



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de
Salud.

Campo de Conocimiento: Investigación Clínica Experimental en Salud.

Campo Disciplinario: Bioquímica Clínica

Área: Genómica Aplicada a la Salud

Estudio Clínico y Genómico de las Arritmias Hereditarias Mediante Secuenciación de Nueva Generación

Tesis

Que para optar por el grado de:
Maestro en ciencias de la Salud

Que presenta la alumna de Maestría
M.C. Gabriela Paola García Ordoñez

Tutor de tesis
Dra. María Teresa Villarreal Molina
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad Universitaria, CD. MX., febrero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

“... esforzándonos en hacer lo mejor que podemos nos acercaremos al éxito, y que el éxito de nuestros propósitos, la mejora de la humanidad de hoy y del futuro, merece la pena de conseguirse.”
- Rosalind Franklin

Agradecimientos

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

Particularmente a mi tutora, la Dra. María Teresa Villarreal, por la confianza y apoyo brindado. A la Dra. Carmen Aláez y la Dra. Petra Yescas, miembros de mi comité tutor.

Al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCIICH) y a su Departamento de Electrofisiología, donde fue estudiado y discutido cada caso.

Al Dr. Pedro Iturralde, al Dr. Santiago Nava, la Dra. Gabriela Bustillos Garcia y al Dr. Alvaro Reyes Quintero, por su relevante labor en la selección y estudio clínico de los casos.

Resumen

Las arritmias hereditarias (AHs) o canalopatías arritmogénicas son enfermedades que con frecuencia producen sintomatología grave desde la infancia. En su conjunto, estas enfermedades son una causa conocida de muerte súbita, particularmente en individuos jóvenes. En una proporción elevada de los casos, el entender la significancia y las implicaciones clínicas de los hallazgos genéticos y moleculares sigue siendo todo un reto y un campo amplio de investigación. En este estudio se analizaron clínicamente y genómicamente 72 casos de pacientes mexicanos con AHs incluyendo síndrome de QT largo (SQTL), síndrome de Brugada (SBr), disfunción del nodo sinusal (DNS), taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica (TVCP) y síndrome de QT corto (SQTC), para describir el espectro de mutaciones y su relación con el fenotipo de la enfermedad. El estudio genómico incluyó secuenciación de nueva generación sitio-dirigida, confirmación por secuenciación Sanger, así como amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) y secuenciación de exoma en algunos casos. Cuando fue posible, se hizo análisis de cosegregación en familias. El rendimiento diagnóstico global (proporción de pacientes con al menos una variante clasificada como patogénica o probablemente patogénica) fue mayor al 50%. Se encontró evidencia de que el gen *RYR2* puede ser de susceptibilidad para SQTL, y casos con posible causa digénica u oligogénica de la enfermedad en pacientes con SBr y SQTL. El estudio molecular cambió el diagnóstico clínico en un caso, y se observaron casos con las mismas afecciones en el gen *SCN5A* y fenotipos mixtos. Los hallazgos encontrados en esta población pueden nutrir las bases de datos para incrementar el conocimiento sobre estas enfermedades, las mutaciones que las causan, y contribuir a la reclasificación de variantes de acuerdo con su patogenicidad.

Abstract

Hereditary arrhythmias (HAs) or arrhythmogenic channelopathies are diseases that frequently cause severe symptoms since childhood. These diseases may cause sudden death, particularly in young individuals. In a high proportion of cases, understanding the significance and clinical implications of genetic and molecular findings is challenging, representing a broad field of research. In the present study, 72 cases of Mexican patients with HAs including long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome (BrS), sick sinus syndrome (SSS), catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) and short QT syndrome (SQTS) were submitted to clinical and genomic studies to describe the spectrum of mutations and their relationship with their phenotypes. The genomic study included site-directed next-generation sequencing, confirmation by Sanger sequencing, as well as multiple ligand probe amplification (MLPA) and exome sequencing in some cases. When possible, co-segregation analysis within families was analyzed. Overall diagnostic yield (the proportion of patients with at least one pathogenic or likely pathogenic variant) was greater than 50%. Analyzing individual cases, we found evidence of a possible role of the *RYR2* gene in LQTS susceptibility, two cases with a possible digenic or oligogenic cause of the disease, one case where molecular diagnosis changed the initial clinical diagnosis (SQTS), and cases with the same *SCN5A* gene variant with mixed phenotypes were observed. These findings in the Mexican population may provide information to databases increasing knowledge on hereditary arrhythmias, the mutations causing them, and may contribute to reclassify variants according to their pathogenicity.

Lista de abreviaciones

- AV Aurículo-ventricular
- CaM Calmodulina
- CaMKII Cinasa calmodulina dependiente de Ca²⁺
- CAs Canalopatías arritmogénicas
- DAI Desfibrilador automático implantable; cardiovertidor implantable
- DNA Ácido desoxiribonucleico
- DNS Disfunción del nodo sinusal
- ECG Electrocardiograma/electrocardiográfico
- FC Frecuencia cardiaca
- HEK riñón humano embrionario (human embryonic kidney)
- ICaL Corriente de calcio tipo L
- INa Corriente de sodio
- Ik Corriente de potasio
- LCIC Liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺
- CMP Cardiomiopatía
- MS Muerte súbita
- MSC Muerte súbita cardiaca
- MSR Muerte súbita recuperada
- NAV Nodo auriculoventricular
- Nav1.5 Subunidad α del canal de sodio cardiaco
- NCX Intercambiador sodio-calcio
- NS Nodo sinusal
- lpm Latidos por minuto
- PA Potencial de acción
- RS Retículo sarcoplásmico
- RyR2 Receptor de rianodina cardiaco
- TV Taquicardia ventricular
- TVPC Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

