Mutaciones en *SCN5A* en pacientes con DNS. Se muestran los residuos mutados en Nav1.5 α (círculos rojos) y polimorfismo *SCN5A*-H558R se muestra como un círculo azul.

La mutación *SCN5A*-p.S1710L fue estudiada previamente y se determinó que causa alteraciones en la inactivación rápida, aumento en la inactivación lenta y un desplazamiento positivo de la activación (Sasaki, 2004). Por otro lado, el estudio electrofisiológico de la mutación p.T1708N en células HEK-293 reveló una importante reducción en la corriente al pico de sodio y un incremento de la I_{Na} tardía. Aunque alterando distintos parámetros electrofisiológicos del canal, ambas mutaciones tienen en común causar 2 efectos simultáneos aparentemente opuestos: 1) una importante reducción de la duración o intensidad de la I_{Na} al pico (disminución de la función); y 2) un incremento de la I_{Na} tardía o persistente (aumento de la función). Este mismo fenómeno fue previamente reportado para la mutación p.1795insD identificada en pacientes con fenotipos mixtos, que incluyen bradicardia, retraso en la conducción cardíaca, prolongación del intervalo QTc y elevación precordial de intervalo ST (Postema *et al.*, 2009; Remme *et al.*, 2006) Notablemente, la mutación p.1795insD también disminuye la I_{Na} al pico, pero aumenta la I_{Na} tardía lo que es suficiente para prolongar el QTc y causar SQTl; al mismo tiempo que produce un cambio negativo en la dependencia de voltaje de la inactivación, que se ha mostrado que provoca bradicardia y elevación en el ST y DNS en pacientes con Síndrome de Brugada (Portero *et al.*, 2017; Remme *et al.*, 2006).

Por otro lado, llamó la atención que los portadores de la mutación p.T1708N tienen un fenotipo mixto de presentación variable, incluyendo QTc prolongado, SBr o DNS incluso

entre portadores en la misma familia. Es posible que otras variantes pudieran explicar dicho comportamiento, por lo que será necesario estudiar la co-segregación de polimorfismos en genes de CAs en la familia, aunque en algunos casos sea complicado dado el enorme número de variantes en un solo individuo, identificadas en genes que codifican proteínas cardíacas de función desconocida en la actividad eléctrica del corazón. Pese a ello, se identificó una variante rara (p.M3111) en *ANK2* en el caso *SBr-01*, que podría contribuir al fenotipo de SBr en su portador, aunque es necesario llevar a cabo estudios electrofisiológicos para confirmarla.

Por otra parte, se sabe que el canal Nav1.5 se encuentra asociado a múltiples proteínas accesorias que regulan su función y localización (Veerman *et al.*, 2015). Especialmente, Nav1.5 interactúa con las subunidades β (pese a existir 4 isoformas, β 1-4). Las subunidades β pueden modular las propiedades biofísicas de Nav1.5, así como su densidad y localización en la membrana. Además, existen otras proteínas regulatorias como: 1) proteínas de anclaje/adaptadoras, que regulan el tránsito y anclaje del canal en dominios específicos de la membrana, como la ankirina-B que regula el tráfico de Nav1.5; 2) enzimas que interactúan y modifican la estructura del canal, como cinasas o ligasas de ubiquitina (modificadores post-transduccionales), la camodulina-cinasa II que fosforila a Nav1.5 y modula sus propiedades biofísicas (favorece cambios hiperpolarizantes de la curva de inactivación en el estado estable; enlentece la recuperación de la inactivación y aumenta la corriente tardía); y 3) proteínas que modulan las propiedades biofísicas del canal, como la caveolina-3. De hecho, las mutaciones en *CAV3* resultan en un incremento en la corriente tardía. Determinar la presencia de fenotipos mixtos de expresividad variable en una misma familia en casos con mutaciones en el canal Nav1.5 es complicado ya que su función y localización están altamente reguladas. Además, varios grupos de investigación han propuesto que la subunidad α de Nav1.5 podría ser parte de un complejo multiproteico compuesto por Nav1.5 y otras proteínas clasificadas en los 3 grupos antes mencionados, que regulan su expresión y función. Debido a lo anterior, el modelo experimental ideal para estudiar las mutaciones de Nav1.5 y otros canales iónicos son los cardiomiocitos derivados de células madre pluripotenciales de humano.

7.3.3 Posibles nuevos genes de DNS: *TRPM4* y *CAMK2A*

Debido a que son pocos los estudios genéticos en series de casos con DNS y en su mayoría se han dirigido al estudio de genes candidato (principalmente *SCN5A*) es posible que el espectro de mutaciones implicadas en esta enfermedad no esté completamente explorado. En contraste, en este estudio se analizaron >80 cardiogenes, permitiendo explorar otros genes nunca vinculados con la DNS, e identificar mutaciones raras en *TRPM4*, *CAMKII* y *TNNI* en los casos: *DNS-10* y *DNS-11*, en quienes no se identificó ninguna mutación en un gen considerado causal de DNS.

La mutación p.K914X (rs140799936) se encontró en un alelo de *TRPM4* del caso *DNS-10*. Este gen codifica un canal iónico despolarizante no selectivo activado por Ca^{2+} , altamente expresado en el corazón (Guinamard *et al.*, 2015). A la fecha, se han reportado >20 mutaciones en este gen que causan enfermedad de la conducción cardiaca y SBr (Launay *et al.*, 2002; Kruse *et al.*, 2009). Particularmente, *TRPM4*-p.K914X está reportada como causal de SBr y MS infantil. Esta mutación se encuentra dentro de un sitio de SUMOización³ altamente conservado; y se ha mostrado que disminuye la expresión del canal en la membrana, lo que resulta en la pérdida de su función (Stallmeyer *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). A pesar de que el efecto patogénico de *TRPM4*-p.K914X ha sido demostrado, no está claro cómo podría causar DNS en otros pacientes. Sin embargo, dado que *TRPM4* se expresa en el tejido nodal y conductivo, por lo que es probable que tenga un papel importante en la función del NS (Guinamard *et al.*, 2015).

Interesantemente, el caso *DNS-10* también presentó la variante rara *CAMK2A*-p.A483V (rs767783317), reportada en NCBI (ausente en ExAC Browser) sin asociación a un fenotipo particular. El gen *CAMK2A* codifica la cinasa CaMKII dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaM), que mediante su interacción con *TRPM4*, participa en la regulación de la ritmicidad con que las transientes de Ca^{2+} se generan en algunas células del sistema

³ SUMO (de sus siglas en inglés *small ubiquitin-like modifier*) es una pequeña proteína de aproximadamente 100 aminoácidos (unos 12 kDa) que modifica covalentemente a otras proteínas en las células de diversos organismos para regular un gran número de procesos biológicos (*e.g.* transcripción genética, ciclo celular, apoptosis, tráfico intracelular e intranuclear, y estabilidad de las proteínas) (Owerbach, McKay, Yeh, Gabbay, & Bohren, 2005).

nervioso central (Funk *et al.* 2013; Mironov, 2013). Dado que el manejo de Ca^{2+} es un importante contribuyente en la función de marcapasos del NS ('reloj de Ca^{2+}) y las mutaciones que alteran la concentración de Ca^{2+} se asocian con bradicardia sinusal, es posible que *TRPM4*-p.K914X pudiera tener un papel en la DNS gracias a su interacción con *CAMK2A*-p.A483V (Bartos *et al.*, 2015)., aunque será necesario llevar a cabo estudios funcionales adicionales que muestren el efecto de cada una de estas mutaciones y de su efecto conjunto.

7.4 Espectro de mutaciones en casos con SBr

La mayor parte (67%) de los casos con SBr en este estudio fue portador de una variante potencialmente patogénica en un gen causal de SBr. De acuerdo a lo reportado en la literatura sólo en el ~20-30% de los casos con SBr logra identificarse una mutación potencialmente causal del síndrome, lo que significa que el rendimiento de la prueba genética en este estudio fue mayor a lo esperado (Antzelevitch *et al.*, 2005).

Aun cuando el SBr está considerado una CA genéticamente heterogénea, la mayor parte (~95%) de las variantes potencialmente causales suelen encontrarse en *SCN5A* (Abriel & Zaklyazminskaya, 2013; Sarquella-Brugada *et al.*, 2015; Selga *et al.*, 2015). De manera similar, el 75% de las variantes potencialmente patogénicas identificadas en este estudio se localizaron en *SCN5A*; mientras que la variante restante se localizó en *SCN2B*, un gen causal de SBr poco frecuente (Selga *et al.*, 2015) (**Figura 7.4**).

Notablemente, entre los casos sin mutaciones en un gen causal de SBr, uno fue portador de una variante en *SNTA1*, un gen causal de SQT (tipo 12) (Wu *et al.*, 2008), y en *VCL*, un gen causal de miocardiopatía dilatada (Wells *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2015).

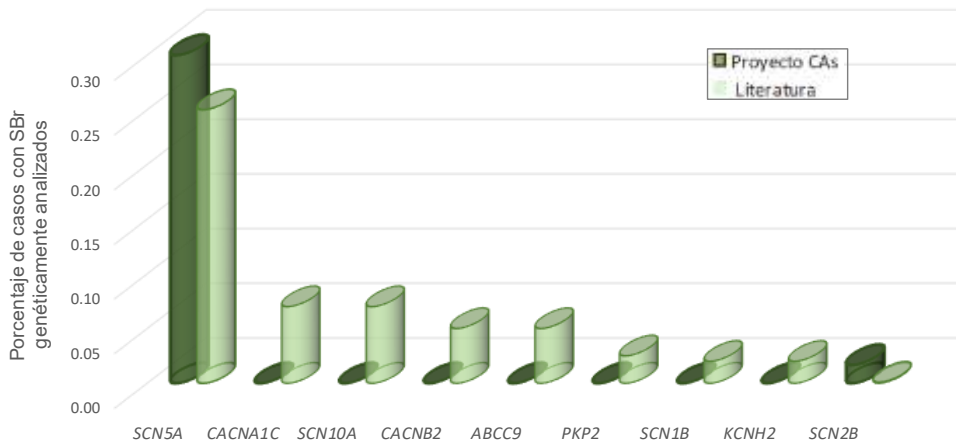


Figura 7.4 Distribución de mutaciones genes reportados como causales de SBr en este estudio (color oscuro) y en la literatura (color claro).

7.4.1 Posible nuevo gen de SBr: *SNTA1*

La variante *SNTA1*-p.R402W (rs373387978) se encontró en el caso *SBr-05*, quien aparentemente no es portador de otras mutaciones en genes causales del SBr. *SNTA1* codifica una proteína adaptadora de membrana o proteína sintrofina-1, que forma parte del complejo asociado a distrofina en células cardiacas y que media la interacción entre Nav1.5 y los complejos de óxido nítrico sintasa (nNOS) y ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA4b) (Ueda *et al.*, 2008). A la fecha, se han descrito más de una decena de mutaciones en *SNTA1*, todas causales de SQT (tipo 12), sin que ninguna haya sido reportada en pacientes con SBr (Cheng *et al.*, 2009; Remme *et al.* 2013).

En particular, la variante rara *SNTA1*-p.R402W (ExAC, MAF: 4.9×10^{-5}) ha sido previamente reportada en un caso con SQT del Hospital de Niños de Philadelphia, EUA (ClinVar del NCBI); aunque no ha sido estudiada funcionalmente, por lo que será necesario llevar a cabo este tipo de estudios para determinar su posible efecto patogénico. Pese a ello, se sabe que las mutaciones en *SNTA1* pueden alterar significativamente la I_{Na} pico y la I_{Na} tardía de Nav1.5 mediante la interacción del este canal con el complejo macromolecular nNOS-SNTA1-PMCA4b (Cheng *et al.*, 2009), por lo que resulta probable que *SNTA1*-p.R402W pudiera tener un efecto patogénico, lo que sitúa a *SNTA1* como un potencial gen nunca antes definido como causal de SBr.

7.5 Espectro de mutaciones en casos con TVs polimórficas

Los 2 casos con TVCP genéticamente estudiados en el presente trabajo fueron portadores de una mutación en *RYR2*, considerado el principal gen causal de TVPC. Ambas mutaciones se localizaron en uno de los 3 *hotspots* que albergan la mayor parte de las mutaciones causales de esta enfermedad, lo que sugiere que se tratan de mutaciones patogénicas (Medeiros-Domingo *et al.*, 2009). Con base en ello, puede decirse que el rendimiento de la prueba genética fue mayor a lo reportado en otros estudios, donde encuentran mutaciones putativamente patogénicas en el 50% de los casos con TVPC (Priori *et al.*, 2002; Tester *et al.*, 2004; Napolitano *et al.*, 2014; Mazzanti *et al.*, 2014). Sin embargo, es posible que el espectro de mutaciones pueda enriquecerse conforme se incluya un mayor número de casos más adelante.

El estudio genético de nuestros casos constituyó una valiosa herramienta para el diagnóstico definitivo de TVPC, en quienes la prueba de esfuerzo suele ser el recurso diagnóstico más útil durante la valoración clínica (Tanaka *et al.*, 2015). El caso *TVPC-01* fue el único portador de la mutación *RYR2*-p.G3946S en la familia, así como el único familiar sintomático (con TV bidireccional durante la prueba de esfuerzo), por lo que se consideró una mutación causal *de novo*. Esto permitió dar el consejo genético a los familiares y descartar riesgo de MS en éstos. Aunque no fue posible estudiar a la familia del caso *TVPC-02* (portador de la mutación *RYR2*-p.S408P), abrió la posibilidad de detectar a familiares en riesgo más adelante.

Las TVs monomórficas ocurren comúnmente en pacientes con enfermedad coronaria, infarto agudo del miocardio o miocardiopatías (*e.g.* dilatada, hipertrófica, chagásica). asociadas focos irritativos aislados, generalmente no atribuibles a defectos genéticos, sino más bien a defectos anatómicos. Sin embargo, en raras ocasiones suele ser causada por defectos en canales iónicos (Wolpert *et al.*, 2017). Aunque la falta de evidencia genética en este estudio no descarta una CA en *TVMC-01* (pues no se llevó a cabo el escrutinio del genoma completo), permitió hacer consideraciones sobre su tratamiento, limitándolo al uso de β -bloqueadores y descartándolo el DAI como primera línea de tratamiento.

7.6 La autopsia molecular en un caso de MSI: modelo de *Kv7.1/p.A300T/p.P535T*

La MS en un niño es un evento devastador, con importantes implicaciones médicas para los familiares sobrevivientes (Ackerman *et al.*, 2016). Debido a que la MSI puede ser la primera manifestación de una enfermedad cardíaca heredada desconocida, la autopsia molecular puede ser útil para determinar la causa de la muerte e identificar a los familiares en riesgo, para la adopción de estrategias preventivas (Semsarian *et al.*, 2015). A pesar de que las guías actuales forenses recomiendan la autopsia molecular como parte del protocolo de rutina en los casos de MS infantil, en México la autopsia molecular todavía no se incluye ni se ofrece como estándar de atención en los protocolos forenses. Enfrentando la devastación de la MS en una persona joven, no es raro que los padres o la familia rechacen una autopsia cuando es legalmente posible. Sin embargo, es mucho más fácil para ellos aceptar la toma de sangre o tejido de la víctima de MS cuando se ofrece esta posibilidad. Esto es particularmente importante dado el riesgo de las pruebas genéticas en familiares (y no directamente en la víctima de MS) (Ackerman *et al.*, 2016).

En este estudio, el análisis genético *post-mortem* reveló que una niña que sufrió MSI era heterocigótica compuesta para dos variantes de *KCNQ1* (p.A300T/p.P535T). *KCNQ1* es el principal gen causal de SQT, y se han reportado más de 500 mutaciones en *KCNQ1* que causan este síndrome (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, 1985). Las mutaciones heterocigotas *KCNQ1* causan el síndrome de Romano Ward de herencia dominante (SQT tipo 1), mientras que las mutaciones homocigotas o heterocigóticas compuestas en *KCNQ1* causan el síndrome Jervell Lange-Nielsen (JLN), una forma recesiva rara de SQT, caracterizada por una marcada prolongación del QTc y sordera neurosensorial congénita. Sin embargo, curiosamente algunos individuos con mutaciones en ambos alelos de *KCNQ1* se presentan sin sordera (síndrome recesivo de Romano Ward), lo que podría constituir un patrón de herencia de SQT más común de lo que se había anticipado previamente. Sin embargo, se ha sugerido que las personas con síndromes recesivos de SQT-RW deberían tratarse como un subgrupo de SQT con mayor riesgo de MS, al igual que sus contrapartes con SQT-JLN (Giudicessi & Ackerman, 2013). En este sentido, las mutaciones heterocigotas compuestas y el fenotipo severo observado en el caso

índice resultan compatibles con el síndrome de Romano Ward autosómico recesivo (Westenskow *et al.*, 2004).

La variante p.A300T ha sido reportada previamente como una variante con un efecto modesto que causa SQTl-RW sólo en el estado homocigoto; mientras que la variante p.P535T es nueva y clasificada como VUS según los criterios de Campuzano *et al.* (2015). La madre que era heterocigota para la variante p.P535T era asintomática y mostró una medición de QTc límitrofe. Sin embargo, con el ejercicio físico se identificaron anomalías de repolarización y el intervalo QTc se prolongó significativamente. De acuerdo con ello, se generaron modelos proteicos *in silico* que permitieran una mayor comprensión de los mecanismos que podrían causar una forma severa de SQTl-RW en la niña, y un cuadro más moderado de SQTl-RW en la madre.

Modelo Kv 7.1

Al igual que otros modelos reportados en la literatura es entre S5 y S6 forma el filtro de selectividad de iones (Grizel *et al.*, 2014; Taylor & Sanders, 2017).

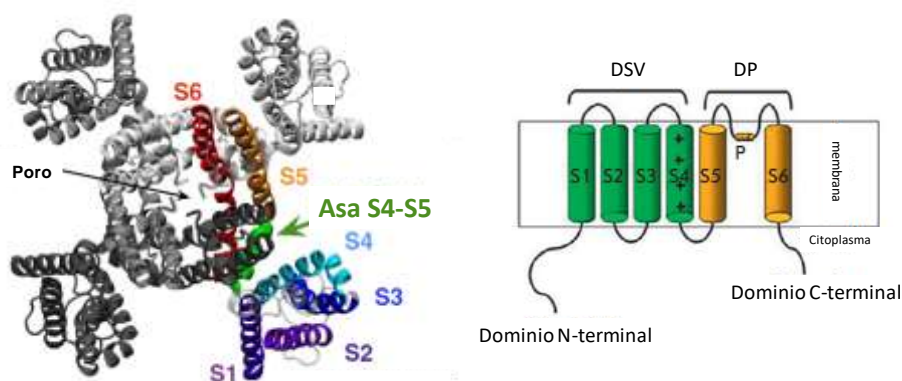


Figura 7.5 Estructura general de los canales Kv. **A.** Vista extracelular del canal Kv quimérico Kv1.2/2.1 en el estado abierto, mostrándose en color las hélices de un monómero **B.** Esquema de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α de un canal Kv genérico (Fowler & Sansom, 2013; Grizel *et al.*, 2014).

El dominio D4 de nuestro modelo correspondió a las hélices A y B intracelulares (previamente descritas por Wiener *et al.*, 2008) que forman un sitio de unión a CaM, mismo

que fue previamente cristalizado y descrito por Sachyani *et al.* (2014). El dominio D6 no se modeló, pero corresponde a las hélices C y D descritas por Sachyani *et al.* (2014), que forman una estructura *coiled-coil* tetramérica paralela (Howard *et al.*, 2007; Wiener *et al.*, 2008) (**Figura 7.6**).