- SA Sinoauricular
- SBr Síndrome de Brugada
- SERCA ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico/endoplásmico
- SQTl Síndrome de QT largo
- Túbulos-T Túbulos transversos

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	13
1. SISTEMA DE CONDUCCIÓN CARDIACA.....	13
1.1. <i>El nodo sinusal</i>	14
1.2. <i>El nódulo auriculoventricular</i>	14
1.3. <i>Haz de His y el sistema de Purkinje</i>	15
2. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.....	15
3. CANALES IÓNICOS.....	17
3.1 <i>Canal de sodio</i>	18
3.2 <i>Canal de Calcio</i>	19
3.3 <i>Canales de Potasio</i>	21
4. ELECTROCARDIOGRAMA.....	23
5. ARRITMIAS HEREDITARIAS.....	24
5.1. <i>Síndrome de QT largo</i>	25
5.2. <i>Síndrome de Brugada</i>	28
5.3. <i>Disfunción del Nodo Sinusal</i>	31
5.4. <i>Taquicardia Ventricular Polimorfa Catecolaminérgica</i>	34
5.5. <i>Síndrome de QT Corto</i>	35
6. RETOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y MOLECULAR DE LAS ARRITMIAS HEREDITARIAS.....	36
7. LIMITACIONES DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	37
8. CLASIFICACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE VARIANTES.....	39
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
III. HIPÓTESIS.....	43
IV. JUSTIFICACIÓN.....	43
V. OBJETIVO GENERAL.....	44
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1. TIPO DE ESTUDIO.....	44
2. MUESTREO.....	44
3. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	45
4. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	46
5. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (SNG).....	46
6. PROCESAMIENTO DE DATOS OBTENIDOS POR SNG.....	47
7. REPORTE DE CALIDAD.....	48
8. PROCESAMIENTO DE DATOS.....	48
9. ANOTACIÓN DE VARIANTES.....	49
10. SELECCIÓN DE VARIANTES DE INTERÉS.....	49
11. SECUENCIACIÓN SANGER.....	50
12. VALORACIÓN DE PATOGENICIDAD.....	52
13. AMPLIFICACIÓN DE SONDAS DEPENDIENTE DE LIGANDOS MÚLTIPLES (MLPA).....	52
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
VIII. RESULTADOS.....	54
1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	54
2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	54

3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	54
4. ANÁLISIS GENÉTICO EN CASOS CON SQTL	56
5. ANÁLISIS GENÉTICO EN CASOS CON SBR	63
6. ANÁLISIS GENÉTICO EN CASOS CON DNS	69
7. ANÁLISIS GENÉTICO EN CASOS CON TVPC	72
8. ANÁLISIS GENÉTICO DE OTRAS ARRITMIAS HEREDITARIAS	72
9. GEN <i>SCN5A</i>	75
10. GEN <i>KCNH2</i>	76
11. GEN <i>KCNQ1</i>	76
12. GEN <i>RYR2</i>	77
IX. DISCUSIÓN	79
1. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO	79
2. CRITERIOS DE PATOGENICIDAD	83
3. CASOS DE INTERÉS	86
3.1. SQTL CON MUTACIONES EN BAG3 Y ANK2	86
3.2. <i>SQTC</i>	87
3.3. FENOTIPO MIXTO DE SBR Y TVPC	87
4. EL GEN <i>SCN5A</i> Y LOS FENOTIPOS MIXTOS	88
5. <i>RYR2</i> COMO GEN DE SUSCEPTIBILIDAD PARA SQTL	89
6. PERSPECTIVAS	90
X. CONCLUSIONES	92
XI. REFERENCIAS	93
XII. ANEXOS	108

Índice de tablas

Tabla 1- Detalles moleculares de los canales de potasio	21
Tabla 2 Valores de QTc corregidos por Bazzett.....	25
Tabla 3 Puntuación de Schwartz.. ..	26
Tabla 4 Genes causales de síndrome de QT largo	27
Tabla 5 Genes vinculados con el síndrome de Brugada.	31
Tabla 6 Manifestaciones electrocardiográficas de la DNS	32
Tabla 7 Diferentes presentaciones de disfunción del nodo sinusal	33
Tabla 8 Genética de la disfunción del nodo sinusal.	34
Tabla 9 Genes relacionados con la Taquicardia ventricular polimórfica Catecolaminérgica. *Patrón de herencia autosómico recesivo.	35
Tabla 10 Síndrome de QT corto por subtipo genético.	36
Tabla 11 Resumen del papel de las pruebas genéticas en diversas enfermedades	38
Tabla 12 Clasificación de patogenicidad de variantes genéticas asociadas con canalopatías arritmogénicas.	42
Tabla 13 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para la captación de pacientes. .	45
Tabla 14 Escala Phred de probabilidades de error.	48
Tabla 15 Rendimiento diagnóstico.	55
Tabla 16 Tipos de variantes encontradas	56
Tabla 17 Características clínicas de los casos índice con SQT	57
Tabla 18 Variantes identificadas en casos con SQT	62
Tabla 19 Características clínicas de los casos índice con SBr.....	63
Tabla 20 Variantes identificadas en casos con SBr.	67
Tabla 21 Características clínicas de los casos índice con DNS.	69
Tabla 22 Variantes identificadas en casos con DNS.....	71
Tabla 23 Características clínicas de los casos índice con TVPC	72
Tabla 24 Variantes identificadas en casos con TVPC	72
Tabla 25 Características clínicas de los casos índice con otras CAs	73
Tabla 26 Variantes identificadas en casos con otras CAs.....	74
Tabla 27 Ventajas, desventajas y limitaciones de las técnicas in vitro para los estudios funcionales de los canales iónicos.	84