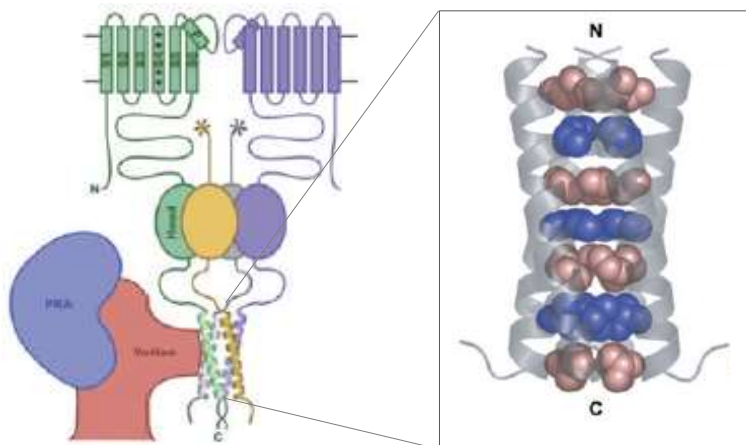


Figura 7.6 Modelo de interacción de las hélices C y D del dominio C-terminal de Kv7.1 propuesto por Howard *et al.* (2007) y Wiener *et al.* (2008.).

KCNQ1-p.A300T

La variante A300T fue descrita por primera vez como causal de una forma recesiva de SQT-LRW en un niño con audición normal que era homocigoto para la variante *KCNQ1-p.A300T*. Ambos padres eran portadores heterocigóticos A300T y tenían intervalos QTc normales, incluso después del ejercicio (Priori *et al.*, 1998). De acuerdo con ensayos de tinción inmunofluorescente se demostró que los canales homocigotos mutantes Kv7.1-T300 se transportan a la superficie celular (Bianchi *et al.*, 2000). Aunque la variante se ha considerado en la literatura como un cambio que provoca una ganancia en la función (GdF) (Kang *et al.*, 2008a; J. Smith, Vanoye, George, Meiler, & Sanders, 2007), el fenotipo electrofisiológico es de hecho mixto, mostrando una severa reducción en la corriente total, una mayor velocidad de activación a potenciales más negativos (*i.e.* curva de activación desplazada hacia la izquierda respecto a la del canal silvestre), por lo que la combinación de estas características hace que A300T sea en realidad una variante con un moderado efecto de pérdida de la función (Bianchi *et al.*, 2000; Priori *et al.*, 1998). De acuerdo con los

modelos previos de Kv7.1, nuestro modelo WT predijo la ubicación de A300 en el asa-P, que colindan con los residuos del segmento S1 de la subunidad adyacente (Kang et al., 2008b; J. A. Smith, Vanoye, George, Meiler, & Sanders, 2007). Estos modelos han predicho que A300T se encuentra dentro de una hendidura entre subunidades, que interactúa con la subunidad auxiliar KCNE1 (minK) del canal Kv7.1. Dicha interacción permite regular la actividad de Kv7.1 al: 1) retrasar su apertura, 2) dependencia al voltaje de la activación hacia potenciales más positivos, 3) incrementando la conductancia del canal y 4) suprimiendo la activación de inactivación de canal (Barhanin *et al.*, 1996; Lundby *et al.*, 2010; Sanguinetti *et al.*, 1996). Curiosamente, muchas variantes GdF se encuentran en esta hendidura, lo que sugiere que aumentan la función del canal al impedir la interacción de Kv7.1 con el dominio transmembrana de minK (Kang et al., 2008b; J. A. Smith et al., 2007). Sin embargo, en contraste con muchas variantes GdF que no están ubicadas en el asa-P y que aumentan la corriente en células completas (S140G, V141M, I274V) (Smith *et al.*, 2007), A300T disminuye severamente la corriente total (Bianchi *et al.*, 2000; Priori *et al.*, 1998).

La movilidad del DSV y DP es crucial en la activación dependiente del voltaje, que implica la activación del sensor de voltaje, la apertura de poro y el acoplamiento DSV y DP (Cui, 2016). De acuerdo con los análisis de movilidad, los nuevos puentes de hidrógeno que se predice que ocurrirán entre el residuo mutante T300 y los residuos S143/T144 afectarían gravemente la movilidad de los segmentos interhelicales S1-S2 del monómero adyacente y afectarían ligeramente la movilidad de los residuos que rodean T300. No está claro cómo estos cambios de movilidad se correlacionan con el fenotipo biofísico de esta variante, particularmente la disminución de la corriente. Sin embargo, está claro que el homotetramero T300, que es el único tipo de canal encontrado en un individuo homocigoto A300T, mostró el perfil de movilidad más gravemente afectado, muy similar al de los tetrameros formados por tres o dos mutantes T300 adyacentes. De manera interesante, los patrones de movilidad de los tetrameros que incluyeron dos cadenas T300 no adyacentes o solo una cadena fueron más similares al tetramero WT.

Kv7.1-p.P535T

Las consecuencias biofísicas de la variante p.P535T no se han caracterizadas, y se desconoce si el canal mutante p.T535 se expresa y alcanza la membrana celular. Nuestro modelo predijo que la presencia de una treonina en la posición 535 extendería la hélice B e interrumpiría la formación del sitio de unión a CaM por impedimento estérico. El módulo de unión a CaM parece tener una doble función: *a*) una función del sensor de calcio que afecta la activación del canal y estimula la función Kv7.1; y *b*) un papel en el plegamiento y el tráfico de canales (Ghosh et al., 2006; Haitin & Attali, 2008; Soldovieri *et al.*, 2011). Esto sugiere que las subunidades mutantes pueden tener defectos de co-ensamblaje o tráfico. Si este fuera el caso, la variante p.P535T en la madre causaría SCTL-RW por haploinsuficiencia. Además, en el niño heterocigótico compuesto, si solo las cadenas T300 mutantes se tetrámero, esto simularía un estado homocigótico p.A300T, que es compatible con su fenotipo severo. Nuestro modelo sugiere que la variante p.P535T tiene un efecto patogénico. Sin embargo, una importante limitación de nuestro trabajo es la necesidad de caracterizar el fenotipo biofísico de esta variante, tanto en presencia como en ausencia de Mink antes de llegar a conclusiones definitivas.

7.7 Polimorfismos comunes y raros asociados a SCTL

En la última década, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han permitido identificar al menos 35 *loci* que afectan la longitud del intervalo QTc (Arking *et al.*, 2014; Kapoor *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016), mientras que el análisis combinado de secuenciación de exoma y ligamiento identificaron una variante rara en *FCRL2*-(p.S238C, rs74608430) asociada a valores de QTc (Wieneke *et al.*, 2016). Por otro lado, la identificación de SNPs asociados a niveles patológicos de QTc en familias con mutaciones patogénicas podrían explicar la variabilidad en la expresividad y la penetrancia incompleta comúnmente observada entre portadores de estas familias (Refsgaard *et al.*, 2012).

En este estudio, se identificaron 10 variantes de un sólo nucleótido (SNVs) en casos con CAs, con mayor frecuencia alélica en poblaciones latinas de ExAC Browser. Entre éstas, 3 (*KCNQ1*-p.D446E, *CASQ2*-p.V76M, *RYR2*-p.H887P) fueron más frecuentes en casos de

SQTL vs controles (del estudio GEA: Villarreal-Molina *et al.*, 2012), las 2 últimas con tendencia a la significancia. Ningún estudio previo había asociado estas variantes con algún rasgo electrocardiográfico. Tratándose de variantes predominantemente latinas, estos hallazgos sugieren que la susceptibilidad al desarrollo de CAs (genética o adquirida) puede variar entre poblaciones; además de que aportan evidencia de que el intervalo QTc es un rasgo cuantitativo.

KCNQ1-p.D446E

La variante *KCNQ1-p.D446E* (c.C1338C>G; rs199472780) se encontró en 2 casos con SQTL (*SQTL-10* y *SQTL-19*); mientras que estuvo ausente en los controles mexicanos, siendo esta diferencia significativa bajo el modelo dominante ($p=0.0003$). Su presencia en 8 individuos de ExAC (MAF=0.008), evidencia que esta variante en la población excede la prevalencia del SQTL (1:2000 individuos), descartándola como una mutación causal. Sin embargo, aún es posible que esta variante *KCNQ1-p.D446E* tenga un efecto patogénico relevante:

Además de *KCNQ1-p.D446E*, el caso *SQTL-19* presentó 2 SNPs raros: *ANK2-p.G2221E* (rs185384934) y *SCN5A-p.V1951L* (rs41315493). La madre, asintomática hasta los 62 años y portadora de ambos SNPs, presentó trastornos inespecíficos de la repolarización (*i.e.* QTc limítrofe y alteraciones de la onda T); mientras que el padre y primos paternos, asintomáticos y portadores de *KCNQ1-p.D446E*, presentaron otros trastornos inespecíficos de la repolarización (*i.e.* elevación del punto J y repolarización precoz). En cambio, el caso *SQTL-19*, es portador de las 3 variantes y ha sufrido MSR y arritmias graves, lo que sugiere que *KCNQ1-p.D446E* participa en la prolongación del QTc. Sin embargo, será necesario llevar a cabo estudios funcionales que muestren su efecto.

CASQ2-p.V76M

CASQ2 es un gen que causa TVPC en forma recesiva (Faggioni *et al.*, 2012). De acuerdo con ello, la variante *CASQ2-p.V76M* (c.226G>A; rs10801999) mostró ser más frecuente en

casos con CAs vs controles, con una tendencia a la significancia bajo el modelo recesivo ($p=0.068$). Notablemente, los únicos portadores homocigotos de *CASQ2*-p.V76M ($n=4$) fueron pacientes con SQTL. Además, la frecuencia alélica de *CASQ2*-p.V76M fue del 2.16% en controles, 7.8% en todos los pacientes con CAs, y 13.8% en pacientes con SQTL, lo que sugiere que esta variante podría tener un papel en la duración del intervalo QT; aunque debe considerarse que es una muestra pequeña que debe ampliarse y complementarse con estudios funcionales de la variante.

RYR2-p.H887P

La variante p.*RYR2*-p.H887P (rs561321743) mostró ser más frecuente en casos con CAs vs controles (MAF=0.02), con una tendencia a la significancia bajo el modelo dominante ($p=0.099$). Esta variante está reportada casi exclusivamente en individuos latinos de ExAC Browser (MAF=0.0007) y a la fecha no se ha vinculado con ninguna patología según ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sin embargo, esta variante se identificó exclusivamente en pacientes con SQTL. Ya que algunos polimorfismos en *RYR2* han sido asociados previamente a alteraciones en la liberación de Ca^{2+} y algunas mutaciones en *RYR2* se han identificado en pacientes con diagnóstico inequívoco de SQTL (Fujii *et al.*, 2017), es posible que p.*RYR2*-p.H887P pudiera estar asociado al SQTL. Sin embargo, será necesario ampliar en número de casos para determinar una asociación es significativa.

7.8 Retos y Perspectivas en el Diagnóstico Genético-Molecular de las CAs

Hace 2 décadas, los estudios de ligamiento permitieron identificar un gran número de genes causales de CAs; mientras que la secuenciación capilar de genes candidato abrió la posibilidad de describir un amplio espectro de mutaciones potencialmente causales (Kapplinger *et al.*, 2009). Más adelante se pensó que la SNG sería ideal en la identificación de nuevos genes, ya que permite secuenciar todo el exoma o genoma en un sólo ensayo (Desai & Jere, 2012). Sorprendentemente, en la última década la secuenciación de exoma reveló sólo 3 genes nuevos que causan CAs (*CALMI-3*); sin mejorar sustancialmente el rendimiento de las pruebas genéticas preexistentes (*i.e.* sólo resuelve el 80-85% de los

casos con SQTL, el 30-70% de los casos con SBr y el 50-100% de los casos con TVPC) (Crotti *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2015). Esto podría tener al menos 4 posibles explicaciones:

- a) *Limitaciones de las herramientas de secuenciación.* Primeramente, al igual que cualquier método de análisis, la SNG puede generar resultados falsos negativos. Así, en algunos casos de nuestro estudio no se encontraron mutaciones con DHPLC o SNG sitio-dirigida, pero se encontraron mutaciones en genes causales conocidos de Cas cuando se reanalizaron con otros paneles o con secuenciación de exoma o genoma completo. En segundo lugar, la SNG no permite identificar grandes deleciones, inserciones o rearrreglos estructurales. De acuerdo con ello, en un estudio subsecuente realizado por nuestro grupo de trabajo logró identificarse una inserción grande en el gen *SCN5A* del caso *SQTL-28* mediante la técnica de MLPA.
- b) *Limitaciones en el conocimiento del genoma.* En general, se considera que el 85% de las mutaciones que causan enfermedades mendelianas ocurren en zonas codificantes (Chong *et al.*, 2015; Jamuar & Tan, 2015). Desafortunadamente por falta de conocimiento de la biología de las zonas no codificantes, no se tienen herramientas para interpretar las consecuencias funcionales de variantes en zonas intrónicas o de regiones promotoras que pudieran causar enfermedades mendelianas. Será importante incluir estas zonas durante el análisis de secuenciación, intergrando el conocimiento generado por proyectos como ENCODE (*ENCyclopedia Of DNA Elements*, The ENCODE Project Consortium) para poder en un futuro poder identificar mutaciones potencialmente causales en estas regiones.
- c) *Complejidad genética de las CAS.* La estrategia de diagnóstico genético-molecular generalmente se limita a la búsqueda de mutaciones de alta penetrancia. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los reportes que sugieren mayor complejidad genética en las CAs y la existencia de casos digénicos u oligogénicos (Gunel *et al.*, 2016). Sin embargo, mostrar la complejidad genética de un caso con CA puede requerir el estudio funcional de numerosas variantes, en ocasiones en modelos *in vitro* complejos (*i.e.* cardiomiocitos derivados de células madre de pacientes con CAs) lo que puede limitar su estudio. Además, variantes comunes en genes causales de CAs podrían contribuir al fenotipo, agravando o modulando la expresividad de la enfermedad. Estas variantes

deben ser identificados mediante enfoques alternativos, como los estudios de asociación caso-control a una CA, los estudios de asociación a rasgos electrocardiográficos en la población abierta, o los análisis de variación genética en fenotipos extremos.

- d) *La mayor parte de los genes causales han sido identificados.* Es posible que tras un análisis genético más completo, se encuentre que sólo una proporción menor de casos sean causados por genes nunca antes implicados en las CAs. En este trabajo, encontramos varios casos con mutaciones en genes nunca antes implicados en la enfermedad del paciente. Sin embargo, dichos genes habían sido previamente reportados como causales de otras CAs o miocardiopatías arritmogénicas, lo que sugiere que el análisis genético debe extenderse a un mayor número de genes, siempre y cuando se hayan agotado mutaciones en genes conocidos.

Por último, es importante mencionar que el estudio funcional y de segregación es fundamental para un diagnóstico genético-molecular certero. Los genes que codifican proteínas esenciales en la función eléctrica cardíaca (y que se ha mostrado causan MSC) pueden albergar variación neutral o no patogénica; lo que muestra que la identificación de una variante rara no implica un diagnóstico definitivo, y asumir equivocadamente que una variante es causal podría impactar negativamente un paciente o a sus familiares (Ackerman *et al.*, 2016; Klassen *et al.*, 2011). Sin embargo, los estudios funcionales pueden ser costosos, tardados y difíciles de llevar a cabo dada la naturaleza y función de la proteína; y no todas las instituciones que realizan el diagnóstico genético tienen acceso al estudio funcional. Una alternativa, es analizar el posible efecto de algunas mutaciones mediante su modelación *in silico*, lo que permitiría obtener un panorama general del efecto de varias mutaciones para optimizar el diagnóstico genético-molecular.

VIII. CONCLUSIONES

- La secuenciación de nueva generación *sitio-dirigida* es una herramienta útil en la detección de mutaciones causales y potencialmente causales de CAs y MSC, cuyo rendimiento diagnóstico en pacientes mexicanos fue similar al reportado en otras poblaciones.
- La secuenciación del genoma completo o del exoma completo en 6 familias donde la SNG sitio-dirigida no había identificado mutaciones potencialmente causales de CAs permitió identificar mutaciones en genes conocidos como causales de MSC (*KCNH2*, *KCNQ1*, *SCN5A*, *SCN2B* y *ANK2*) en 5 de estas familias.
- El análisis del espectro de mutaciones reveló que el gen *RYR2* podría estar implicado en el SQTL además de la TVPC; que el gen *SNTA1* podría estar implicado en el SBr; y que los genes *TRPM4* y *CAMK2A* podrían estar implicados en la DNS.
- Los estudios funcionales *in vitro* apoyaron la causalidad de las mutaciones *RYR2*-R2920Q y *SCN5A*-p.T1708N en el SQTL y la DNS, respectivamente. La mutación *RYR2*-p.R2920 identificada en un paciente con SQTL-RW causó un aumento en la sensibilidad de la proteína al calcio. Esto demuestra que la mutación sí afecta la función, aunque se necesitan otros experimentos para asegurar que causa prolongación del intervalo QT.
- Las 3 variantes *KCNQ1*-p.D446E, *CASQ2*-p.V76M y *RYR2*-p.H887P se asociaron con SQTL en un abordaje de casos y controles, lo que sugiere que podrían jugar un papel en la duración del intervalo QTc en la población mexicana.
- Aunque la mayoría de los casos con CAs se consideran desórdenes monogénicos es posible que algunos casos sean causados por la interacción de mutaciones patogénicas con diferentes polimorfismos raros y/o comunes, lo que explicaría la expresividad variable que suele observarse en pacientes con CAs.
- La SNG permitió el diagnóstico de SQTL mediante autopsia molecular en un caso de MSI. Casi un año después de la muerte, se identificaron las mutaciones p.A300T y p.P535T en el gen *KCNQ1* en DNA extraído de células de cordón umbilical

almacenadas en un banco biológico al nacimiento. Esto permitió: 1) el diagnóstico *post-mortem* del caso, 2) la identificación de familiares en riesgo de MS, y 3) el consejo genético para esta familia.

- La revisión de la literatura, la segregación y el modelo de proteínas sugieren fuertemente que esta niña se vio afectada con una forma recesiva del síndrome de Ward de Romano. En particular, el modelo mostró que la mutación A300T altera de manera muy significativa la movilidad del tetrámero KCNQ1, mientras que la mutación P535T altera un sitio de unión a calmodulina.

IX. PERSPECTIVAS

1. Ampliar el estudio funcional de las mutaciones *SCN5A*-p.T1708N y *RYR2*-R2920Q; y comenzar el estudio funcional de otras mutaciones identificadas no previamente estudiadas.
2. Complementar el estudio funcional de las mutaciones con modelaje *in silico* de proteínas.
3. Ampliar el estudio genético de los casos en los que no se identificó una mutación, con otras técnicas moleculares, tales como: 1) MLPA (*multiple ligation-dependent probe amplification*), que permite identificar deleciones o inserciones > 150pb; 2) análisis *in silico* de regiones no codificantes; 3) estudios de ligamiento en familias candidato, y 4) continuar con la secuenciación de exoma o genoma completo en familias con una estructura adecuada.
4. Caracterización farmacológica *in vitro* de las mutaciones identificadas, con la intención de encontrar información útil para llevar a cabo abordajes de medicina personalizada.
5. Complementar el estudio funcional con un modelo en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotenciales de humano y/o de pacientes con CAs, que permite explorar el efecto de una mutación directamente sobre el PA cardiaco.

X. REFERENCIAS

- Abe, K., Machida, T., Sumitomo, N., Yamamoto, H., Ohkubo, K., Watanabe, I., ... Makita, N. (2014). Sodium Channelopathy Underlying Familial Sick Sinus Syndrome With Early Onset and Predominantly Male Characteristics. *Clinical Perspective. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 7(3), 511–517. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.001340>
- Abriel, H., & Zaklyazminskaya, E. V. (2013). Cardiac channelopathies: Genetic and molecular mechanisms. *Gene*, 517(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.061>
- Ackerman, J. P., Bartos, D. C., Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Delisle, B. P., & Ackerman, M. J. (2016). The Promise and Peril of Precision Medicine: Phenotyping Still Matters Most. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(11), 1606–1616. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.08.008>
- Ackerman, M. J. (2009). State of Postmortem Genetic Testing Known as the Cardiac Channel Molecular Autopsy in the Forensic Evaluation of Unexplained Sudden Cardiac Death in the Young. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 32, S86–S89. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2009.02393.x>
- Ackerman, M. J. (2015). Genetic purgatory and the cardiac channelopathies: Exposing the variants of uncertain/unknown significance issue. *Heart Rhythm*, 12(11), 2325–2331. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.07.002>
- Adan, V., & Crown, L. A. (2003). Diagnosis and Treatment of Sick Sinus Syndrome. *American Family Physician*, 67(8), 1725–1732.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., ... Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), nmeth0410–248 – 248. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., ... Searle, S. M. J. (2016). The Ensembl gene annotation system. *Database*, 2016. <https://doi.org/10.1093/database/baw093>
- Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19(9), 1655–1664. <https://doi.org/10.1101/gr.094052.109>
- Al-Khatib, S. M., Stevenson, W. G., Ackerman, M. J., Bryant, W. J., Callans, D. J., Curtis, A. B., ... Page, R. L. (2017). 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Journal of the American College of Cardiology*, 24390. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.10.054>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

- Amin, A. S., Asghari-Roodsari, A., & Tan, H. L. (2010). Cardiac sodium channelopathies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *460*(2), 223–237. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0761-0>
- Amin, A. S., Pinto, Y. M., & Wilde, A. A. M. (2013). Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *The Journal of Physiology*, *591*(Pt 17), 4125–4139. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.254920>
- Antúnez-Argüelles, E., Rojo-Domínguez, A., Arregui-Mena, A. L., Jacobo-Albavera, L., Márquez, M. F., Iturralde-Torres, P., & Villarreal-Molina, M. T. (2017). Compound heterozygous KCNQ1 mutations (A300T/P535T) in a child with sudden unexplained death: Insights into possible molecular mechanisms based on protein modeling. *Gene*, *627*(Supplement C), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.011>
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., ... Wilde, A. (2005). Brugada Syndrome: Report of the Second Consensus Conference. *Circulation*, *111*(5), 659–670. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000152479.54298.51>
- Arimura, T., Ishikawa, T., Nunoda, S., Kawai, S., & Kimura, A. (2011). Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Human Mutation*, *32*(12), 1481–1491. <https://doi.org/10.1002/humu.21603>
- Arking, D. E., Pulit, S. L., Crotti, L., Harst, P. van der, Munroe, P. B., Koopmann, T. T., ... Newton-Cheh, C. (2014). Genetic association study of QT interval highlights role for calcium signaling pathways in myocardial repolarization. *Nature Genetics*, *46*(8), ng.3014. <https://doi.org/10.1038/ng.3014>
- Arzamendi, D., Benito, B., Tizon-Marcos, H., Flores, J., Tanguay, J. F., Ly, H., ... Brugada, R. (2011). Increase in sudden death from coronary artery disease in young adults. *American Heart Journal*, *161*(3), 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2010.10.040>
- Boron W.F., Boulpaep E.L. (2009). *Medical Physiology*. 2nd edition. Saunders Elsevier. Canada, pp1337.
- Bagnall, R. D., Weintraub, R. G., Ingles, J., Dufrou, J., Yeates, L., Lam, L., ... Semsarian, C. (2016). A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults. *New England Journal of Medicine*, *374*(25), 2441–2452. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510687>
- Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., & MacKinnon, R. (2013). Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. *eLife*, *2*. <https://doi.org/10.7554/eLife.00594>
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., & Romey, G. (1996). KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the IKs cardiac potassium current. *Nature*, *384*(6604), 384078a0. <https://doi.org/10.1038/384078a0>
- Bazett HC. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920; 7:353–370

- Bartos, D. C., Grandi, E., & Ripplinger, C. M. (2015). Ion Channels in the Heart. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1423–1464. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140069>
- Benson, D. W., Wang, D. W., Dymont, M., Knilans, T. K., Fish, F. A., Strieper, M. J., ... George, A. L. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *Journal of Clinical Investigation*, 112(7), 1019–1028. <https://doi.org/10.1172/JCI200318062>
- Berne, P., & Brugada, J. (2012). Brugada Syndrome 2012. *Circulation Journal*, 76(7), 1563–1571. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0717>
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>
- Bharati, S., Surawicz, B., Vidaillet, H. J., & Lev, M. (1992). Familial congenital sinus rhythm anomalies: clinical and pathological correlations. *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE*, 15(11 Pt 1), 1720–1729.
- Bianchi, L., Priori, S. G., Napolitano, C., Surewicz, K. A., Dennis, A. T., Memmi, M., ... Brown, A. M. (2000a). Mechanisms of I Ks suppression in LQT1 mutants. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279(6), H3003–H3011.
- Bianchi, L., Priori, S. G., Napolitano, C., Surewicz, K. A., Dennis, A. T., Memmi, M., ... Brown, A. M. (2000b). Mechanisms of I Ks suppression in LQT1 mutants. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279(6), H3003–H3011.
- Brisbin, A., Bryc, K., Byrnes, J., Zakharia, F., Omberg, L., Degenhardt, J., ... Bustamante, C. D. (2012). PCAdmix: Principal Components-Based Assignment of Ancestry Along Each Chromosome in Individuals with Admixed Ancestry from Two or More Populations. *Human Biology*, 84(4), 343–364. <https://doi.org/10.3378/027.084.0401>
- Campuzano, O., Allegue, C., Fernandez, A., Iglesias, A., & Brugada, R. (2015). Determining the pathogenicity of genetic variants associated with cardiac channelopathies. *Scientific Reports*, 5, 7953. <https://doi.org/10.1038/srep07953>
- Campuzano, O., Allegue, C., Partemi, S., Iglesias, A., Oliva, A., & Brugada, R. (2014). Negative autopsy and sudden cardiac death. *International Journal of Legal Medicine*, 128(4), 599–606. <https://doi.org/10.1007/s00414-014-0966-4>
- Carter, S., Pitt, S. J., Colyer, J., & Sitsapesan, R. (2011). Ca²⁺-Dependent Phosphorylation of RyR2 Can Uncouple Channel Gating from Direct Cytosolic Ca²⁺ Regulation. *The Journal of Membrane Biology*, 240(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9339-9>
- Celestino-Soper, P. B. S., Doytchinova, A., Steiner, H. A., Uradu, A., Lynnes, T. C., Groh, W. J., ... Vatta, M. (2015). Evaluation of the Genetic Basis of Familial Aggregation of Pacemaker Implantation by a Large Next Generation Sequencing Panel. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143588>
- Chami, N., Tadros, R., Lemarbre, F., Lo, K. S., Beaudoin, M., Robb, L., ... Lettre, G. (2014). Nonsense Mutations in BAG3 are Associated With Early-Onset Dilated Cardiomyopathy in

- French Canadians. *Canadian Journal of Cardiology*, 30(12), 1655–1661. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.09.030>
- Cheng, J., Norstrand, D. W. V., Medeiros-Domingo, A., Valdivia, C., Tan, B., Ye, B., ... Ackerman, M. J. (2009). α 1-Syntrophin Mutations Identified in Sudden Infant Death Syndrome Cause an Increase in Late Cardiac Sodium Current. *Clinical Perspective. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(6), 667–676. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.891440>
- Cheung, C. C., Laksman, Z. W. M., Mellor, G., Sanatani, S., & Krahn, A. D. (2016). Exercise and Inherited Arrhythmias. *The Canadian Journal of Cardiology*, 32(4), 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.01.007>
- Chong, J. X., Buckingham, K. J., Jhangiani, S. N., Boehm, C., Sobreira, N., Smith, J. D., ... Bamshad, M. J. (2015). The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *The American Journal of Human Genetics*, 97(2), 199–215. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.06.009>
- Choudhury, M., Boyett, M. R., & Morris, G. M. (2015a). Biology of the Sinus Node and its Disease. *Arrhythmia & Electrophysiology Review*, 4(1), 28–34. <https://doi.org/10.15420/aer.2015.4.1.28>
- Citro, R., d'Avenia, M., Marco, M. D., Giudice, R., Mirra, M., Ravera, A., ... Piscione, F. (2013). Polymorphisms of the antiapoptotic protein bag3 may play a role in the pathogenesis of tako-tsubo cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, 168(2), 1663–1665. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.03.050>
- Cock, P. J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1767–1771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>
- Consortium, T. 1000 G. P. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061–1073. <https://doi.org/10.1038/nature09534>
- Cooper, D. N., Mort, M., Stenson, P. D., Ball, E. V., & Chuzhanova, N. A. (2010). Methylation-mediated deamination of 5-methylcytosine appears to give rise to mutations causing human inherited disease in CpNpG trinucleotides, as well as in CpG dinucleotides. *Human Genomics*, 4(6), 406–410.
- Crotti, L., Celano, G., Dagradi, F., & Schwartz, P. J. (2008). Congenital long QT syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3, 18. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-18>
- Crotti, L., Johnson, C. N., Graf, E., Ferrari, G. M. D., Cuneo, B. F., Ovidia, M., ... George, A. L. (2013). Calmodulin Mutations Associated With Recurrent Cardiac Arrest in Infants. *Clinical Perspective. Circulation*, 127(9), 1009–1017. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001216>
- de Marneffe, M., Gregoire, J. M., Waterschoot, P., & Kestemont, M. P. (1993). The sinus node function: normal and pathological. *European Heart Journal*, 14(5), 649–654.

- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., ... Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, *43*(5), ng.806. <https://doi.org/10.1038/ng.806>
- Desai, A., & Jere, A. (2012). Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clinical Genetics*, *81*(6), 503–510. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x>
- Ector, H., & Hauwaert, L. G. V. der. (1980). Sick sinus syndrome in childhood. *Heart*, *44*(6), 684–691. <https://doi.org/10.1136/hrt.44.6.684>
- Epstein, A. E., DiMarco, J. P., Ellenbogen, K. A., Estes III, N. A. M., Freedman, R. A., Gettes, L. S., ... Sweeney, M. O. (2008). ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices) Developed in Collaboration With the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons. *Journal of the American College of Cardiology*, *51*(21), e1–e62. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.032>
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research*, *8*(3), 186–194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, *8*(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- Fabiato, A. (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *The Journal of General Physiology*, *85*(2), 247–289. <https://doi.org/10.1085/jgp.85.2.247>
- Faggioni, M., Kryshchal, D. O., & Knollmann, B. C. (2012). Calsequestrin mutations and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Pediatric Cardiology*, *33*(6), 959–967. <https://doi.org/10.1007/s00246-012-0256-1>
- Fernández-Falgueras, A., Sarquella-Brugada, G., Brugada, J., Brugada, R., & Campuzano, O. (2017). Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology*, *6*(1). <https://doi.org/10.3390/biology6010007>
- Fish, R. M. (2000). Electric injury, part II: Specific injuries. *Journal of Emergency Medicine*, *18*(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(99\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(99)00158-4)
- Fowler, P. W., & Sansom, M. S. P. (2013). The pore of voltage-gated potassium ion channels is strained when closed. *Nature Communications*, *4*, 1872. <https://doi.org/10.1038/ncomms2858>
- Fridericia LS. Die systolendauer im elektrokardiogramm bei normalen menschen und bei herzkranken. *Acta Med Scand* 1920; 53:469–486

- Frustaci, A., Priori, S. G., Pieroni, M., Chimenti, C., Napolitano, C., Rivolta, I., ... Russo, M. A. (2005). Cardiac Histological Substrate in Patients With Clinical Phenotype of Brugada Syndrome. *Circulation*, *112*(24), 3680–3687. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.520999>
- Frustaci, A., Russo, M. A., & Chimenti, C. (2009). Structural myocardial abnormalities in asymptomatic family members with Brugada syndrome and SCN5A gene mutation. *European Heart Journal*, *30*(14), 11763–11763. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp148>
- Fujii, Y., Itoh, H., Ohno, S., Murayama, T., Kurebayashi, N., Aoki, H., ... Horie, M. (2017). A type 2 ryanodine receptor variant associated with reduced Ca²⁺ release and short-coupled torsades de pointes ventricular arrhythmia. *Heart Rhythm*, *14*(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2016.10.015>
- Fu, W., O'Connor, T. D., Jun, G., Kang, H. M., Abecasis, G., Leal, S. M., ... Akey, J. M. (2013). Analysis of 6,515 exomes reveals a recent origin of most human protein-coding variants. *Nature*, *493*(7431), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature11690>
- Garnier, J., Gibrat, J.-F., & Robson, B. (1996). [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. In *Methods in Enzymology* (Vol. 266, pp. 540–553). Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687996660340>
- Ghosh, S., Nunziato, D. A., & Pitt, G. S. (2006). KCNQ1 Assembly and Function Is Blocked by Long-QT Syndrome Mutations That Disrupt Interaction With Calmodulin. *Circulation Research*, *98*(8), 1048–1054. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000218863.44140.f2>
- Ginsburg, K. S., Weber, C. R., & Bers, D. M. (2013). Cardiac Na⁺–Ca²⁺ exchanger: dynamics of Ca²⁺-dependent activation and deactivation in intact myocytes. *The Journal of Physiology*, *591*(8), 2067–2086. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.252080>
- Giudicessi, J. R., & Ackerman, M. J. (2013). Prevalence and Potential Genetic Determinants of Sensorineural Deafness in KCNQ1 Homozygosity and Compound Heterozygosity Clinical Perspective. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *6*(2), 193–200. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.112.964684>
- González-Melchor, L., Villarreal-Molina, T., Iturralde-Torres, P., & Medeiros-Domingo, A. (2014). [Sudden cardiac death in individuals with normal hearts: an update]. *Archivos De Cardiologia De Mexico*, *84*(4), 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2014.04.002>
- Gourraud, J.-B., Barc, J., Thollet, A., Le Marec, H., & Probst, V. (2017). Brugada syndrome: Diagnosis, risk stratification and management. *Archives of Cardiovascular Diseases*, *110*(3), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.09.009>
- Grizel, A. V., Glukhov, G. S., & Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels. *Acta Naturae*, *6*(4), 10–26.
- Guinamard, R., Bouvagnet, P., Hof, T., Liu, H., Simard, C., & Sallé, L. (2015). TRPM4 in cardiac electrical activity. *Cardiovascular Research*, *108*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv213>

- Haitin, Y., & Attali, B. (2008). The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *The Journal of Physiology*, 586(7), 1803–1810. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149187>
- Hammond-Haley, M., Patel, R. S., Providência, R., & Lambiase, P. D. (2016). Exercise restrictions for patients with inherited cardiac conditions: Current guidelines, challenges and limitations. *International Journal of Cardiology*, 209, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.023>
- Hodges M, Salerno D, Erlie D. Bazett's QT correction reviewed: evidence that a linear QT correction for heart rate is better. *J Am Coll Cardiol*. 1983;1:694.
- Hofman, N., & Wilde, A. A. M. (2016). Role of Genetic Testing in Patients with Ventricular Arrhythmias in Apparently Normal Hearts. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 8(3), 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2016.04.002>
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)
- Huang, F. D., Chen, J., Lin, M., Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (2001). Long-QT syndrome-associated missense mutations in the pore helix of the HERG potassium channel. *Circulation*, 104(9), 1071–1075.
- Ichikawa, M., Aiba, T., Ohno, S., Shigemizu, D., Ozawa, J., Sonoda, K., ... Horie, M. (2016). Phenotypic Variability of ANK2 Mutations in Patients With Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Circulation Journal*, 80(12), 2435–2442. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-0486>
- Ildarova, R., Shkolnikova, M. A., Kharlap, M., Bereznitskaya, V., & Kalinin, L. (2012). Sodium-channel blockers might contribute to the prevention of ventricular tachycardia in patients with long QT syndrome type 2: a description of 4 cases. *Journal of Electrocardiology*, 45(3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2012.01.008>
- Ishikawa, T., Ohno, S., Murakami, T., Yoshida, K., Mishima, H., Fukuoka, T., ... Makita, N. (2017). Sick sinus syndrome with HCN4 mutations shows early onset and frequent association with atrial fibrillation and left ventricular noncompaction. *Heart Rhythm*, 14(5), 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.01.020>
- Ishikawa, T., Tsuji, Y., & Makita, N. (2016). Inherited bradyarrhythmia: A diverse genetic background. *Journal of Arrhythmia*, 32(5), 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.09.009>
- Itoh, H., Crotti, L., Aiba, T., Spazzolini, C., Denjoy, I., Fressart, V., ... Horie, M. (2016). The genetics underlying acquired long QT syndrome: impact for genetic screening. *European Heart Journal*, 37(18), 1456–1464. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv695>
- Jamuar, S. S., & Tan, E.-C. (2015). Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Human Genomics*, 9, 10. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0031-5>

- Jiang, D., Chen, W., Wang, R., Zhang, L., & Chen, S. R. W. (2007). Loss of luminal Ca²⁺ activation in the cardiac ryanodine receptor is associated with ventricular fibrillation and sudden death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(46), 18309–18314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706573104>
- Jongbloed, R. J., Wilde, A. A., Geelen, J. L., Doevendans, P., Schaap, C., Van Langen, I., ... Smeets, H. J. (1999). Novel KCNQ1 and HERG missense mutations in Dutch long-QT families. *Human Mutation*, *13*(4), 301–310. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)13:4<301::AID-HUMU7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:4<301::AID-HUMU7>3.0.CO;2-V)
- Juang, J.-M. J., & Horie, M. (2016). Genetics of Brugada syndrome. *Journal of Arrhythmia*, *32*(5), 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2016.07.012>
- Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F. D., Smith, J. A., Meiler, J., George, A. L., ... Sanders, C. R. (2008a). Structure of KCNE1 and Implications for How It Modulates the KCNQ1 Potassium Channel. *Biochemistry*, *47*(31), 7999–8006. <https://doi.org/10.1021/bi800875q>
- Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F. D., Smith, J. A., Meiler, J., George, A. L., ... Sanders, C. R. (2008b). Structure of KCNE1 and Implications for How It Modulates the KCNQ1 Potassium Channel. *Biochemistry*, *47*(31), 7999–8006. <https://doi.org/10.1021/bi800875q>
- Kapoor, A., Bakshy, K., Xu, L., Nandakumar, P., Lee, D., Boerwinkle, E., ... Chakravarti, A. (2016). Rare coding *TTN* variants are associated with electrocardiographic QT interval in the general population. *Scientific Reports*, *6*, srep28356. <https://doi.org/10.1038/srep28356>
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Salisbury, B. A., Carr, J. L., Harris-Kerr, C., Pollevick, PhD, G. D., ... Ackerman, M. J. (2009). Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION® long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*, *6*(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.05.021>
- Karst, M. L., Herron, K. J., & Olson, T. M. (2008). X-Linked Nonsyndromic Sinus Node Dysfunction and Atrial Fibrillation Caused by Emerin Mutation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *19*(5), 510–515. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2007.01081.x>
- Kaufenstein, S., Kiehne, N., Erkapic, D., Schmidt, J., Hamm, C. W., Bratzke, H., ... Neumann, T. (2011). A novel mutation in the cardiac ryanodine receptor gene (RyR2) in a patient with an unequivocal LQTS. *International Journal of Cardiology*, *146*(2), 249–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.10.062>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), nprot.2015.053. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Klassen, T., Davis, C., Goldman, A., Burgess, D., Chen, T., Wheeler, D., ... Noebels, J. (2011). Exome Sequencing of Ion Channel Genes Reveals Complex Profiles Confounding Personal Risk Assessment in Epilepsy. *Cell*, *145*(7), 1036–1048. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.025>