Índice de Figuras

Figura 1 Anatomía del corazón humano y vías de conducción a través del corazón.....	13
Figura 2 Acoplamiento eléctrico de los miocitos cardíacos	14
Figura 3 Ilustración esquemática del potencial de acción (PA) en el NS, aurícula y ventrículo.	17
Figura 4 Célula del sistema de conducción cardíaca. Se resaltan los genes identificados en la enfermedad del sistema de conducción cardíaca humana	18
Figura 5 Estructura de la proteína NaV1.5.	19
Figura 6 La subunidad $\alpha 11.1$ del canal de calcio dependiente de voltaje.....	20
Figura 7 Liberación de calcio en la célula cardíaca.	21
Figura 8 Estructura de diferentes especies de canales de potasio cardíacos	23
Figura 9 ECG normal.....	24
Figura 10 Clasificación de los genotipos del síndrome de QT largo centrada en las corrientes.....	28
Figura 11 Patrones característicos de pacientes con SBr.	30
Figura 12 ECG de la TVPC.....	35
Figura 13 Patrón electrocardiográfico del SQTC, el círculo rojo señala el intervalo QT reducido.....	36
Figura 14 Diagrama de superposición entre los genes asociados con síndrome de Brugada (BrS), síndrome de QT largo (LQTS), taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) y síndrome de QT corto (SQTS)	37
Figura 15 Clasificación de patogenicidad de variantes genéticas según el ACMG.....	41
Figura 16 Estrategias de secuenciación de nueva generación para la identificación de variantes patogénicas que causan AHs.	47
Figura 17 Formato FastQ-Sanger	47
Figura 18 Pipeline o tubería informática para el análisis de datos genómicos obtenidos con diferentes tecnologías y plataformas de SNG.	48
Figura 19 Proceso de secuenciación Sanger.....	51
Figura 20 Frecuencia de variación en genes específicos.....	56
Figura 21 Diagnóstico molecular de los pacientes con SQTL.	58
Figura 22 Distribución de genes afectados en pacientes con SQTL	59
Figura 23 Árbol familiar del caso SQTL-14.	63
Figura 24 Distribución de variantes encontradas en casos de SBr según su clasificación de patogenicidad.	65

Figura 25 Distribución de genes con variantes de interés en pacientes con SBr.....	65
Figura 26 Árbol familiar del caso SBR-2.	69
Figura 27 Diagnóstico molecular de los pacientes con DNS.	70
Figura 28 Distribución de genes afectados en pacientes con DNS,	71
Figura 29 Árbol familiar del caso SQTC-1.....	74
Figura 30 Árbol familiar del caso PRKAG2-1.	74
Figura 31 Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen SCN5A	75
Figura 32 Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen KCNH2	76
Figura 33 Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen KCNQ1	77
Figura 34 Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen RYR2.....	77

I. Introducción

1. Sistema de conducción cardíaca

El corazón es un músculo ubicado en la cavidad torácica, el cual está formado por tejido muscular con características especiales: el músculo auricular, el músculo ventricular y las fibras musculares especializadas en excitación y de conducción. El sistema de conducción intrínseco cardíaco está compuesto por el nodo sinusal y auriculoventricular, y las vías propagadoras del impulso, siendo la más prominente el sistema His-Purkinje (Figura 1) (Park & Fishman, 2011). Este mecanismo fisiológico es posible debido a que los miocitos cardíacos están eléctricamente acoplados a través de las uniones en hendidura (Dhein & Salameh, 1998). Estas uniones constan de dos estructuras hexaméricas yuxtapuestas denominadas conexones, que unen a las células eléctricamente. De este modo, el músculo cardíaco actúa como un sincitio mecánico y eléctrico de células acopladas (Figura 2) (Boron & Boulpaep, 2017).

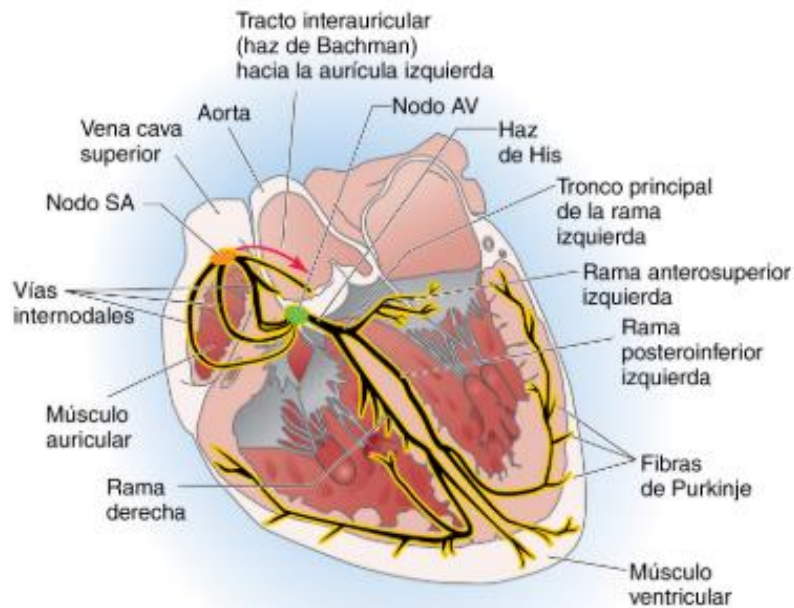


Figura 1. Anatomía del corazón humano y vías de conducción a través del corazón. Se muestra un corte a través del eje longitudinal del corazón (Tomado de Boron & Boulpaep, 2017).