- Krönauer, T., & Friederich, P. (2015). [Long QT syndrome. History, genetics, clinical symptoms, causes and therapy]. *Der Anaesthetist*, 64(8), 586–595. <https://doi.org/10.1007/s00101-015-0068-9>
- Kruse, M., Schulze-Bahr, E., Corfield, V., Beckmann, A., Stallmeyer, B., Kurtbay, G., ... Pongs, O. (2009). Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2737–2744. <https://doi.org/10.1172/JCI38292>
- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), nprot.2009.86. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
- Kushnir, A., & Marks, A. R. (2010). The Ryanodine Receptor in Cardiac Physiology and Disease. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 59, 1–30. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)59001-X](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)59001-X)
- Laitinen, P., Fodstad, H., Piippo, K., Swan, H., Toivonen, L., Viitasalo, M., ... Kontula, K. (2000). Survey of the coding region of the HERG gene in long QT syndrome reveals six novel mutations and an amino acid polymorphism with possible phenotypic effects. *Human Mutation*, 15(6), 580–581. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200006\)15:6<580::AID-HUMU16>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200006)15:6<580::AID-HUMU16>3.0.CO;2-0)
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., & Kinet, J. P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, 109(3), 397–407.
- Lee, H., Cherk, S., Chan, S., Wong, S., Tong, T., Ho, W., ... Mak, C. (2012). BAG3-related myofibrillar myopathy in a Chinese family. *Clinical Genetics*, 81(4), 394–398. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01659.x>
- Lei, M., Huang, C. L.-H., & Zhang, Y. (2008). Genetic Na⁺ channelopathies and sinus node dysfunction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 98(2-3), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.003>
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... Consortium, E. A. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), nature19057. <https://doi.org/10.1038/nature19057>
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... Exome Aggregation Consortium. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285–291.
- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

- Liu, H., Chatel, S., Simard, C., Syam, N., Salle, L., Probst, V., ... Bouvagnet, P. (2013). Molecular Genetics and Functional Anomalies in a Series of 248 Brugada Cases with 11 Mutations in the TRPM4 Channel. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054131>
- Loaiza, R., Benkusky, N. A., Powers, P. P., Hacker, T., Noujaim, S., Ackerman, M. J., ... Valdivia, H. H. (2013). Heterogeneity of Ryanodine Receptor Dysfunction in a Mouse Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia: Novelty and Significance. *Circulation Research*, 112(2), 298–308. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.274803>
- Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science*, 309(5736), 897–903. <https://doi.org/10.1126/science.1116269>
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, 450(7168), nature06265. <https://doi.org/10.1038/nature06265>
- Lown, B. (1967). Electrical reversion of cardiac arrhythmias. *Heart*, 29(4), 469–489. <https://doi.org/10.1136/hrt.29.4.469>
- Lundby, A., Tseng, G.-N., & Schmitt, N. (2010). Structural basis for KV7.1–KCNE3 interactions in the IKs channel complex. *Heart Rhythm*, 7(5), 708–713. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.12.017>
- MacKerell, A. D., Feig, M., & Brooks, C. L. (2004). Improved Treatment of the Protein Backbone in Empirical Force Fields. *Journal of the American Chemical Society*, 126(3), 698–699. <https://doi.org/10.1021/ja036959e>
- Macri, V., Mahida, S. N., Zhang, M. L., Sinner, M. F., Dolmatova, E. V., Tucker, N. R., ... Ellinor, P. T. (2014). A novel trafficking-defective HCN4 mutation is associated with early-onset atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 11(6), 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.03.002>
- Martin, D. A., & Hogg, J. P. (2010). Illustrated Approach to Imaging and Staging of Nodal Disease in the Neck. *Current Problems in Diagnostic Radiology*, 39(2), 62–73. <https://doi.org/10.1067/j.cpradiol.2009.08.003>
- Mazzanti, A., O'Rourke, S., Ng, K., Miceli, C., Borio, G., Curcio, A., ... Priori, S. G. (2014). The usual suspects in sudden cardiac death of the young: A focus on inherited arrhythmogenic diseases. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 12(4), 499–519. <https://doi.org/10.1586/14779072.2014.894884>
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., ... Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17, 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
- Medeiros-Domingo, A., Bhuiyan, Z. A., Tester, D. J., Hofman, N., Bikker, H., van Tintelen, J. P., ... Ackerman, M. J. (2009). Comprehensive Open Reading Frame Mutational Analysis of the RYR2-Encoded Ryanodine Receptor/Calcium Channel in Patients Diagnosed

Previously with Either Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia or Genotype Negative, Exercise-Induced Long QT Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(22), 2065–2074. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.022>

Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P., & Ackerman, M. J. (2007). Clínica y genética en el síndrome de QT largo. *Revista Española de Cardiología*, 60(07), 739–752. <https://doi.org/10.1157/13108280>

Meyer, L., Stubbs, B., Fahrenbruch, C., Maeda, C., Harmon, K., Eisenberg, M., & Drezner, J. (2012). Incidence, Causes, and Survival Trends From Cardiovascular-Related Sudden Cardiac Arrest in Children and Young Adults 0 to 35 Years of Age. *Circulation*, 126(11), 1363–1372. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.076810>

Milano, A., Vermeer, A. M. C., Lodder, E. M., Barc, J., Verkerk, A. O., Postma, A. V., ... Bezzina, C. R. (2014). HCN4 Mutations in Multiple Families With Bradycardia and Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(8), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.05.045>

Miles, C. J., & Behr, E. R. (2016). The role of genetic testing in unexplained sudden death. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 168, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.007>

Mironov, S. L. (2013). Calmodulin and calmodulin kinase II mediate emergent bursting activity in the brainstem respiratory network (preBötzinger complex). *The Journal of Physiology*, 591(7), 1613–1630. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.237362>

Mohler, P. J., Schott, J.-J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., ... Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, 421(6923), nature01335. <https://doi.org/10.1038/nature01335>

Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, (2017).

Morris, G. M., & Kalman, J. M. (2014). Fibrosis, Electrics and Genetics. *Circulation Journal*, 78(6), 1272–1282. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0419>

Nademanee, K., Veerakul, G., Nimmannit, S., Chaowakul, V., Bhuripanyo, K., Likittanasombat, K., ... Tatsanavivat, P. (1997). Arrhythmogenic Marker for the Sudden Unexplained Death Syndrome in Thai Men. *Circulation*, 96(8), 2595–2600. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.8.2595>

Nakano, Y., & Shimizu, W. (2016). Genetics of long-QT syndrome. *Journal of Human Genetics*, 61(1), 51–55. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.74>

Napolitano, C., Bloise, R., Memmi, M., & Priori, S. G. (2014). Clinical utility gene card for: Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT). *European Journal of Human Genetics*, 22(1). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.55>

Napolitano, C., Priori, S. G., & Bloise, R. (1993). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L.

- J. Bean, ... K. Stephens (Eds.), *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1289/>
- Norton, N., Li, D., Rieder, M. J., Siegfried, J. D., Rampersaud, E., Züchner, S., ... Hershberger, R. E. (2011). Genome-wide Studies of Copy Number Variation and Exome Sequencing Identify Rare Variants in BAG3 as a Cause of Dilated Cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 88(3), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.01.016>
- Oliveira, M., Antunes, E., & da Silva, M. N. (1999). [Prevention of sudden death in congenital long-QT syndrome]. *Revista Portuguesa De Cardiologia: Orgao Oficial Da Sociedade Portuguesa De Cardiologia = Portuguese Journal of Cardiology: An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology*, 18(6), 627–633.
- Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T. H., Gabbay, K. H., & Bohren, K. M. (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2), 517–520. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.090>
- Pilmer, C. M., Kirsh, J. A., Hildebrandt, D., Krahn, A. D., & Gow, R. M. (2014). Sudden cardiac death in children and adolescents between 1 and 19 years of age. *Heart Rhythm*, 11(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.11.006>
- Porreca, G. J. (2010). Genome sequencing on nanoballs. *Nature Biotechnology*, 28(1), nbt0110–nbt0143 – 43. <https://doi.org/10.1038/nbt0110-43>
- Portero, V., Casini, S., Hoekstra, M., Verkerk, A. O., Mengarelli, I., Belardinelli, L., ... Remme, C. A. (2017). Anti-arrhythmic potential of the late sodium current inhibitor GS-458967 in murine Scn5a-1798insD^{+/-} and human SCN5A-1795insD^{+/-} iPSC-derived cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 113(7), 829–838. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx077>
- Postema, P. G., Van den Berg, M., Van Tintelen, J. P., Van den Heuvel, F., Grundeken, M., Hofman, N., ... Wilde, A. (2009). Founder mutations in the Netherlands. *Netherlands Heart Journal*, 17(11), 422–428.
- Pott, C., Dechering, D. G., Reinke, F., Muszynski, A., Zellerhoff, S., Bittner, A., ... Eckardt, L. (2011). Successful treatment of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with flecainide: a case report and review of the current literature. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 13(6), 897–901. <https://doi.org/10.1093/europace/euq517>
- Priori, S. G., Blomström-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Blom, N., Borggrefe, M., Camm, J., ... Zannad, F. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac deathThe Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC)Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *European Heart Journal*, 36(41), 2793–2867. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv316>

- Priori, S. G., Napolitano, C., Gasparini, M., Pappone, C., Bella, P. D., Brignole, M., ... Schwartz, P. J. (2000). Clinical and Genetic Heterogeneity of Right Bundle Branch Block and ST-Segment Elevation Syndrome A Prospective Evaluation of 52 Families. *Circulation*, *102*(20), 2509–2515. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.20.2509>
- Priori, S. G., Napolitano, C., Memmi, M., Colombi, B., Drago, F., Gasparini, M., ... DeLogu, A. (2002a). Clinical and Molecular Characterization of Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation*, *106*(1), 69–74. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000020013.73106.D8>
- Priori, S. G., Napolitano, C., Memmi, M., Colombi, B., Drago, F., Gasparini, M., ... DeLogu, A. (2002b). Clinical and Molecular Characterization of Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation*, *106*(1), 69–74. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000020013.73106.D8>
- Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bianchi, L., Dennis, A., Fusco, M. D., ... Casari, G. (1998). A Recessive Variant of the Romano-Ward Long-QT Syndrome? *Circulation*, *97*(24), 2420–2425. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.24.2420>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, *155*(2), 945–959.
- Probst, V., Wilde, A. A. M., Barc, J., Sacher, F., Babuty, D., Mabo, P., ... Schott, J.-J. (2009). SCN5A Mutations and the Role of Genetic Background in the Pathophysiology of Brugada Syndrome. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *2*(6), 552–557. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.853374>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., ... Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, *81*(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Radford, D. J., & Izukawa, T. (1975). Sick sinus syndrome. Symptomatic cases in children. *Archives of Disease in Childhood*, *50*(11), 879–885.
- Reed, G. J., Boczek, N. J., Etheridge, S., & Ackerman, M. J. (2015). CALM3 Mutation Associated with Long QT Syndrome. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*, *12*(2), 419–422. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.10.035>
- Refaat, M. M., Hotait, M., & London, B. (2015). Genetics of sudden cardiac death. *Current Cardiology Reports*, *17*(7), 606. <https://doi.org/10.1007/s11886-015-0606-8>
- Refaat, M. M., Hotait, M., & Scheinman, M. (2016). Brugada Syndrome. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, *8*(1), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2015.10.036>
- Refsgaard, L., Holst, A. G., Sadjadieh, G., Haunsø, S., Nielsen, J. B., & Olesen, M. S. (2012). High prevalence of genetic variants previously associated with LQT syndrome in new exome data. *European Journal of Human Genetics*, *20*(8), 905–908. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.23>

- Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., Ginneken, A. C. G. van, Brunshot, S. van, Belterman, C. N. W., ... Bezzina, C. R. (2006). Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human SCN5A-1795insD. *Circulation*, *114*(24), 2584–2594. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653949>
- Romero-Hidalgo, S., Ochoa-Leyva, A., Garcíarrubio, A., Acuña-Alonzo, V., Antúnez-Argüelles, E., Balcazar-Quintero, M., ... Soberón, X. (2017). Demographic history and biologically relevant genetic variation of Native Mexicans inferred from whole-genome sequencing. *Nature Communications*, *8*(1), 1005. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01194-z>
- Sachyani, D., Dvir, M., Strulovich, R., Tria, G., Tobelaim, W., Peretz, A., ... Hirsch, J. A. (2014). Structural Basis of a Kv7.1 Potassium Channel Gating Module: Studies of the Intracellular C-Terminal Domain in Complex with Calmodulin. *Structure*, *22*(11), 1582–1594. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.07.016>
- Sagie, A., Larson, M. G., Goldberg, R. J., Bengtson, J. R., & Levy, D. (1992). An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study). *The American Journal of Cardiology*, *70*(7), 797–801.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Specter, P. S., Atkinson, D. L., & Keating, M. T. (1996). Coassembly of KVLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac IKS potassium channel. *Nature*, *384*(6604), 384080a0. <https://doi.org/10.1038/384080a0>
- Sarquella-Brugada, G., Campuzano, O., Arbelo, E., Brugada, J., & Brugada, R. (2015). Brugada syndrome: clinical and genetic findings. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.35>
- Sasaki, K. (2004). [The filter region of the myocardial Na channel, together with ion selectivity, controls pharmacodynamics of anti-arrhythmia agents--an analysis using the channel altered by idiopathic ventricular fibrillation]. [*Hokkaido Igaku Zasshi*] *The Hokkaido Journal of Medical Science*, *79*(6), 747–754.
- Sassa, A., Kanemaru, Y., Kamoshita, N., Honma, M., & Yasui, M. (2016). Mutagenic consequences of cytosine alterations site-specifically embedded in the human genome. *Genes and Environment*, *38*(1). <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0045-9>
- Scheimberg, I. (2013). The genetic autopsy. *Current Opinion in Pediatrics*, *25*(6), 659–665. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328365ae0d>
- Schott, J.-J., Charpentier, F., Peltier, S., Foley, P., Drouin, E., Bouhour, J.-B., ... Pascal, O. (1995). Mapping of a Gene for Long QT Syndrome to Chromosome 4q25-27. *American Journal of Human Genetics*, *57*(5), 1114–1122.
- Schwartz, P. J., Moss, A. J., Vincent, G. M., & Crampton, R. S. (1993). Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation*, *88*(2), 782–784. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.88.2.782>

- Schweizer, P. A., Schröter, J., Greiner, S., Haas, J., Yampolsky, P., Mereles, D., ... Thomas, D. (2014). The Symptom Complex of Familial Sinus Node Dysfunction and Myocardial Noncompaction Is Associated With Mutations in the HCN4 Channel. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(8), 757–767. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1155>
- Scott, O., Macartney, F. J., & Deverall, P. B. (1976). Sick sinus syndrome in children. *Archives of Disease in Childhood*, 51(2), 100–105.
- Selga, E., Campuzano, O., Pinsach-Abuin, M., Pérez-Serra, A., Mademont-Soler, I., Riuró, H., ... Brugada, R. (2015). Comprehensive Genetic Characterization of a Spanish Brugada Syndrome Cohort. *PLOS ONE*, 10(7), e0132888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132888>
- Semsarian, C., & Ingles, J. (2016). Molecular autopsy in victims of inherited arrhythmias. *Journal of Arrhythmia*, 32(5), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.09.010>
- Semsarian, C., Ingles, J., & Wilde, A. A. M. (2015). Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *European Heart Journal*, 36(21), 1290–1296. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv063>
- Shimizu, W., Matsuo, K., Kokubo, Y., Satomi, K., Kurita, T., Noda, T., ... Tomoike, H. (2007). Sex Hormone and Gender Difference—Role of Testosterone on Male Predominance in Brugada Syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 18(4), 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2006.00743.x>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sigrist, C. J. A., de Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B. A., Hulo, N., Bridge, A., ... Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D344–D347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Silva, C. T., Zorkoltseva, I. V., Amin, N., Demirkan, A., Leeuwen, V., M, E., ... Isaacs, A. (2016). A Combined Linkage and Exome Sequencing Analysis for Electrocardiogram Parameters in the Erasmus Rucphen Family Study. *Frontiers in Genetics*, 7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00190>
- Simpson, J. M., Maxwell, D., Rosenthal, E., & Gill, H. (2009). Fetal ventricular tachycardia secondary to long QT syndrome treated with maternal intravenous magnesium: case report and review of the literature. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 34(4), 475–480. <https://doi.org/10.1002/uog.6433>
- Smeazzetto, S., Saponaro, A., Young, H. S., Moncelli, M. R., & Thiel, G. (2013). Structure-Function Relation of Phospholamban: Modulation of Channel Activity as a Potential Regulator of SERCA Activity. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052744>

- Smith, J. A., Vanoye, C. G., George, A. L., Meiler, J., & Sanders, C. R. (2007). Structural Models for the KCNQ1 Voltage-Gated Potassium Channel. *Biochemistry*, 46(49), 14141–14152. <https://doi.org/10.1021/bi701597s>
- Smith, J., Vanoye, C. G., George, A. L., Meiler, J., & Sanders, C. R. (2007). Structural Models for the KCNQ1 Voltage-Gated Potassium Channel. *Biochemistry*, 46(49), 14141–14152. <https://doi.org/10.1021/bi701597s>
- Soldovieri, M. V., Miceli, F., & Tagliatalata, M. (2011). Driving With No Brakes: Molecular Pathophysiology of Kv7 Potassium Channels. *Physiology*, 26(5), 365–376. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2011>
- Stallmeyer, B., Zumhagen, S., Denjoy, I., Duthoit, G., Hébert, J.-L., Ferrer, X., ... Schulze-Bahr, E. (2012). Mutational spectrum in the Ca²⁺-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Human Mutation*, 33(1), 109–117. <https://doi.org/10.1002/humu.21599>
- Steinberg, C., Laksman, Z. W. M., & Krahn, A. D. (2016). Sudden cardiac death: A reappraisal. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(8), 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.05.006>
- Suhre, K., & Sanejouand, Y.-H. (2004). ElNemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), W610–W614. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh368>
- Sumitomo, N. (2016). Current topics in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Arrhythmia*, 32(5), 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.09.008>
- Tan, B.-H., Valdivia, C. R., Rok, B. A., Ye, B., Ruwaldt, K. M., Tester, D. J., ... Makielski, J. C. (2005). Common human SCN5A polymorphisms have altered electrophysiology when expressed in Q1077 splice variants. *Heart Rhythm*, 2(7), 741–747. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2005.04.021>
- Tanaka, Y., Kawabata, M., Scheinman, M. M., & Hirao, K. (2015). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia with QT Prolongation. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 38(12), 1499–1502. <https://doi.org/10.1111/pace.12735>
- Taniguchi, Y., Miyazaki, A., Sakaguchi, H., Hayama, Y., Ebishima, N., Negishi, J., ... Ohuchi, H. (2017). Prominent QTc prolongation in a patient with a rare variant in the cardiac ryanodine receptor gene. *Heart and Vessels*, 32(2), 229–233. <https://doi.org/10.1007/s00380-016-0869-z>
- Taylor, K. C., & Sanders, C. R. (2017). Regulation of KCNQ/Kv7 family voltage-gated K⁺ channels by lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(4), 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.10.023>
- Terentyev, D., Rees, C. M., Li, W., Cooper, L. L., Jindal, H. K., Peng, X., ... Koren, G. (2014). Hyperphosphorylation of RyRs Underlies Triggered Activity in Transgenic Rabbit Model of LQT2 Syndrome. *Circulation Research*, 115(11), 919–928. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.305146>