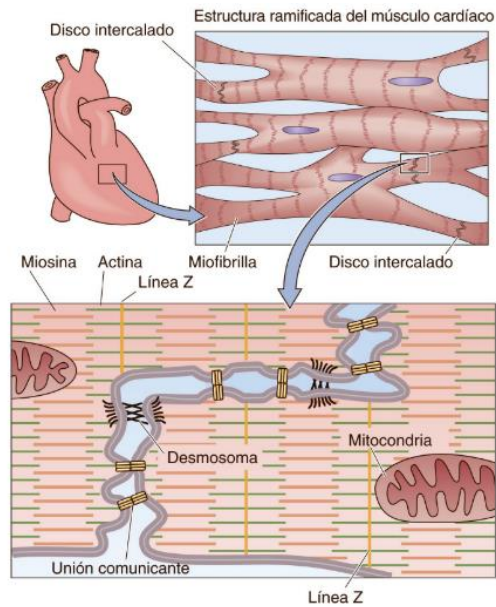


Figura 2. Acoplamiento eléctrico de los miocitos cardíacos (Tomado de Boron & Boulpaep, 2017).

1.1. El nodo sinusal

El nodo sinusal (NS) se describe como una media luna, el cual se encuentra alojado en el subepicardio dentro del surco terminal, y justo debajo de la cresta del apéndice auricular. Histológicamente, al igual que las células de miocardio ordinarias, las células nodales especializadas son estriadas, pero son más pequeñas, y las que se encuentran en la periferia del cuerpo nodal se fusionan de manera relativamente imperceptible con los cardiomiocitos auriculares (Ho, 2016). Mas recientemente, se identificó una nueva región de miocardio auricular cerca del nodo llamada "área paranodal", la cual es incluso más extensa que el nodo sinusal; esta área posee propiedades de los tejidos nodales y auriculares, además, puede tener un papel en el marcapasos (Chandler, y otros, 2011). Partiendo del NS existe un grupo de fibras musculares auriculares modificadas llamadas fibras internodales, las cuales se dividen en cuatro tipos (haz de Bachmann o tracto interauricular anterior, y las vías internodales anterior, media y posterior) con la finalidad de transmitir el impulso eléctrico fuera del nodo (Boron & Boulpaep, 2017).

1.2. El nódulo auriculoventricular

El nódulo auriculoventricular (NAV) está localizado en la pared posterolateral de la aurícula derecha (la base del tabique auricular), inmediatamente detrás de la válvula tricúspide, en el vértice de un área llamada el triángulo de Koch. En la unión auriculoventricular, el tracto del tejido nodal se divide en dos: la extensión nodal inferior (ENI) y el haz penetrante. La

ENI está situada en la aurícula derecha y se continúa con el haz penetrante, el cual entra en el tejido fibroso que separa las aurículas y los ventrículos, para emerger en los ventrículos como el haz de His (J. Li et al., 2008). Existen dos vías de conducción en el NAV: una vía rápida de propagación desde el NS que utiliza el tabique auricular y la zona de transición; y una vía lenta que utiliza la cresta terminal y la extensión nodal inferior (Moe, Preston, & Burlington, 1956).

La conducción lenta en las fibras transicionales, nodulares y penetrantes del haz AV está producida principalmente por la disminución del número de uniones en hendidura entre células sucesivas de las vías de conducción, de modo que hay una gran resistencia a la conducción de iones excitadores, esto retrasa el impulso eléctrico aproximadamente 0.13 segundos, siendo este retraso vital ya que garantiza que las aurículas se llenen de sangre antes de que ésta sea expulsada de los ventrículos y bombeada por todo el sistema circulatorio, asegurando la sincronía aurículo-ventricular y facilitando la actividad mecánica, que es mucho más lenta que la actividad eléctrica (Guyton & Hall, 2016).

1.3. Haz de His y el sistema de Purkinje

Desde el nodo AV el impulso se conduce al haz de His, el cual proporciona la única vía de conducción aurículo-ventricular. Luego, el haz de His se bifurca para formar las ramas derecha e izquierda, que corren hacia el ápice del corazón. Las ramas llevan el impulso cardíaco a los ventrículos izquierdo y derecho, terminando en una unión ramificada del sistema de Purkinje. Las redes de Purkinje son estructuras tridimensionales complejas con fibras libres y subendocárdicas (Tranum-Jensen, Wilde, Vermeulen, & Janse, 1991). La función principal del sistema His-Purkinje es conducir rápidamente el potencial de acción a través de los ventrículos para asegurar una excitación ventricular rápida y eficiente y, por lo tanto, una contracción coordinada. El sistema His-Purkinje conduce potenciales de acción más rápidamente que el miocardio ventricular regular (2.3 m/s vs a 0.75 m/s), éstas pueden producir además, si es necesario, un potencial marcapasos (Bartos, Grandi, & Ripplinger, 2015).