- Tester, D. J., & Ackerman, M. J. (2005). Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovascular Research*, 67(3), 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.02.013>
- Tester, D. J., & Ackerman, M. J. (2006). The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. *Current Opinion in Cardiology*, 21(3), 166–172. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000221576.33501.83>
- Tester, D. J., Benton, A. J., Train, L., Deal, B., Baudhuin, L. M., & Ackerman, M. J. (2010). Prevalence and Spectrum of Large Deletions or Duplications in the Major Long QT Syndrome-Susceptibility Genes and Implications for Long QT Syndrome Genetic Testing. *The American Journal of Cardiology*, 106(8), 1124–1128. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.06.022>
- Tester, D. J., Medeiros-Domingo, A., Will, M. L., & Ackerman, M. J. (2011). Unexplained drownings and the cardiac channelopathies: a molecular autopsy series. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(10), 941–947. <https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0373>
- Tester, D. J., Spoon, D. B., Valdivia, H. H., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2004). Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases. *Mayo Clinic Proceedings*, 79(11), 1380–1384. <https://doi.org/10.4065/79.11.1380>
- Thomas, N. M., Jasmin, J. F., Lisanti, M. P., & Iacobas, D. A. (2011). Sex differences in expression and subcellular localization of heart rhythm determinant proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.006>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Torkamani, A., Muse, E. D., Spencer, E. G., Rueda, M., Wagner, G. N., Lucas, J. R., & Topol, E. J. (2016). Molecular Autopsy for Sudden Unexpected Death. *JAMA*, 316(14), 1492–1494. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11445>
- Toro, R., Pérez-Serra, A., Campuzano, O., Moncayo-Arlandi, J., Allegue, C., Iglesias, A., ... Brugada, R. (2016). Familial Dilated Cardiomyopathy Caused by a Novel Frameshift in the BAG3 Gene. *PloS One*, 11(7), e0158730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158730>
- Trueblood, K. N., Bürgi, H.-B., Burzlaff, H., Dunitz, J. D., Gramaccioli, C. M., Schulz, H. H., ... Abrahams, S. C. (1996). Atomic Displacement Parameter Nomenclature. Report of a Subcommittee on Atomic Displacement Parameter Nomenclature. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 52(5), 770–781. <https://doi.org/10.1107/S0108767396005697>
- Ueda, K., Valdivia, C., Medeiros-Domingo, A., Tester, D. J., Vatta, M., Farrugia, G., ... Makielski, J. C. (2008). Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 5077–5082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709001105>

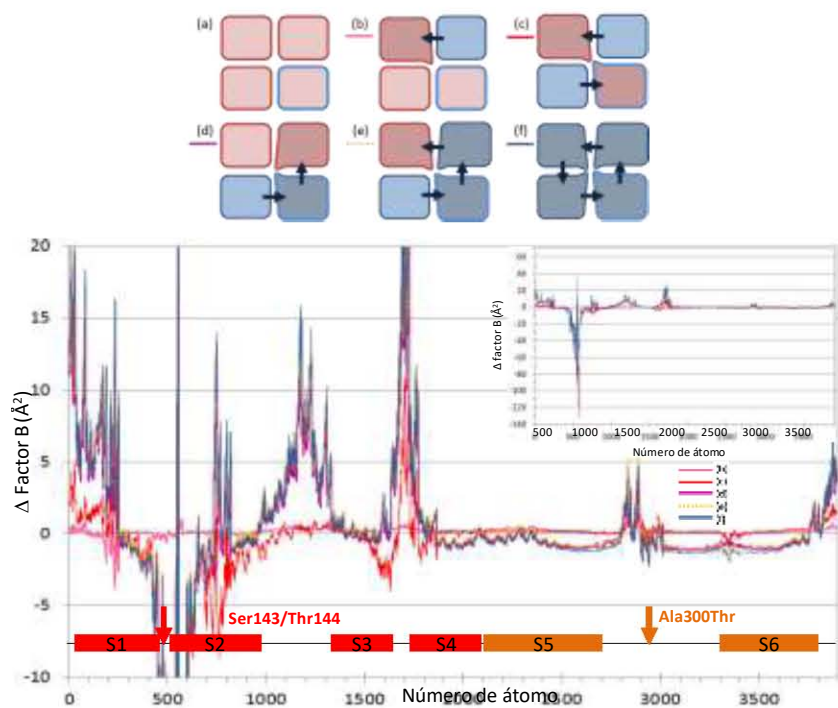
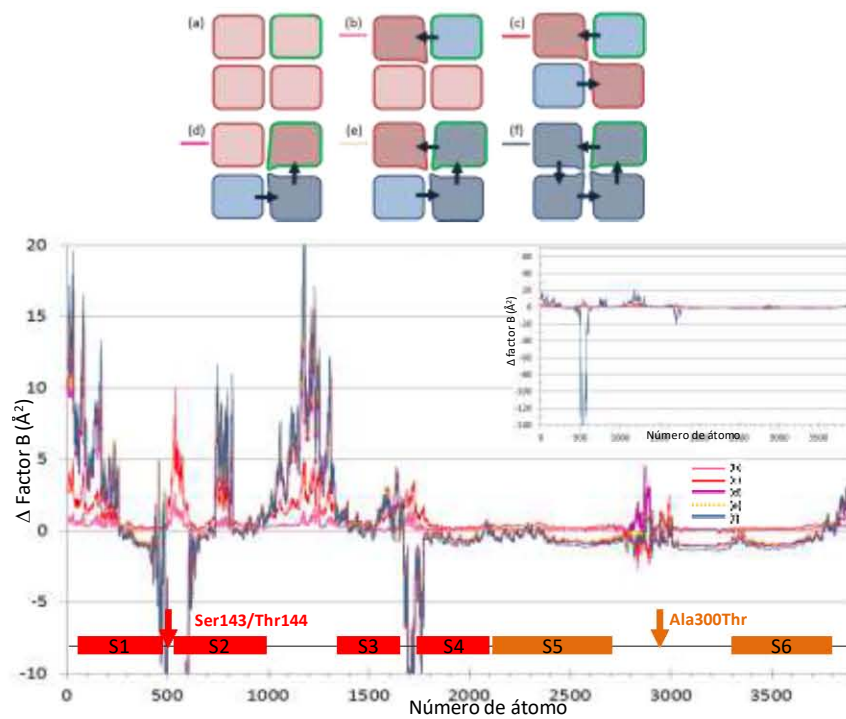
Sciences of the United States of America, 105(27), 9355–9360.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0801294105>

- van der Werf, C., Zwinderman, A. H., & Wilde, A. A. M. (2012). Therapeutic approach for patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: state of the art and future developments. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 14(2), 175–183. <https://doi.org/10.1093/europace/eur277>
- Veerman, C. C., Wilde, A. A. M., & Lodder, E. M. (2015). The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene*, 573(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.062>
- Villarreal-Molina, T., Posadas-Romero, C., Romero-Hidalgo, S., Antúnez-Argüelles, E., Bautista-Grande, A., Vargas-Alarcón, G., ... Carnevale, A. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049285>
- Wang, Z., Liu, X., Yang, B.-Z., & Gelernter, J. (2013). The Role and Challenges of Exome Sequencing in Studies of Human Diseases. *Frontiers in Genetics*, 4. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00160>
- Watanabe, T., Ohno, S., Shirai, M., Endoh, A., Hongo, T., Ueta, I., & Yoshimoto, J. (2016). Inherited catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia due to RYR2 mutation. *Pediatrics International*, 58(6), 512–515. <https://doi.org/10.1111/ped.12910>
- Wells, Q. S., Ausborn, N. L., Funke, B. H., Pfothenauer, J. P., Fredi, J. L., Baxter, S., ... Hong, C. C. (2011). Familial dilated cardiomyopathy associated with congenital defects in the setting of a novel VCL mutation (Lys815Arg) in conjunction with a known MYPBC3 variant. *Cardiogenetics*, 1(1). <https://doi.org/10.4081/cardiogenetics.2011.e10>
- Westenskow, P., Splawski, I., Timothy, K. W., Keating, M. T., & Sanguinetti, M. C. (2004). Compound Mutations. *Circulation*, 109(15), 1834–1841. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000125524.34234.13>
- Wieneke, H., Svendsen, J. H., Lande, J., Spencker, S., Martinez, J. G., Strohmer, B., ... Siffert, W. (2016). Polymorphisms in the GNAS Gene as Predictors of Ventricular Tachyarrhythmias and Sudden Cardiac Death: Results From the DISCOVERY Trial and Oregon Sudden Unexpected Death Study. *Journal of the American Heart Association*, 5(12), e003905. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003905>
- Wiener, R., Haitin, Y., Shamgar, L., Fernández-Alonso, M. C., Martos, A., Chomsky-Hecht, O., ... Hirsch, J. A. (2008). The KCNQ1 (Kv7.1) COOH Terminus, a Multitiered Scaffold for Subunit Assembly and Protein Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), 5815–5830. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707541200>

- Wijeyeratne, Y. D., & Behr, E. R. (2016). Sudden death and cardiac arrest without phenotype: the utility of genetic testing. *Trends in Cardiovascular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.08.010>
- Winkel, B. G., Risgaard, B., Sadjadieh, G., Bundgaard, H., Haunsø, S., & Tfelt-Hansen, J. (2014). Sudden cardiac death in children (1–18 years): symptoms and causes of death in a nationwide setting. *European Heart Journal*, *35*(13), 868–875. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehf509>
- Wolpert, C., Vogel, M., Nagel, C., Herrera-Siklody, C., & Rüb, N. (2017). Ventrikuläre Arrhythmien bei Ionenkanalerkrankungen. *Herzschrittmachertherapie + Elektrophysiologie*, *28*(2), 169–176. <https://doi.org/10.1007/s00399-017-0510-6>
- Wu, G., Ai, T., Kim, J. J., Mohapatra, B., Xi, Y., Li, Z., ... Vatta, M. (2008). α -1-Syntrophin Mutation and the Long-QT Syndrome A Disease of Sodium Channel Disruption. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, *1*(3), 193–201. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.769224>
- Xu, Q., & Minor, D. L. (2009). Crystal structure of a trimeric form of the KV7.1 (KCNQ1) A-domain tail coiled-coil reveals structural plasticity and context dependent changes in a putative coiled-coil trimerization motif. *Protein Science*, *18*(10), 2100–2114. <https://doi.org/10.1002/pro.224>
- Yang, H., & Wang, K. (2015). Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nature Protocols*, *10*(10), nprot.2015.105. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.105>
- Zhao, Y., Feng, Y., Zhang, Y.-M., Ding, X.-X., Song, Y.-Z., Zhang, A.-M., ... Xia, X.-S. (2015). Targeted Next-Generation Sequencing Reveals Hot Spots and Doubly Heterozygous Mutations in Chinese Patients with Familial Cardiomyopathy. *BioMed Research International*, *2015*, 561819. <https://doi.org/10.1155/2015/561819>
- Zhao, Y.-T., Valdivia, C. R., Gurrola, G. B., Hernández, J. J., & Valdivia, H. H. (2015). Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies. *Science China Life Sciences*, *58*(1), 54–58. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4778-z>
- Zhao, Y.-T., Valdivia, C. R., Gurrola, G. B., Powers, P. P., Willis, B. C., Moss, R. L., ... Valdivia, H. H. (2015). Arrhythmogenesis in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation that depresses ryanodine receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(13), E1669–E1677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419795112>
- Zipes, D. P., & Wellens, H. J. J. (1998). Sudden Cardiac Death. *Circulation*, *98*(21), 2334–2351. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.21.2334>

ANEXO I

Figuras adicionales del modelo de Kv7.1



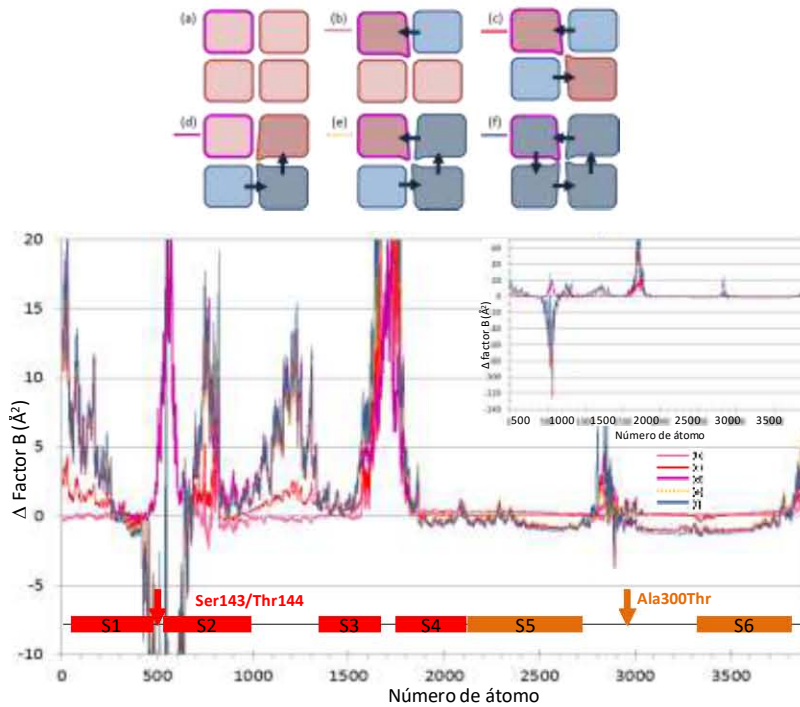


Figura Anexo I. Diferencias de movilidad en los tetrámeros mutantes vs silvestre. **A.** Seis posibles combinaciones de un tetrámero en un individuo heterocigoto de p.A300T y p.P535T. Las flechas indican la distorsión estructural causada por la mutación p.T300 en el monómero adyacente (en tono más oscuro). **B.** Diferencia del factor B (Δ factor-B) en todos los átomos del monómero *verde, azul o magenta* (panel A) de cada tetrámero mutante (*b, c, d, e y f*) en comparación con el tetrámero silvestre (*a*). Los segmentos correspondientes a los segmentos transmembranales del canal Kv7.1 se muestran en rojo (S1-S4 de una subunidad) y naranja (S5-S6 en la subunidad adyacente). Las flechas muestran las posiciones de los residuos S143-T144 y T300. El recuadro superior derecho muestra el mismo gráfico a escala completa.

ANEXO II

Paneles de secuenciación de nueva generación sitio dirigida

Gen	Panel		
	TruSight	Haloplex	Ion Torrent
ABCC8		*	
ABCC9	*	*	
ABCG5	*		
ABCG8	*		
ACTA1	*		
ACTA2	*		
ACTC1	*	*	
ACTN2	*	*	
AKAP9	*	*	*
ALMS1	*		
ANK2	*	*	*
ANKRD1	*	*	
APOA4	*		
APOA5	*		
APOB	*		
APOC2	*		
APOE	*		
BAG3	*	*	
BRAF	*		
CACNA1C	*	*	*
CACNA2D1	*	*	
CACNB2	*	*	*
CALM1	*	*	
CALR3	*	*	
CAMK2A		*	
CASQ2	*	*	*
CAV3	*	*	*
CBL	*		
CBS	*		
CETP	*		
COL3A1	*		
COL5A1	*		
COL5A2	*		
COX15	*		
CREB3L3	*		
CRELD1	*		
CRYAB	*		
CSRP3	*	*	
CTF1	*		
DES	*	*	
DLG1		*	
DMD	*		
DNAJC19	*		
DOLK	*		
DPP6	*	*	
DSC2	*	*	
DSG2	*	*	
DSP	*		
DTNA	*	*	
EFEMP2	*		
ELN	*		
EMD	*		

Gen	Panel		
	TruSight	Haloplex	Ion Torrent
EYA4	*		
FBN1	*		
FBN2	*		
FGF12		*	
FHL1	*		
FHL2	*		
FKRP	*		
FKTN	*		
FXN	*		
GAA	*		
GATAD1	*		
GCKR	*		
GJA5	*	*	
GJD4		*	
GLA	*	*	
GPDIL	*	*	*
GPIHBP1	*		
HADHA	*		
HCN4	*	*	
HEY2		*	
HFE	*		
HRAS	*		
HSPB8	*		
ILK	*		
JAG1	*		
JPH2	*		
JUP	*	*	
KCNA5	*	*	
KCND3	*	*	
KCNE1	*	*	*
KCNE1L		*	
KCNE2	*	*	*
KCNE3	*	*	*
KCNH2	*	*	*
KCNJ2	*	*	*
KCNJ5	*	*	
KCNJ8	*	*	
KCNQ1	*	*	*
KLF10	*		
KRAS	*		
LAMA2	*		
LAMA4	*		
LAMP2	*	*	
LDB3	*	*	
LDLR	*		
LDLRAP1	*		
LMF1	*		
LMNA	*	*	
LPL	*		
LTBP2	*		
MAP2K1	*		
MAP2K2	*		

Gen	Panel		
	TruSight	Haloplex	Ion Torrent
<i>MIB1</i>	*		
<i>MURC</i>	*		
<i>MYBPC3</i>	*	*	
<i>MYH11</i>	*		
<i>MYH6</i>	*	*	
<i>MYH7</i>	*	*	
<i>MYL2</i>	*	*	
<i>MYL3</i>	*	*	
<i>MYLK</i>	*		
<i>MYLK2</i>	*	*	
<i>MYO6</i>	*		
<i>MYOZ2</i>	*	*	
<i>MYPN</i>	*	*	
<i>NEXN</i>	*	*	
<i>NKX2-5</i>	*		
<i>NODAL</i>	*		
<i>NOSIAP</i>		*	
<i>NOTCH1</i>	*		
<i>NPPA</i>	*		
<i>NRAS</i>	*		
<i>PCSK9</i>	*		
<i>PDLIM3</i>	*		
<i>PKP2</i>	*	*	
<i>PLN</i>	*	*	
<i>PRDM16</i>	*		
<i>PRKAG2</i>	*	*	
<i>PRKARIA</i>	*		
<i>PTPN11</i>	*		
<i>RAF1</i>	*		
<i>RANGRF</i>	*	*	
<i>RBM20</i>	*		
<i>RYR1</i>	*		
<i>RYR2</i>	*	*	*
<i>SALL4</i>	*		
<i>SCN1B</i>	*	*	*
<i>SCN2B</i>	*	*	*
<i>SCN3B</i>	*	*	*
<i>SCN4B</i>	*	*	*
<i>SCN5A</i>	*	*	
<i>SCN10A</i>		*	
<i>SCO2</i>	*		
<i>SDHA</i>	*		
<i>SEPNI</i>	*		
<i>SGCB</i>	*		
<i>SGCD</i>	*		
<i>SGCG</i>	*		

Gen	Panel		
	TruSight	Haloplex	Ion Torrent
<i>SHOC2</i>	*		
<i>SLC25A4</i>	*		
<i>SLC2A10</i>	*		
<i>SMAD3</i>	*		
<i>SMAD4</i>	*		
<i>SLMAP</i>		*	
<i>SNTA1</i>	*	*	*
<i>SOS1</i>	*		
<i>SREBF2</i>	*		
<i>TAZ</i>	*	*	
<i>TBX20</i>	*		
<i>TBX3</i>	*		
<i>TBX5</i>	*		
<i>TCAP</i>	*	*	
<i>TGFB2</i>	*		
<i>TGFB3</i>	*	*	
<i>TGFBR1</i>	*		
<i>TGFBR2</i>	*		
<i>TMEM43</i>	*	*	
<i>TMPO</i>	*		
<i>TNNC1</i>	*	*	
<i>TNNI3</i>	*	*	
<i>TNNT2</i>	*	*	
<i>TPM1</i>	*	*	
<i>TRDN</i>	*	*	
<i>TRIM63</i>	*		
<i>TRPM4</i>	*	*	
<i>TTN</i>	*	*	
<i>TTR</i>	*	*	
<i>TXNRD2</i>	*		
<i>VCL</i>	*	*	
<i>ZBTB17</i>	*		
<i>ZHX3</i>	*		
<i>ZIC3</i>	*		

ANEXO III

Consentimiento informado (hoja inicial)



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, Hipertrófica 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.

ANEXO IV
Artículo Publicado



Research paper

Compound heterozygous *KCNQ1* mutations (A300T/P535T) in a child with sudden unexplained death: Insights into possible molecular mechanisms based on protein modeling



Erika Antúnez-Argüelles^a, Arturo Rojo-Domínguez^b, Ana Leticia Arregui-Mena^b,
 Leonor Jacobo-Albavera^a, Manlio Fabio Márquez^c, Pedro Iturralde-Torres^c,
 María Teresa Villarreal-Molina^{a,*}

^a Laboratorio de Genómica de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico

^b Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Mexico

^c Departamento de Electrofisiología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Molecular autopsy
 Recessive Romano Ward syndrome
KCNQ1
 Protein modeling

ABSTRACT

Sudden death in a child is a devastating event with important medical implications for surviving relatives. Because it may be the first manifestation of unknown inherited cardiac disease, molecular autopsy can be helpful to determine the cause of death and identify at risk family members. The aim of the study was to perform a molecular autopsy in a seven year-old girl with sudden unexplained death, to find evidence supporting the possible pathogenicity of mutations identified in inherited cardiac disease genes, and to clinically and genetically assess first-degree relatives. DNA from the index case was extracted from umbilical cord cells stored at birth, and DNA of first-degree relatives from blood samples. Targeted sequencing was performed using a Haloplex design including 81 cardiogenes. Possible functional consequences of the mutations were analyzed using protein modeling and structural mobility analyses. The child was compound heterozygous for *KCNQ1* variants p.Ala300Thr and p.Pro535Thr. Ala300Thr is known to cause long QT syndrome in the homozygous state, while Pro535Thr is novel and of unknown clinical significance. The father and sibling were Ala300Thr heterozygous, and had normal QTc intervals at rest and during exercise. The asymptomatic mother was heterozygous for Pro535Thr, and showed borderline QTc at rest, but prolonged QTc during exercise. Protein modeling predicted that Ala300Thr alters the mobility profile of the Kv7.1 tetramer and Thr535 disrupts a calmodulin-binding site, probably causing co-assembly or trafficking defects of the mutant monomer. Altogether, the evidence strongly suggests that this child was affected with a recessive form of Romano Ward syndrome.

1. Introduction

Sudden cardiac death (SCD) is a major cause of premature death in young adults and children (Michaud et al., 2009). If death remains unexplained after a thorough medical and legal investigation including autopsy, histopathology and toxicology, it is referred to as sudden unexplained death (SUD) (Christiansen et al., 2016). *Post-mortem* genetic testing, also known as molecular autopsy, has revealed that a substantial number of these deaths are the result of inherited cardiac disease, including arrhythmic channelopathies such as congenital long QT

syndrome (LQTS) (Michaud et al., 2009; Steinberg et al., 2016). Thus, comprehensive or targeted genetic testing should be considered to establish probable cause of death and to facilitate the identification of potentially at-risk relatives.

A molecular autopsy in unexplained death is of uttermost importance for surviving relatives, particularly because surrogate genetic testing can lead to serious mistakes (Ackerman, 2016). Diagnostic yield of inherited cardiomyopathies or channelopathies varies widely, and a negative test does not exclude inherited cardiac disease (Tester & Ackerman, 2005; Tester & Ackerman, 2012; Hoffman, 2013;

Abbreviations: aa, amino acid; BWA, Burrows-Wheeler aligner; CaM, calmodulin; CPR, cardiopulmonary resuscitation; DNA, deoxyribonucleic acid; ECG, electrocardiogram; GOF, gain of function; KCNE1, potassium voltage-gated channel subfamily E member 1; Kv7.1, voltage-gated potassium channel 7.1; Kv2.1, voltage-gated potassium channel 2.1; LQTS, long QT syndrome; minK, minimal potassium channel subunit; MOE, molecular operating environment; ms, milliseconds; NGS, next generation sequencing; QTc, corrected QT interval; RMSD, root mean square distance; SCD, sudden cardiac death; SUD, sudden unexplained death; TM, transmembrane; VUS, variant of unknown clinical significance; PDB, Protein Data Bank; VSD, voltage sensor domain; WT, wildtype

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809 Colonia Arenal Tepepan, CP14610, Delegación Tlalpan Mexico City, Mexico.

E-mail address: mwillareal@inmegen.gob.mx (M.T. Villarreal-Molina).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.011>

Received 6 April 2017; Received in revised form 18 May 2017; Accepted 5 June 2017
 0378-1119/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

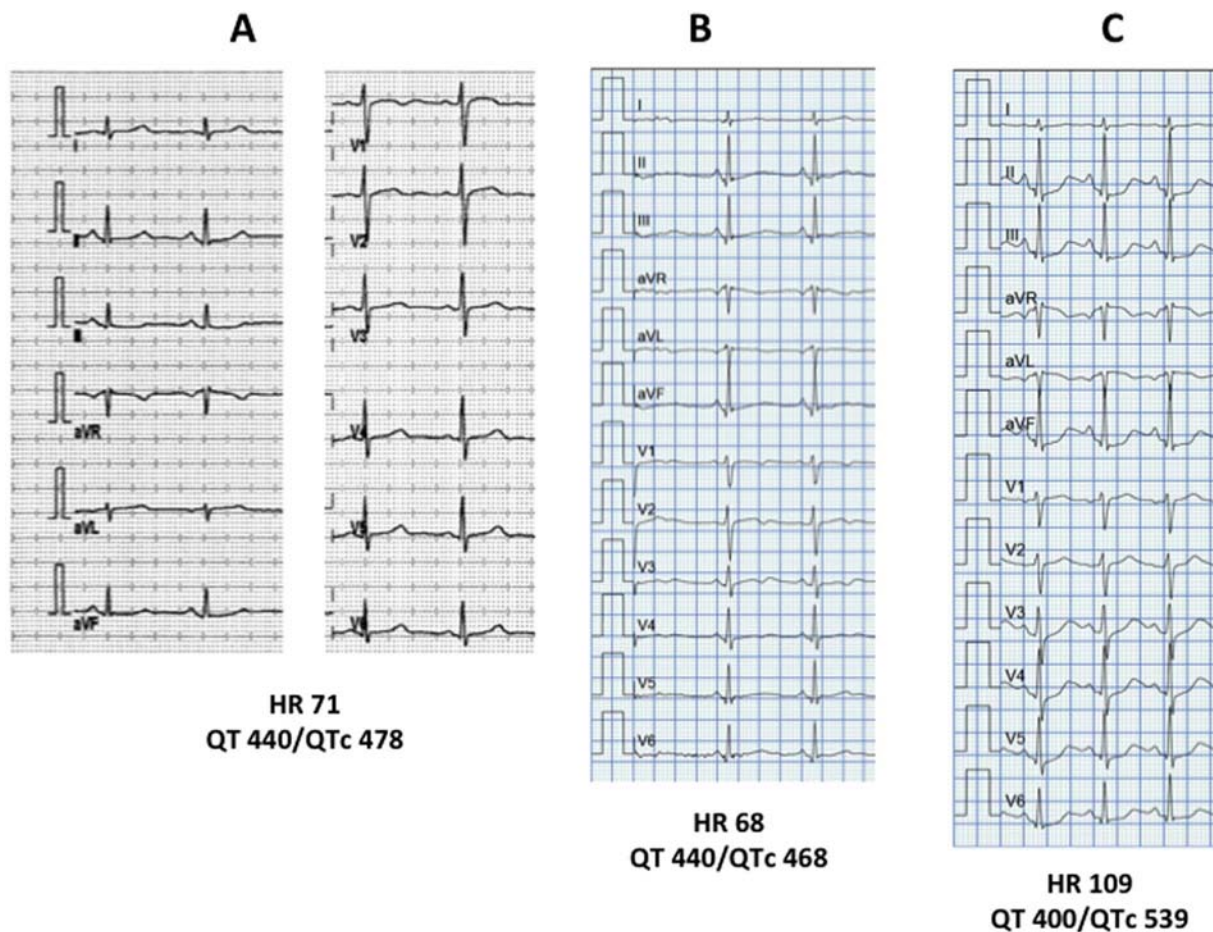


Fig. 1. ECG of the proband's mother. A. Baseline 12-lead ECG. B. Baseline ECG during exercise treadmill test. C. QTc interval at minute 3 of recovery after the exercise stress test.

Miles & Behr, 2016). Moreover, determining the pathogenicity of a given variant is crucial, but not always easy to achieve. When a variant of unknown clinical significance (VUS) is found, pathogenicity should be clarified through review of the literature, segregation analysis in the family, and ideally, by performing *in vitro* functional studies. Protein modeling can also be a valuable tool to propose hypotheses on the structural basis of disease variant/phenotype relationships (Howard et al., 2007; Smith et al., 2007; Wiener et al., 2008; Kang et al., 2008; Xu & Minor, 2009; Gofman et al., 2012; Sachyani et al., 2014; Nakajo & Kubo, 2015).

We present here a case of a 7 year-old girl who suffered sudden unexpected death, whose parents refused an autopsy. Eleven months after the event, the parents sought answers and were concerned with the risk of sudden death for the girl's 5 year-old sibling. On explaining the risks of surrogate genetic testing, the parents recalled that umbilical cord cells had been stored at birth, and were used for *post-mortem* genetic analysis. Next generation sequencing revealed the girl was compound heterozygous for two *KCNQ1* gene variants (Ala300Thr/Pro535Thr). Review of the literature, family segregation analysis and protein modeling strongly suggested that the girl suffered a recessive form of Romano Ward syndrome.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The parents of a girl who died suddenly at age 7 were referred to the National Institute of Genomic Medicine in Mexico City 11 months after her death, seeking *post-mortem* diagnosis. The girl had apparently

normal hearing and a history of self-limited syncope associated with physical activity, which began at age 5 years. A total of 7 syncope events between ages 5 and 7 were referred. She was misdiagnosed with benign dysautonomia at age 6 and was treated with propranolol for six months. Propranolol treatment was suspended after a negative head-up tilt table test, and exercise/stress-induced syncope recurred five months later. At age 7 years, cardiac arrest occurred while jumping on a bungee trampoline. Basic cardiopulmonary resuscitation (CPR) was provided by an untrained bystander, but the child remained unresponsive. She arrived at the emergency room 20 min later, received advanced cardiac life support and mechanical ventilation for 30 min, and recovered sinus rhythm. QTc measurement on a post-cardiac arrest ECG was 454 ms, but unreliable for long QT syndrome diagnosis because of induced therapeutic hypothermia and electrolytic imbalances. Cardiac arrest recurred 14 h later, and advanced CPR measures were unsuccessful. The parents refused an autopsy. Several months later, at the suggestion of their physician, they sought genetic testing for inherited arrhythmia. Because umbilical cord blood had been stored at a private blood bank at birth, they were used for *post-mortem* genetic testing.

On interrogation, family history was uneventful. Both parents and a younger brother were asymptomatic, and had normal physical examinations and echocardiograms. The father and sibling had normal QTc measurements (415 ms and 432 ms respectively), with normal ST and T wave morphology at rest and during exercise-treadmill testing. The 40-year old mother's longest QTc interval was 478 ms with normal T wave morphology (Schwartz criteria score = 3.5); however, exercise-treadmill testing showed a significant increase in QTc interval with repolarization abnormalities (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1).

The patient and her first-degree relatives were included in the

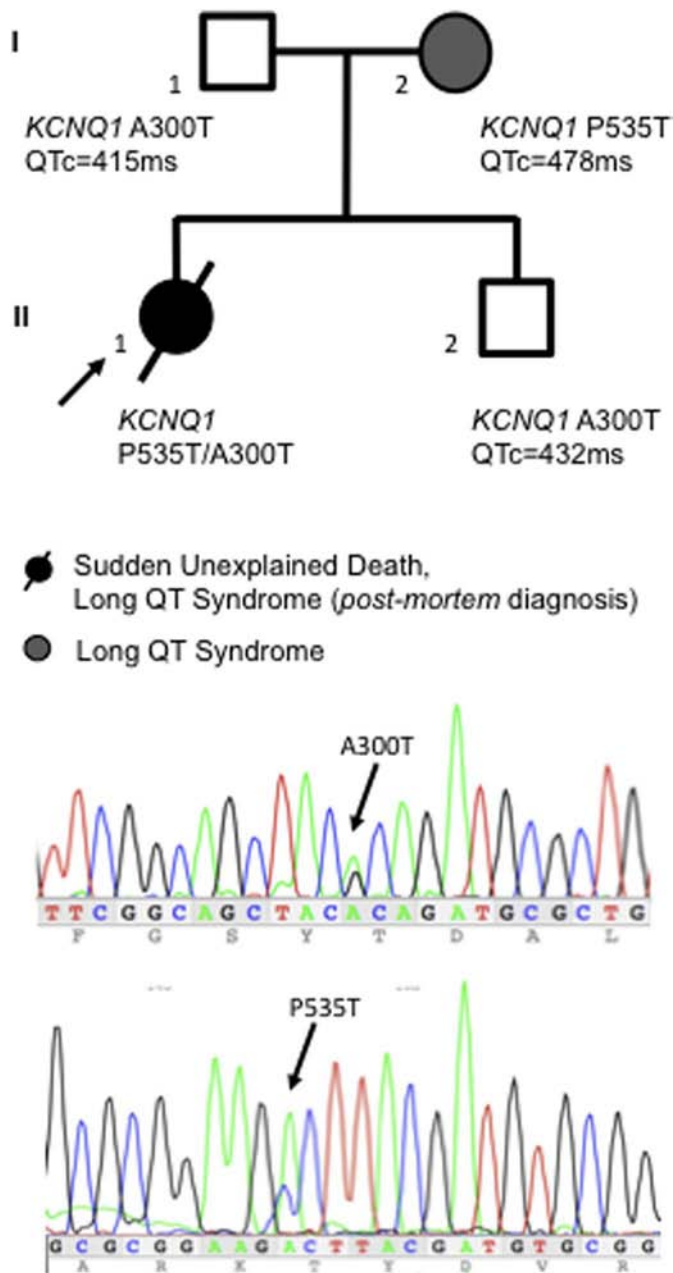


Fig. 2. A. Family pedigree. B. Electropherograms of the p.Ala300Thr and p.Pro535Thr *KCNQ1* variants.

Clinical and Genomic Study of Sudden Death, approved by Ethics Committee of the National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN) in Mexico City. Written informed consent was obtained from both parents. A clinical evaluation, electrocardiograms and blood samples were obtained from first-degree relatives. Umbilical cord cells of the index case were obtained from a private blood bank.

2.2. Molecular diagnosis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples and umbilical cord cells using commercial methods (Qiagen DNA Midi blood Kit). A DNA library from the index case covering coding exons and intronic flanking regions of 81 cardiogenes (Supplementary Table 1) was sequenced on a Mi-Seq (Illumina) platform. Targeted enrichment was performed using a custom Haloplex design (Agilent Technologies). Post-run sequencing quality was assessed with FastQC

(Babraham Bioinformatics, UK). Sequence reads were analyzed with BWA Enrichment v2.1.0 using BaseSpace. Variation reports were annotated using Annovar software (Yang & Wang, 2015). Variants predicted as damaging or deleterious were confirmed by Sanger sequencing.

2.3. *KCNQ1* (Kv7.1) protein modeling

Sequence of wild type Kv7.1 was downloaded from UniprotKB (The UniProt Consortium, 2017) ID P51787, identical to ENST00000155840 in Ensembl (Bronwen et al., 2016). Amino acid sequence structure signatures were explored with ProSite (Sigrist et al., 2013). Homologous or partial Kv7.1 structures were obtained from the Protein Data Bank (PDB ID: 3BJ4, 3HFE, 4V0C, 2A79, 2R9R, 4JTC) (Wiener et al., 2008; Xu & Minor, 2009; Sachyani et al., 2014; Long et al., 2005; Long et al., 2007; Banerjee et al., 2013). BLAST (Altschul et al., 1990) was used for sequence comparison and alignment; GOR IV (Garnier et al., 1996) was used for secondary structure prediction; and Phyre2 (Kelley et al., 2015) was used for threading, homology and *ab initio* modeling. Initial sequence alignments were performed with Clustal Omega (Sievers et al., 2011). All other modeling, structural edition and visualization tasks were performed with Molecular Operating Environment package (Molecular Operating Environment (MOE), 2013). Alignment was adjusted based on structure to favor location of indels on external loops. One hundred initial structures were built randomly, selecting compatible main chain segments and amino acid conformations from MOE libraries, in order to model indel regions and side chain replacements, respectively. Energy of initial models was minimized in MOE using CHARMM27 force field, with distance-dependent description of electrostatics (MacKerell et al., 2004). Minimization was completed when the average energy gradient reached 0.05 kcal/(mol·Å). The best structure according to MOE folding parameters was further refined until the energy gradient was below 0.01 kcal/(mol·Å). All structures were validated and no stereo-chemical drawbacks were observed. Detailed models of the tetrameric transmembrane (TM) region were constructed for all six possible wildtype/Ala300Thr combinations, using the PDB 2R9R structure as template and building each monomer in the presence of the others. Structural effects of Ala300Thr were estimated as the root mean square distance (RMSD) between alpha carbons of the wildtype (WT) and mutant structures. Elnémo (Suhre & Sanejouand, 2004) was used for structural mobility analyses. Mobility was estimated from the combination of the first 100 normal modes of vibration with the highest degree of collective motion. Single B or temperature factors of each atom in the structure were estimated as $B = (8\pi^2 / 3) \langle R^2 \rangle$, where $\langle R^2 \rangle$ represents the average atomic displacement from its initial position (Trueblood et al., 1996).