2. Potencial de acción cardíaco

El potencial de acción cardíaco (PA) se puede definir como un cambio breve del voltaje transmembranal de los cardiomiocitos tras ser expuestos a un estímulo. Este PA se puede desglosar en 5 fases características del 0 al 4 (Figura 3):

- Fase 4: Es el estado basal de la célula, en este periodo el potencial de la membrana es aproximadamente -90 mV (potencial diastólico máximo)(Garcia-Elias & Benito, 2018).
- Fase 0: Fase de despolarización rápida que ocurre al recibir un estímulo por una corriente proveniente de los cardiomiocitos circundantes, se produce la corriente de activación rápida entrante de sodio, lo cual tiene como resultado un aumento rápido del potencial de membrana.
- Fase 1: Se produce una rápida repolarización temprana, inmediatamente después de la despolarización.
- Fase 2: Fase de meseta, se genera un equilibrio entre las corrientes entrantes y las corrientes K⁺ rectificadoras retardadas que controlan el periodo de meseta.
- Fase 3: Fase de repolarización y decremento del PA.

El PA del NS es marcadamente diferente al del resto del miocardio (Figura 3), destacando por su fase 4 de despolarización diastólica o "potencial de marcapasos", además de la ausencia de las fases 1 de repolarización rápida y 2 de meseta.

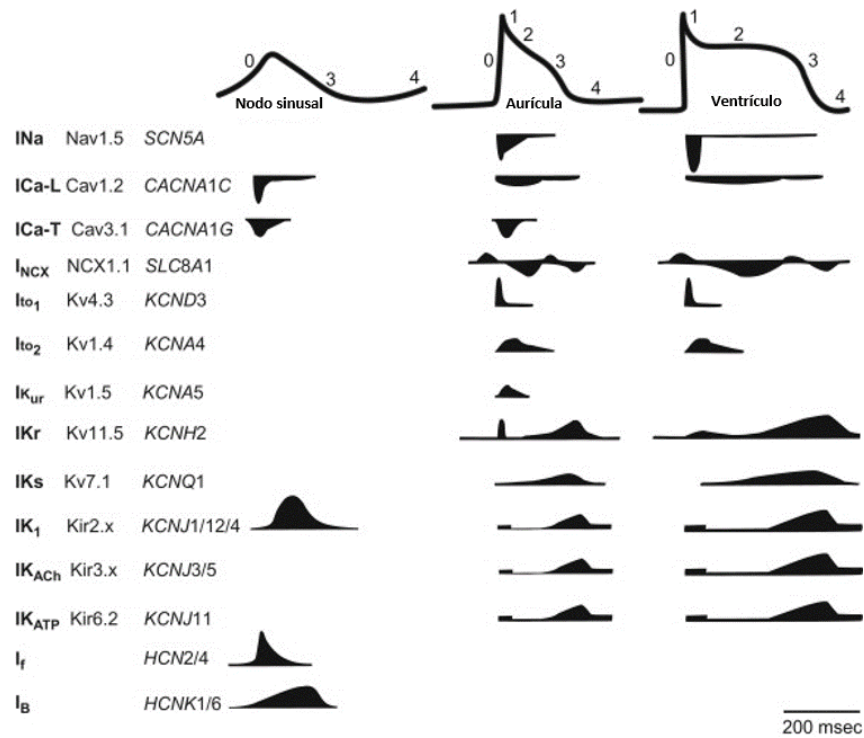


Figura 3. Ilustración esquemática del potencial de acción (PA) en el NS, aurícula y ventrículo. Las corrientes de membrana subyacentes y genes que codifican las principales subunidades formadoras de poros. El PA cardíaco tiene cinco fases distintas (fases 0 a 4). El potencial de membrana en reposo se rige por las conductancias predominantes de potasio (gK). Una vez que el potencial de membrana alcanza su umbral de voltaje, los canales de sodio (Na) se abren repentinamente, de modo que la conductancia del Na excede la conductancia del K ($g_{Na} \gg g_K$), lo que da como resultado una despolarización rápida (fase 0). La tasa máxima de despolarización está relacionada con la magnitud de la corriente de I_{Na} . Tras una mayor despolarización de la membrana, los canales de Na se inactivan ($g_K > g_{Na}$) y se activan otras corrientes, lo que genera la fase 1, que es una repolarización parcial breve, rápida. Existe una variación significativa en la fase 1 entre las células de las regiones del corazón. La fase 2 corresponde a la meseta de la PA y al inicio temprano de la repolarización, que está determinada por el equilibrio entre la conductancia de calcio hacia adentro (g_{Ca}) y la g_K hacia afuera. Cuando las corrientes de K^+ hacia el exterior superan constantemente las corrientes de Ca^{2+} hacia el interior (I_{Ca}), se reinicia la repolarización. La fase 3 es la fase final de la repolarización cuando los canales de Ca^{2+} se han inactivado y $g_K \gg g_{Ca}$. La fase 4, denominada potencial diastólico, es el intervalo entre la repolarización máxima y la posterior despolarización lenta del potencial de membrana que conduce al inicio del siguiente PA. Los miocitos auriculares y ventriculares normalmente no generan PA espontáneos y requieren un estímulo externo para llevarlos al umbral. Las corrientes de entrada (despolarizantes) incluyen: sodio (I_{Na}); Calcio tipo T (I_{Ca-T}); Calcio tipo L (I_{Ca-L}); y corrientes de intercambiador de sodio-calcio (I_{NCX}). Las corrientes de salida (repolarizantes) incluyen: transitorias de salida 1 (I_{to1}) y 2 (I_{to2}); rectificador retardado de activación ultrarrápida (I_{Kur}); rápida (I_{Kr}) y lenta (I_{Ks}); rectificador de entrada (I_{K1}); rectificador interno activado por acetilcolina (I_{KACH}); rectificador interno sensible a la adenosina (I_{KATP}); "funny" activado por hiperpolarización (I_f); y corrientes de fondo no específicas (I_B).

3. Canales iónicos

La generación y propagación del PA depende de la actuación coordinada de una serie de canales iónicos (Figura 4). Estos canales son proteínas que otorgan permeabilidad iónica selectiva a las membranas celulares de los cardiomiocitos, abriéndose o cerrándose, dependiendo de cambios en el potencial de membrana (activados por voltaje), o por la unión de moléculas intracelulares o extracelulares (dependientes de ligando). Los canales iónicos

activados por voltaje con permeabilidad selectiva para los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} destacan por su participación e importancia en los trastornos arritmogénicos (George, 2013).

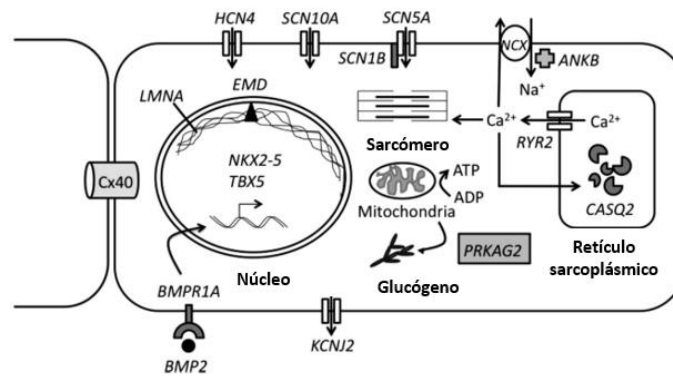


Figura 4. Canales iónicos que regulan el sistema conducción cardíaca. Se resaltan los canales identificados por causar enfermedades del sistema de conducción cardíaca humano. (Modificado de Park & Fishman, 2011)

3.1 Canal de sodio

Los canales de Na^+ son proteínas transmembranales formados por una subunidad α junto y una o dos subunidades β . Existen varios tipos de subunidades α , las cuales se expresan diferencialmente según el tipo de tejido. Estas subunidades están codificadas por una familia de 10 genes diferentes. La subunidad α principal expresada en el corazón se denomina Nav1.5, dándole el nombre al canal de Na^+ cardíaco. Esta subunidad es codificada por el gen *SCN5A* (canal de sodio voltaje dependiente, subunidad α tipo V), que incluye 28 exones, con una extensión de más de 100 kb en el cromosoma 3p22. Asimismo, existen cuatro tipos de subunidades β (B1, B2, B3 y B4), codificadas por los genes *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* y *SCN4B*, respectivamente.

Nav1.5 es una proteína de aproximadamente 220 kDa. Esta subunidad consiste en una porción N-terminal citoplasmática, 4 dominios transmembrana repetitivos (DI-DIV) y una porción C-terminal citoplasmática. Los 4 dominios transmembrana están formados cada uno por 6 segmentos transmembranales α -hélice (S1 – S6) unidos por conectores citoplasmáticos. En cada dominio, los segmentos S5-S6 y el asa intermedia son las regiones que forman el poro del canal de sodio, mientras que los segmentos restantes (S1-S4) actúan como sensores de voltaje (Remme, 2013; Veerman, Wilde, & Lodder, 2015). Las subunidades β del canal de Na^+ cardíaco contienen un extremo amino extracelular, un solo segmento transmembrana y un extremo carboxilo intracelular (Figura 5) (Wilde & Brugada, 2011).

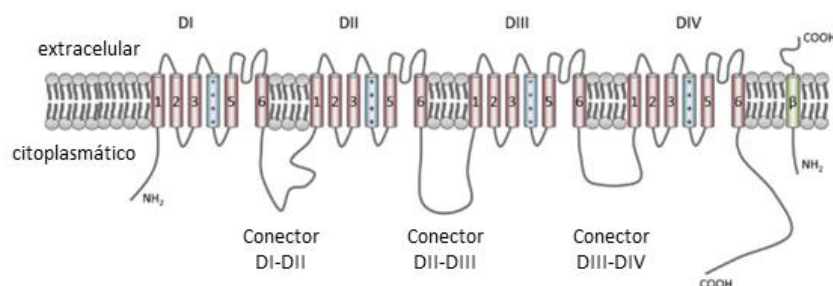


Figura 5. Estructura de la proteína NaV1.5. Los segmentos transmembrana S1-S6 están indicados por cilindros numerados; el segmento S4 está cargado positivamente, es importante en la detección de voltaje y se representa en azul. El segmento transmembrana representado en verde se asemeja a una de las subunidades β (Modificado de Veerman et al., 2015).