3. Results

3.1. Sequencing

NGS revealed the presence of 16 missense variants in the 81 cardiogenes (no nonsense or splice variants were found). Only four of these variants had a minor allele frequency < 0.001 according to the 1000 Genomes Project and Exome Aggregation Consortium databases (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015; Lek et al., 2016), and only two variants found in *KCNQ1* were predicted as deleterious or damaging by > 4 functional prediction programs (Kumar et al., 2009; Chun & Fay, 2009; Adzhubei et al., 2010; Schwarz et al., 2010; Shihab et al., 2013). These two variants were RefSeq NM_000218.2:c.898G > A, NP_000209.2:p.Ala300Thr (rs120074187) and the novel RefSeq NM_000218.2:c.1603C > A, NP_000209.2:p.Pro535Thr (O'Leary et al., 2016). Sanger sequencing confirmed that the proband carried both variants, the father and brother were heterozygous for the Ala300Thr variant, and the mother was heterozygous for the Pro535Thr variant (Fig. 2). The Pro535Thr variant was considered as of unknown

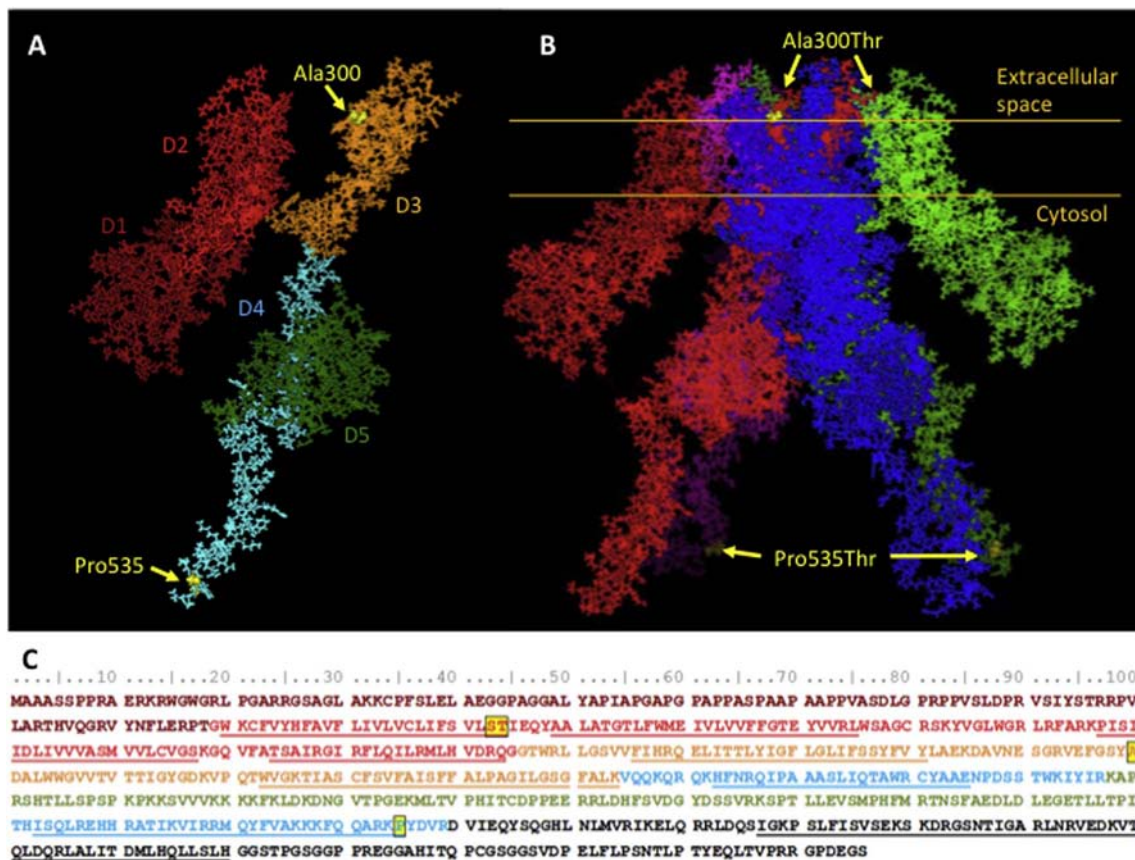


Fig. 3. Molecular model of Kv7.1. **A.** Molecular model of the structural regions or domains of a monomeric chain. Positions of Ala300 (D3) and Pro535 (D4) residues are highlighted in yellow. D6 is not shown. **B.** Molecular model of the tetramer embedded in the cell membrane. **C.** The Kv7.1 amino acid sequence (676 residues). The color code of the sequences matches that used to recognize protein domains in panel A. Underlined residues correspond to relevant helices: TM helices S1–S4 in D2 (red); TM helices S5 and S6 in D3 (orange); helices A and B in D4 (cyan); and D6 tetramerization helix (black). Residues Ser143, Thr144, Ala300 and Pro535 are boxed in yellow. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

clinical significance (VUS) according to the criteria described by Campuzano et al. (2015).

3.2. Kv7.1 modeling

A total of 10 models were built (Supplementary Table 2). According to Protein Data Bank, the sequences most homologous to the Kv7.1 (UniProtKB ID: P51787) covered only 16 to 30% of the sequence, with identity ranging from 29 to 100% per segment. We thus used the Phyre2 server in the intensive modeling mode to model the complete Kv7.1 sequence. The best-ranked Kv7.1 model produced in different non-deterministic trials is shown in Fig. 3A. The Kv7.1 amino acid sequence was parsed in six different structural regions or domains. Domain 1 (D1) at the N-terminus is 118 amino acids long, has no homology to crystallized structures, and seems to be intrinsically disordered because of its high content of proline residues. D1 is followed by two TM domains: D2 (127aa) and D3 (109 aa), homologous to the crystallized Shaker potassium channel Kv1.2 (PDB 2A79 and 2R9R). D2 and D3 correspond to the structural archetype for the pore domains of all Kv channels, with four TM helices or segments S1 to S4 in D2, and two TM helices or segments S5 and S6 in D3. These domains form the potassium channel upon tetramerization (Fig. 3B). Domain 4 (D4) contains two helices: helix A (43 aa) and helix B (39 aa), separated by a 103 aa residue domain (D5). D6 is a 137 aa C-terminus domain formed by two helices prone to tetramerize as determined by X-ray crystallography PDB 3BJ4 (not shown in the model). The Ala300Thr variant is located in D3 facing the extracellular space, while Pro535Thr is located in the cytoplasmic region at the end of D4, > 40 Å away from the Ala300 residue.

3.3. Kv7.1/Ala300Thr

Fig. 4 describes the structure of Kv7.1 tetramer formed by four Thr300 mutant chains. Ala300Thr is the first residue of the membrane re-entrant segment in the pore-lining P-loop. All mutant residues face the extracellular space showing no interactions among each other, and lie at the interface with a neighboring monomer (Fig. 4A and B). The Thr300 hydroxyl groups are predicted to form hydrogen bonds with Ser143 and Thr144 at the end of the S1 helix of the adjacent monomer. These hydrogen bonds cause a conformational distortion of the involved monomers, slightly affecting the backbone conformation around position 300 (RMSD = 0.26 Å for residues 297–303), and causing noticeable rearrangement of the Ser143/Thr144 region of the neighboring chain (RMSD = 1.14 Å for residues 140–147) (Fig. 4C).

3.4. Mobility profiles

Fig. 5A shows the six possible Ala300Thr tetramer combinations in a heterozygous carrier, modeled to test mobility profiles without considering the possible effect of the Pro535Thr variant (Fig. 5A). Fig. 5B depicts the differences in mobility per atom (ΔB factor) for a specific monomer (outlined in bright red) in each mutant tetramer (b, c, d, e and f) as compared to the mobility of the same monomer in the wild-type tetramer (a). Regions in the D2 inter-helical segments (S1–S4) of the monomers adjacent to the Thr300 mutant showed both increases and decreases in mobility, up to 20-fold greater in magnitude than changes in segment containing the Thr300 residue. The tetramer formed by four mutant monomers (f) or more than one adjacent mutant monomers (d, e) showed the highest mobility changes, while the

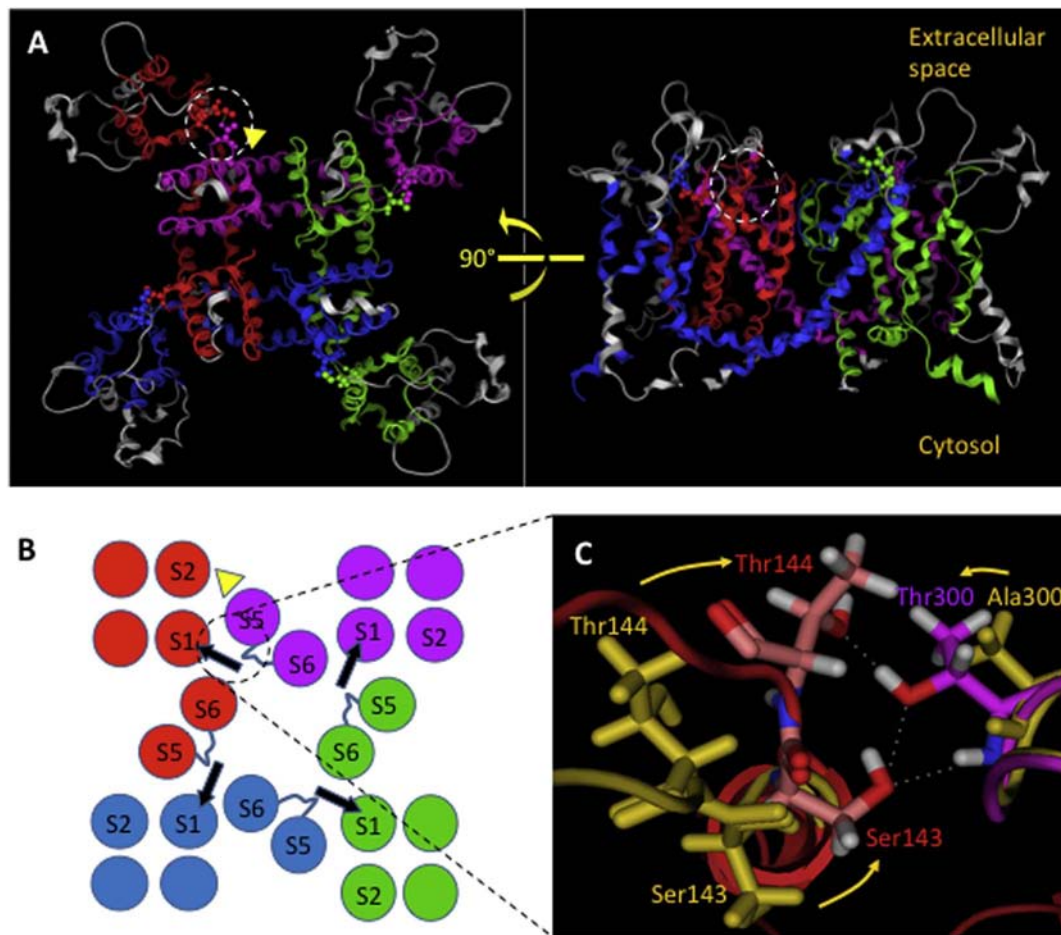


Fig. 4. Detailed model of the transmembrane region of a quadruple Thr300 mutant. Each monomer is represented in a different color. Yellow triangles mark the KCNE1-subunit binding sites identified by Gofman et al. (2012). A. Upper and lateral views emphasizing the effect of Thr300 on the neighboring subunits. Dotted ellipses highlight the interaction between Thr300 (magenta subunit) and Ser143/Thr144 (red subunit). White ribbons denote regions of highly altered mobility induced by Thr300. B. Schematic representation of TM helices. Black arrows indicate the structural effect of Thr300 on the neighboring chains. C. Atomic detail of the interaction between the magenta Thr300 and the red Ser143/Thr144 residues. Comparison with the wildtype structure (gold) shows the conformational rearrangements of segments 140–147 and 297–303 caused by the variant and used for RMSD calculations. Dotted lines represent hydrogen bonds. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mobility of tetramers formed by only one monomer (b) or two alternate mutant monomers (c) was affected to a lesser extent. Supplementary Figs. S2–S4 show ΔB factor differences for the remainder monomers. Supplementary Data Set 1 describes the estimated ΔB factors per atom per monomer in each possible tetramer.

3.5. *Kv7.1/Pro535Thr*

The Pro535Thr variant is located in the cytoplasmic region at the end of D4. This domain was modeled based on a solved crystal structure of the Kv7.1 proximal C-terminal domain in complex with calmodulin (PDB 4V0C), considering that helices A and B of the same monomer interact in an antiparallel fashion. This interaction produces a hairpin like structure forming a calmodulin (CaM) binding site, where D5 might act as a hinge (Fig. 6A and B). Helix A extends into the cytosol as a rigid body, delimited by a kink produced by Pro369. Arg533, Lys534 and Pro535 make a strong ending signal for helix B. A threonine at position 535 is predicted by GOR IV to extend the helix (Fig. 6A and C). The longer B helix would clash with the cytoplasmic loop connecting S4 to S5, preventing the formation of the CaM binding site by steric hindrance.

4. Discussion

Sudden death in a child is devastating event and has important

medical implications for surviving relatives. Because SUD may be the first manifestation of an unknown inherited cardiac disease, the molecular autopsy can be helpful to determine the cause of death and to identify at risk family members for further adoption of preventive strategies (Semsarian et al., 2015). Despite that current forensic guidelines recommend molecular autopsy as part of routine protocol in SUD cases, in Mexico molecular autopsy is not yet included or offered as standard of care in forensic protocols. Facing the devastation of sudden death in a young person, it is not uncommon for parents or family to refuse an autopsy when legally possible. However, it is much easier for them to assent to retention of blood or tissue of the SUD victim when this possibility is offered. This is particularly important given the risks of surrogate genetic testing (Ackerman, 2016).

Post-mortem genetic analysis revealed that the girl was compound heterozygous for two *KCNQ1* variants (Ala300Thr/Pro535Thr). *KCNQ1* is the major LQTS-causing gene, and over 500 *KCNQ1* mutations have been reported in LQTS (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, 1985). Heterozygous *KCNQ1* mutations cause the dominantly inherited Romano Ward syndrome (LQTS type 1), while homozygous or compound heterozygous *KCNQ1* mutations cause Jervell Lange-Nielsen syndrome (JLNS), a rare recessive form of LQTS characterized by marked QT prolongation and congenital sensorineural deafness. Interestingly, some individuals with mutations on both *KCNQ1* alleles present without deafness (recessive Romano Ward syndrome), which may represent a more common pattern of LQTS inheritance than previously

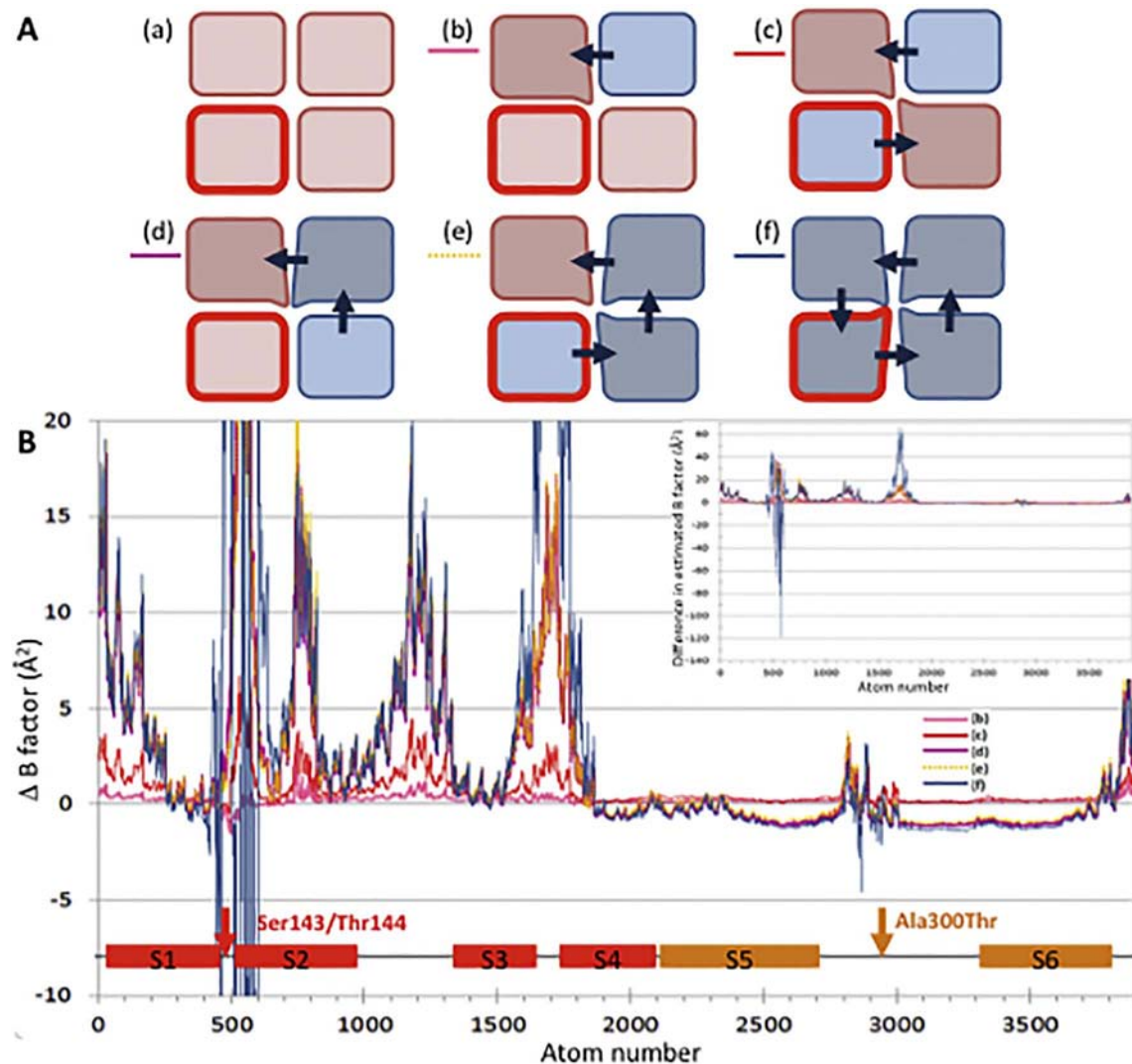


Fig. 5. Mobility differences of the wildtype versus mutant tetramers. **A.** Six possible tetramer combinations. Paternal Thr300 chains are shown in blue and maternal Thr535 chains in pink. Arrows indicate the structural distortion caused by Thr300 on the nearby subunit (in darker shade). **B.** Plot showing differences in B factor (Δ B factor) per atom of possible mutant (b, c, d, e and f) as compared to the wildtype (a) tetramer. Combination (f) showed the most disturbed mobility pattern, followed by combinations (d) and (e). Segments corresponding to transmembrane helices are shown in red (D2) and orange (D3). Yellow arrows show positions of Ser143/Thr144 and Thr300 residues. Inset shows the same graph at full scale. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

anticipated. It has been suggested that these individuals should be treated as a higher-risk LQTS subgroup similar to their JLNS counterparts (Giudicessi & Ackerman, 2013). The compound heterozygous mutations and the severe phenotype observed in the index case are compatible with autosomal recessive Romano Ward syndrome (Westenskow et al., 2004).

Confirming the pathogenicity of causal mutations remains a serious challenge in molecular diagnosis of inherited disease. While biophysical characterization of mutants in heterologous systems is widely used to try to establish the causality of mutations in channelopathies, structural protein modeling can help conceptualize the different functional effects of particular mutations (Yang et al., 2009). Protein modeling is widely applicable, and when combined with experimental biophysical experiments provide better insight and may even produce results of significant biomedical impact (Howard et al., 2007; Smith et al., 2007; Wiener et al., 2008; Kang et al., 2008; Xu & Minor, 2009; Gofman et al., 2012; Sachyani et al., 2014; Nakajo & Kubo, 2015; Schwede et al., 2008).

While the Ala300Thr variant has been previously reported as a mild variant causing LQTS only in the homozygous state, the Pro535Thr variant is novel and is a VUS according to the criteria of Campuzano

et al. (2015). The mother who was heterozygous for the Pro535Thr variant was asymptomatic and showed a borderline QTc measurement, however exercise significantly increased the QTc interval and induced repolarization abnormalities. We thus used protein modeling to gain further insight into the mechanisms causing severe LQTS in the index case, and milder LQTS in the mother.