La activación de este canal inicia durante la diástole, en este momento los canales de Na^+ se encuentran cerrados y la célula tiene un potencial de membrana de -85 mV . A medida que los estímulos circundantes modifican este potencial de membrana, ésta se despolariza y alcanza un potencial umbral, activando a estos canales en 1 ms. La apertura del poro se lleva a cabo por el movimiento externo de todos los segmentos S4 cargados positivamente, lo que permite la entrada de iones de Na^+ gracias al gradiente electroquímico. La consecuencia de esto es la despolarización rápida de la membrana, o la fase 0 del potencial de acción cardíaco. Simultáneamente, inician los procesos de inactivación rápida y lenta para producir el cierre del poro del canal. La inactivación rápida de la corriente de Na^+ implica una “puerta de inactivación” formada por un grupo de tres aminoácidos hidrofóbicos llamados motivo IFM (isoleucina, fenilalanina y metionina) en el conector intracelular DIII-DIV, junto con dos sitios de acoplamiento ubicados sobre los conectores intracelulares entre S4 y S5 de DIII y DIV (Kass, 2006; West et al., 1992). El dominio C-terminal también está involucrado en este proceso, estabilizando la puerta cerrada, minimizando la reapertura del canal (Motoike et al., 2004). La inactivación lenta ocurre durante periodos de despolarización prolongados, ya que requiere tiempos de recuperación mucho más largos que la inactivación rápida. Se sospecha que ésta implica cambios conformacionales en las asas P de S5-S6, no obstante, el conector DIII S4-S5 también puede ser importante en esta función (Casini et al., 2007; Kass, 2006).

3.2 Canal de Calcio

En el miocito cardíaco, el calcio cumple un papel fundamental como mediador entre la excitación eléctrica y la contracción mecánica (E-C), por su movilización en el citosol durante cada potencial de acción (Pozzan, Rizzuto, Volpe, & Meldolesi, 1994). En el

miocardio humano, la corriente de calcio transmembrana (I_{Ca}) se realiza a través de un complejo macromolecular llamado canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC por sus siglas en inglés), que forman una proteína conductora de iones (subunidad $\alpha 1$) y una serie de subunidades accesorias: subunidades $\alpha 2\delta$, $\beta 1-4$ y γ (Napolitano & Antzelevitch, 2011). Estas subunidades accesorias modulan, controlan, trafican y responden a estímulos neurohormonales (Landstrom et al., 2016). Existen tres tipos de canales de calcio que se expresan en el corazón humano: tipo T, tipo P y tipo L. De los canales de calcio tipo L, el canal Cav1.2 codificado por el gen *CACNA1C* en el locus cromosómico 12p13.3, es el canal de calcio más ampliamente expresado en el corazón. Este gen abarca más de 500 kb, y por procesos de splicing alternativo puede generar 42 diferentes variantes (Figura 6) (Ertel et al., 2000).

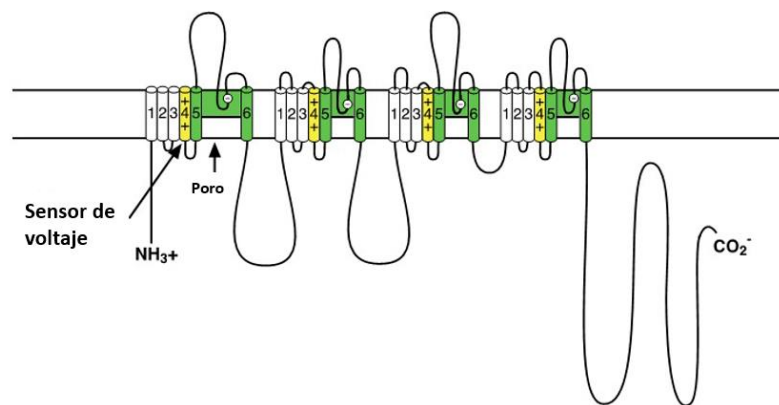


Figura 6. La subunidad $\alpha 1.1$ del canal de calcio dependiente de voltaje. Los segmentos transmembranales S1-S4 forman el módulo sensor de voltaje. Los segmentos S4 con sus cargas de activación positivas se resaltan en amarillo. Los segmentos transmembranales S5 y S6 y el asa P que los une se resaltan en verde.

El Ca^{2+} además de funcionar como enlace crítico entre los estímulos eléctricos generados por la despolarización de la membrana plasmática y la contracción mecánica del cardiomiocito durante el acoplamiento excitación-contracción, también genera una corriente sustancial de entrada/despolarización que modula al PA (Figura 7).