4.1. Kv7.1 model

In accordance with previous models (Howard et al., 2007; Smith et al., 2007; Wiener et al., 2008; Kang et al., 2008; Xu & Minor, 2009; Gofman et al., 2012; Sachyani et al., 2014; Nakajo & Kubo, 2015), our model shows that Kv7.1 has a canonical voltage-gated potassium channel (Kv) structure, composed of four alpha subunits arranged as a tetramer. Each subunit has six transmembrane helices (S1–S6); S1–S4 form the voltage-sensing domain (VSD) and S5–S5 form the pore-domain (PD). The membrane re-entrant loop between S5 and S6 forms the ion selectivity filter (Taylor & Sanders, 2017). D4 corresponds to the intracellular helices A and B that form a CaM-binding site previously crystalized and described by Sachyani et al. (2014); and D6 was not modeled, but corresponds to helices C and D that form a tetrameric

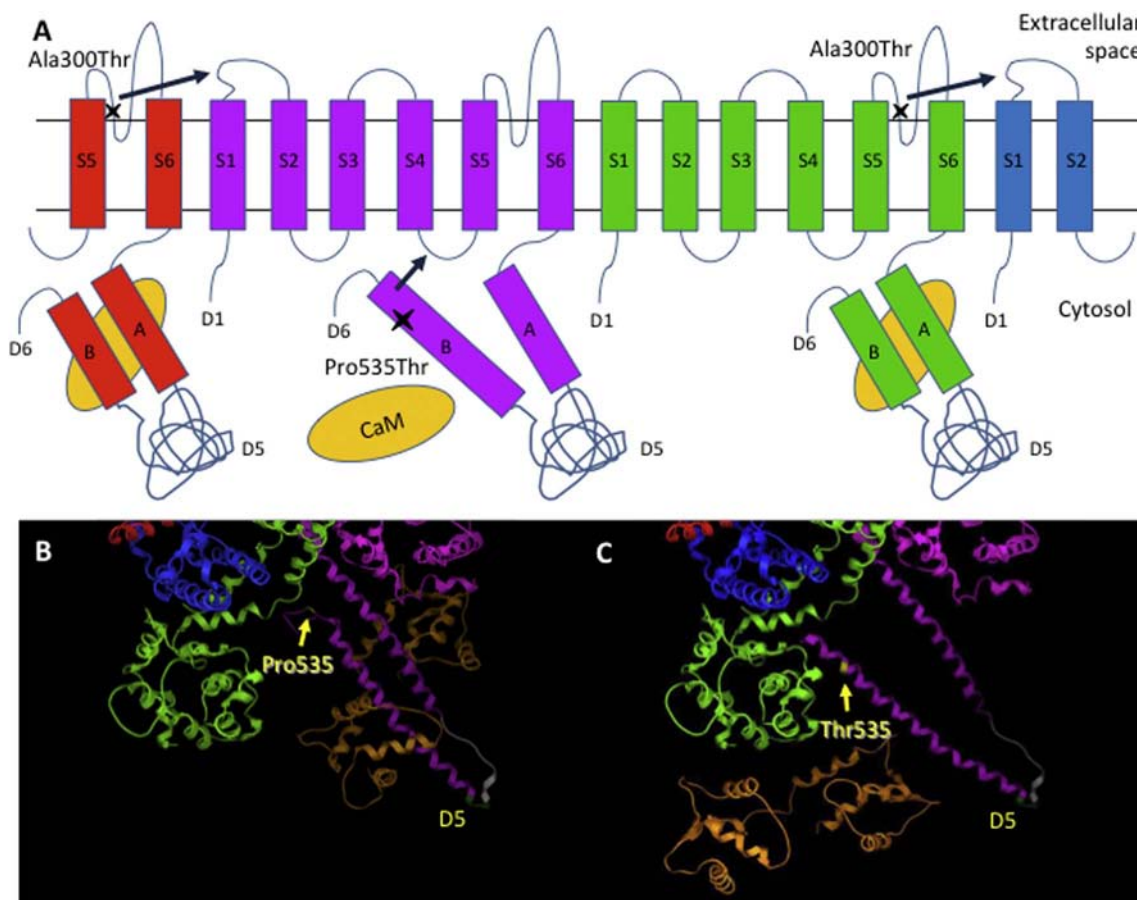


Fig. 6. Predicted effect of the Pro535Thr variant. **A.** Simplified topology of a Kv7.1 tetramer conformed by alternate Thr300 and Thr535 monomers. The threonine residue at position 535 is predicted to elongate helix B. The elongated helix would clash with an inter-helix loop, impeding the formation of the calmodulin-binding site. Calmodulin is represented as an orange ellipse. **B.** Model of wildtype domain 4 of the magenta monomer bound to calmodulin (orange). **C.** Model of mutant Thr535 domain 4 (magenta monomer), unbound to calmodulin. D5 (103 aa) has been omitted, and is represented as a small dark green fragment. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

parallel coiled coil (Howard et al., 2007; Wiener et al., 2008).

4.2. KCNQ1/Ala300Thr

The Ala300Thr variant was first described as causal of a recessive form of Romano Ward in a homozygous child with normal hearing. Both parents were heterozygous Ala300Thr carriers and had normal QTc intervals, even after exercise (Priori et al., 1998). Immunofluorescent staining demonstrated that the Thr300 mutant Kv7.1 is transported to the cell surface (Bianchi et al., 2000). Interestingly, although this variant has been considered as gain of function (GOF) (Smith et al., 2007; Kang et al., 2008), the electrophysiological phenotype is in fact mixed, showing a severe reduction in total current, a faster activation rate and a hyperpolarizing shift in activation. The combination of these features would render the Ala300Thr a mild loss of function variant (Priori et al., 1998; Bianchi et al., 2000).

In agreement with previous Kv7.1 models, our WT model predicted the location of Ala300 in the P-loop helix, near the most distal S1 residues of the adjacent subunit (Smith et al., 2007; Kang et al., 2008). These models predicted that Ala300Thr lies within an inter-subunit cleft that interacts with the KCNE1 ancillary subunit (minK), known to modulate Kv7.1 activity by the delaying channel opening, shifting the voltage dependence of channel activation to more positive potentials, increasing single channel conductance and suppressing channel inactivation (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Lundby et al., 2010). Interestingly, several known GOF variants are located in this cleft, suggesting that they increase function by disrupting the

interaction of Kv7.1 with the minK transmembrane domain (Smith et al., 2007; Kang et al., 2008). However, in contrast with several GOF variants not located in the P-loop that increase whole-cell current (Ser140Gly, Val141Met, Ile274Val) (Smith et al., 2007), Ala300Thr severely decreases total current (Priori et al., 1998; Bianchi et al., 2000).

VSD and PD mobility are crucial in voltage-dependent gating, which involves voltage sensor activation, pore opening and VSD–PD coupling (Cui, 2016). According to the mobility analyses, the new hydrogen bonds predicted to occur between mutant Thr300 and Ser143/Thr144 would severely affect the mobility of S1–S2 interhelical segments of the adjacent monomer, and would slightly affect the mobility of residues surrounding Thr300. It is unclear how these mobility changes correlate with the biophysical phenotype of this variant, particularly the decreased current. However, it is clear that the Thr300 homotetramer, which is the only type of channel found in the Ala300Thr homozygote, showed the most severely affected mobility profile, very similar to that of tetramers formed by three or two adjacent Thr300 mutants. Interestingly, mobility patterns of tetramers including two non-adjacent or only one Thr300 chains were more similar to the WT tetramer.

4.3. KCNQ1/Pro535Thr

The biophysical consequences of the Pro535Thr variant have not been characterized, and whether the Thr535 mutant is expressed and reaches the cell membrane is currently unknown. Our model predicted that the presence of a threonine at position 535 would extend helix B,

and disrupt the formation of the CaM-binding site by steric hindrance. The CaM-binding module appears to have a dual function: a) a calcium sensor function affecting channel gating and stimulating Kv7.1 function; and b) a role in channel folding and trafficking (Ghosh et al., 2006; Haitin & Attali, 2008; Soldovieri et al., 2011). This suggests that the mutant subunits may have co-assembly or trafficking defects. If this were the case, the Pro535Thr variant in the mother would cause LQTS by haploinsufficiency. Moreover, in the compound heterozygous child, if only the mutant Thr300 chains tetramerize, this would simulate an Ala300Thr homozygous state, which is compatible with her severe phenotype. Although the model suggests the Pro535 variant is disruptive, an important limitation of this study is the need to characterize the biophysical phenotype of this variant, both in the presence and absence of minK before drawing definitive conclusions.

5. Conclusion

In summary, molecular autopsy using umbilical cord cells stored at birth revealed the presence of compound heterozygous *KCNQ1* variants in a child with sudden unexplained death. While one variant (Ala300Thr) is known to cause LQTS only in the homozygous state, the other variant (Pro535Thr) was of unknown clinical significance. Review of the literature, segregation and protein modeling strongly suggest that this child was affected with a recessive form of Romano Ward syndrome. In particular, protein modeling helped gain insight into the mechanisms by which the variants may cause LQTS.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.011>.

Declaration of interest

The authors wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT grant SALUD-2010-01-140259. Erika Antúñez Argüelles is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 221098 from CONACyT.

References

- Ackerman, J.P., Bartos, D.C., Kapplinger, J.D., Tester, D.J., Delisle, B.P., Ackerman, M.J., 2016. The promise and peril of precision medicine: phenotyping still matters most. *Mayo Clin. Proc.* 91, 1606–1616.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., Mackinnon, R., 2013. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. *elife* 2, e00594.
- Barhanian, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., Romey, G., 1996. K(V) LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384, 78–80.
- Bianchi, L., Priori, S.G., Napolitano, C., Surewicz, K.A., Dennis, A.T., Memmi, M., Schwartz, P.J., Brown, A.M., 2000. Mechanisms of I(Ks) suppression in LQT1 mutants. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H3003–H3011.
- Bronwen, L. A., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., Garcin Girón, C., Hourlier, T., Howe, K., Kähäri, A., Kokocinski, F., Martin, F. J., Murphy, D. N., Nag, R., Ruffier, M., Schuster, M., Tang, Y. A., Vogel, J. H., White, S., Zadiisa, A., Flicek, P., Searle, S. M. J., 2016. The Ensembl gene annotation system. *Database* baw093.
- Campuzano, O., Allegue, C., Fernandez, A., Iglesias, A., Brugada, R., 2015. Determining the pathogenicity of genetic variants associated with cardiac channelopathies. *Sci. Rep.* 5, 7953.
- Christiansen, S.L., Hertz, C.L., Ferrero-Miliani, L., Dahl, M., Weeke, P.E., LuCamp, Ottesen, G.L., Frank-Hansen, R., Bundgaard, H., Morling, N., 2016. Genetic investigation of 100 heart genes in sudden unexplained death victims in a forensic setting. *Eur. J. Hum. Genet.* 24, 1797–1802.
- Chun, S., Fay, J.C., 2009. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* 19, 1553–1561.
- Cui, J., 2016. Voltage-dependent gating: novel insights from KCNQ1 channels. *Biophys. J.* 110, 14–25.
- Garnier, J., Gibrat, J.F., Robson, B., 1996. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* 266, 540–553.
- Ghosh, S., Nunziato, D.A., Pitt, G.S., 2006. KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circ. Res.* 98, 1048–1054.
- Giudicessi, J.R., Ackerman, M.J., 2013. Prevalence and potential genetic determinants of sensorineural deafness in KCNQ1 homozygosity and compound heterozygosity. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6, 193–200.
- Gofman, Y., Shats, S., Attali, B., Haliloglu, T., Ben-Tal, N., 2012. How does KCNE1 regulate the Kv7.1 potassium channel? Model-structure, mutations, and dynamics of the Kv7.1-KCNE1 complex. *Structure* 20, 1343–1352.
- Haitin, Y., Attali, B., 2008. The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *J. Physiol.* 586, 1803–1810.
- Hoffman, J.L., 2013. The global burden of congenital heart disease. *Cardiovasc. J. Afr.* 24, 141–145.
- Howard, R.J., Clark, K.A., Holton, J.M., Minor, D.L., 2007. Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron* 53, 663–675.
- Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F.D., Smith, J.A., Meiler, J., George, A.L., Vanoye, C.G., Kim, H.J., Sanders, C.R., 2008. Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel. *Biochemistry (Mosc)* 47, 7999–8006.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J., 2015. The Rfam2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10, 845–858.
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C., 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4, 1073–1081.
- Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, J.S., Ware, A.J., Hill, B.B., Cummings, T., Tukiainen, D.P., Birnbaum, J.A., Kosmicki, L.E., Duncan, K., Estrada, F., Zhao, J., Zou, E., Pierce-Hoffman, J., Berghout, D.N., Cooper, N., DeFaux, M., DePristo, R., Do, J., Flannick, M., Fromer, L., Gauthier, J., Goldstein, N., Gupta, D., Howrigan, A., Kiezun, M.I., Kurki, A.L., Moonshine, P., Natarajan, L., Orozco, G.M., Peloso, R., Poplin, M.A., Rivas, V., Ruano-Rubio, S.A., Rose, D.M., Ruderfer, K., Shakir, P.D., Stenson, C., Stevens, B.P., Thomas, G., Tiao, M.T., Tusie-Luna, B., Weisburd, H.H., Won, D., Yu, D.M., Altshuler, D., Ardissino, M., Boehnke, J., Danesh, S., Donnelly, R., Elosua, J.C., Florez, S.B., Gabriel, G., Getz, S.J., Glatt, C.M., Hultman, S., Kathiresan, M., Laakso, S., McCarrroll, M.I., McCarthy, D., McGovern, R., McPherson, B.M., Neale, A., Palotie, S.M., Purcell, D., Saleheen, J.M., Scharf, P., Sklar, P.F., Sullivan, J., Tuomilehto, M.T., Tuang, H.C., Watkins, J.G., Wilson, M.J., Daly, D.G., MacArthur, C., 2016. Exome aggregation consortium, analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536, 285–291.
- Long, S.B., Campbell, E.B., Mackinnon, R., 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent shaker family K⁺ channel. *Science* 309, 897–903.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., Mackinnon, R., 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382.
- Lundby, A., Tseng, G.N., Schmitt, N., 2010. Structural basis for KV7.1–KCNE interactions in the IKs channel complex. *Heart Rhythm* 7, 708–713.
- MacKerell, A.D., Feig, M., Brooks, C.L., 2004. Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 698–699.
- Michaud, K., Fellmann, F., Abriel, H., Beckmann, J.S., Mangin, P., Elger, B.S., 2009. Molecular autopsy in sudden cardiac death and its implication for families: discussion of the practical, legal and ethical aspects of the multidisciplinary collaboration. *Swiss Med. Wkly.* 139, 712–718.
- Miles, C.J., Behr, E.R., 2016. The role of genetic testing in unexplained sudden death. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 168, 59–73.
- Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, (2017).
- Nakajo, K., Kubo, Y., 2015. KCNQ1 channel modulation by KCNE proteins via the voltage-sensing domain. *J. Physiol.* 593, 2617–2625.
- O'Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C.M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V.S., Kodali, V.K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K.M., Murphy, M.R., O'Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S.H., Rausch, D., Riddick, L.D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S.S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R.E., Vatsan, A.R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M.J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T.D., Pruitt, K.D., 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D733–D745.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 607542: Date last edited: 05/02/2017. World Wide Web URL: <https://omim.org/>.
- Priori, S.G., Schwartz, P.J., Napolitano, C., Bianchi, L., Dennis, A., De Fusco, M., Brown, A.M., Casari, G., 1998. A recessive variant of the Romano-Ward long-QT syndrome? *Circulation* 97, 2420–2425.
- Sachyani, D., Dvir, M., Strulovich, R., Tria, G., Tobelaim, W., Peretz, A., Pongs, O., Svergun, D., Attali, B., Hirsch, J.A., 2014. Structural basis of a Kv7.1 potassium channel gating module: studies of the intracellular c-terminal domain in complex with calmodulin. *Structure* 22, 1582–1594.
- Sanguinetti, M.C., Curran, M.E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L., Keating, M.T., 1996. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384, 80–83.
- Schwarz, J.M., Rödelsperger, C., Schuelke, M., Seelow, D., 2010. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat. Methods* 7, 575–576.

- Schwede, T., Sali, A., Honig, B., Levitt, M., Berman, H.M., Jones, D., Brenner, S.E., Burley, S.K., Das, R., Dokholyan, N.V., Dunbrak, R.L., Fidelis, K., Fiser, A., Godzik, A., Huang, Y.J., Humblet, C., Jacobson, M.P., Joachimiak, A., Krystek, S.R., Kortemme, T., Kryshchuk, A., Montelione, G.T., Mout, J., Murray, D., Sanchez, R., Sosnick, T.R., Standley, D.M., Stouch, T., Vajda, S., Vasquez, M., Westbrook, J.D., Wilson, I.A., 2008. Outcome of a workshop on applications of protein models in biomedical research. *Structure* 17, 151–159.
- Semsarian, C., Ingles, J., Wilde, A.A.M., 2015. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *Eur. Heart J.* 36, 1290–1296.
- Shihab, H.A., Gough, J., Cooper, D.N., Stenson, P.D., Barker, G.L.A., Edwards, K.J., Edwards, K.J., Day, I.N.M., Gaunt, T.R., 2013. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum. Mutat.* 34, 57–65.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Sigrist, C.J., de Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41, D344–D347.
- Smith, J., Vanoye, C.G., George, A.L., Meiler, J., Sanders, C.R., 2007. Structural models for the KCNQ1 voltage-gated potassium channel. *Biochemistry (Mosc)* 46, 14141–14152.
- Soldovieri, M.V., Miceli, F., Tagliatela, M., 2011. Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology* 26, 365–376.
- Steinberg, C., Laksman, Z.W.M., Krahn, A.D., 2016. Sudden cardiac death: a reappraisal. *Trends Cardiovasc. Med.* 26, 709–719.
- Suhre, K., Sanejouand, Y.H., 2004. Elnemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Res.* 32, W610–W614.
- Taylor, K.C., Sanders, C.R., 2017. Regulation of KCNQ/Kv7 family voltage-gated K⁺ channels by lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 586–597.
- Tester, D.J., Ackerman, M.J., 2005. Genetic testing for cardiac channelopathies: ten questions regarding clinical considerations for heart rhythm allied professionals. *Heart Rhythm* 2, 675–677.
- Tester, D.J., Ackerman, M.J., 2012. The molecular autopsy: should the evaluation continue after the funeral? *Pediatr. Cardiol.* 33, 461–470.
- The 1000 Genomes Project Consortium, 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68–74.
- The UniProt Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169.
- Trueblood, K.N., Bürgli, H.B., Burzlaff, H., Dunitz, J.D., Gramaccioni, C.M., Schulz, H.H., Shmueli, U., Abrahams, S.C., 1996. Atomic displacement parameter nomenclature. Report of a subcommittee on atomic displacement parameter nomenclature. *Acta Cryst.* A52, 770–781.
- Westenskow, P., Splawski, I., Timothy, K.W., Keating, M.T., Sanguinetti, M.C., 2004. Compound mutations. *Circulation* 109, 1834–1841.
- Wiener, R., Haitin, Y., Shamgar, L., Fernández-Alonso, M.C., Martos, A., Chomsky-Hecht, O., Rivas, G., Attali, B., Hirsch, J.A., 2008. The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *J. Biol. Chem.* 283, 5815–5830.
- Xu, Q., Minor, D.L., 2009. Crystal structure of a trimeric form of the KV7.1 (KCNQ1) A-domain tail coiled-coil reveals structural plasticity and context dependent changes in a putative coiled-coil trimerization motif. *Protein Sci.* 18, 2100–2114.
- Yang, H., Wang, K., 2015. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat. Protoc.* 10, 1556–1566.
- Yang, T., Chung, S.K., Zhang, W., Mullins, J.G.L., McCulley, C.H., Crawford, J., McCormick, J., Eddy, C.A., Shelling, A.N., French, J.K., Yang, P., Skinner, J.R., Roden, D.M., Rees, M.I., 2009. Biophysical properties of 9 KCNQ1 mutations associated with long QT syndrome (LQTS). *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2, 417–426.