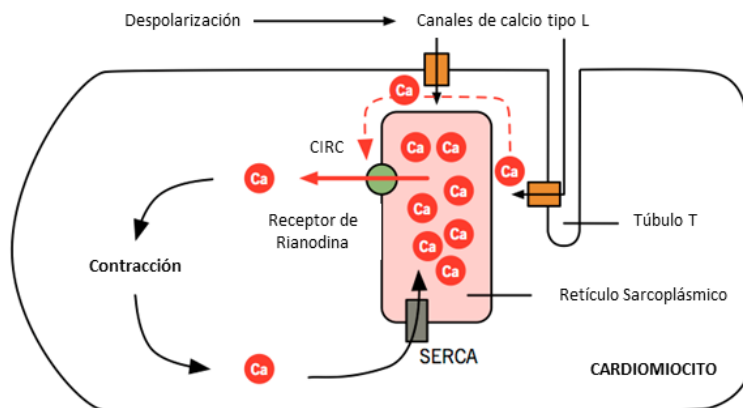


Figura 7. Liberación de calcio en la célula cardiaca. La entrada inicial de Ca^{2+} en los cardiomiocitos se lleva a cabo a través de los canales tipo L, durante la fase 2 del potencial de acción. Ésta mantiene a la corriente cardiaca en una meseta, pero es insuficiente para desencadenar la contracción de las miofibrillas. Debido a esto, la señal es amplificada por el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (CICR por sus siglas en inglés), que desencadena una liberación mucho mayor del ion desde el retículo sarcoplásmico. La membrana celular de los cardiomiocitos, llamada sarcolema, contiene invaginaciones (túbulos T) que hacen que los canales de Ca^{2+} tipo L entren en contacto cercano con los receptores de rianodina (RyR), receptores especializados de liberación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (RS). La calsequestrina es una proteína amortiguadora de calcio que se encuentra en el lumen del RS, la calmodulina se encuentra en el citoplasma y funciona como una proteína mensajera de detección de calcio multifuncional; y la proteína Triadina conecta la calsequestrina con el receptor 2 de rianodina (RyR2) y estabiliza el canal. Calsequestrina, calmodulina y Triadina se unen a RyR2 y modulan su función formando una maquinaria macromolecular que se conoce como la unidad de liberación de calcio. Estos altos niveles de Ca^{2+} intracelular libres actúan sobre los complejos de tropomiosina para inducir la contracción de los miocitos. Al finalizar la contracción, el calcio intracelular regresa al RS por medio de los canales de calcio SERCA. (Franzini-Armstrong, Protasi, & Tijssens, 2005)

3.3 Canales de Potasio

Existen diferentes tipos de canales de K^{+} que se expresan en la membrana plasmática del corazón, donde ejercen un control preciso sobre la duración del PA (Bartos et al., 2015).

Tabla 1. Detalles moleculares de los canales de potasio (Modificado de Jeevaratnam, Chadda, Huang, & Camm, 2018)

Corriente	Gen	Posición en el cromosoma	Proteína asociada	Tipo de subunidad
I_{tof}	<i>KCND3</i>	1p13.2	Kv4.3	α
	<i>KCNIP2</i>	10q24.32	KChIP2	β
	<i>KCNE3</i>	11q13.4	MiRP2	β
I_{tos}	<i>KCNA4</i>	11p14.1	Kv1.4	α
I_{Ks}	<i>KCNQ1</i>	11p15.5-p15.4	Kv1.7.1/KvLQT1	α
	<i>KCNE1</i>	21q22.12	minK	β
	<i>AKAP9</i>	7q21.2	AK AP-9	β
I_{Kr}	<i>KCNH2</i>	7q36.1	Kv11.1/hERG	α
	<i>KCNE2</i>	31q22.11	MiRP1	β
I_{K1}	<i>KCNJ2</i>	17q24.3	Kir2.1/IRK1	α
	<i>KCNJ12</i>	17q11.2	Kir2.2/IRK2	α
I_{KATP}	<i>KCNJ8</i>	12p12.1	Kir6.1	α
	<i>KCNJ11</i>	11p15.1	Kir6.2	α
	<i>ABCC9</i>	12p12.1	SUR2A/SUR2B	β
I_{Kur}	<i>KCNA5</i>	12p12.32	Kv1.5	α
	<i>KCNAB 1-3</i>	N/A	Kv β 1-3	β
I_{KAch}	<i>KCNJ3</i>	2q24.1	Kir3.1/GIRK1	α
	<i>KCNJ5</i>	11q24.3	Kir3.4/GIRK4	α

Cada uno de estos canales de K^+ posee características propias (Tabla 1), en lo que se refiere a su cinética y regulación. De acuerdo a la velocidad de la corriente que producen, podemos clasificar estos canales en rectificadores retardados lentos, rápidos y ultrarrápidos (I_{Ks} , I_{Kr} e I_{Kur}), y en el tiempo de recuperación de la inactivación de la corriente transitoria de salida puede ser rápida ($I_{to,f}$) o lenta ($I_{to,s}$) (Grandi et al., 2017). Las subunidades α de diferentes tipos de canales de K^+ poseen tres regiones principales: una región de poro, un filtro de selectividad y un mecanismo de activación que controla el cambio entre los estados conductores abiertos y no conductores cerrados, y determina si la permeabilidad ocurre en respuesta a cambios en el potencial de membrana o un ligando (Tamargo, Caballero, Gómez, Valenzuela, & Delpón, 2004). Finalmente, las subunidades α monoméricas individuales pueden ensamblarse en dímeros o tetrámeros funcionales debido a la presencia de uno o más dominios de ensamblaje de subunidades (Figura 8) (Snyders, 1999). Las subunidades β del canal K^+ abarcan muchos grupos moleculares, los que incluyen proteínas citoplasmáticas (Kvh1-3, KChIP y KChAP) que interactúan con los dominios intracelulares de los canales Kv, proteínas transmembrana, como las proteínas relacionadas con minK codificados por la familia de genes *KCNE*; y proteínas relacionadas con transportadores dependientes de ATP (ABC), como los receptores de sulfonilurea (SUR) para los rectificadores internos Kir6.1 y 6.2 (Roden, Balsler, George Jr, & Anderson, 2002; Tamargo et al., 2004). La mayoría de las subunidades $Kv\beta$ se ensamblan con subunidades α dando lugar a un complejo $\alpha_4\beta_4$ y pueden modificar las propiedades funcionales del canal (Tamargo et al., 2004).

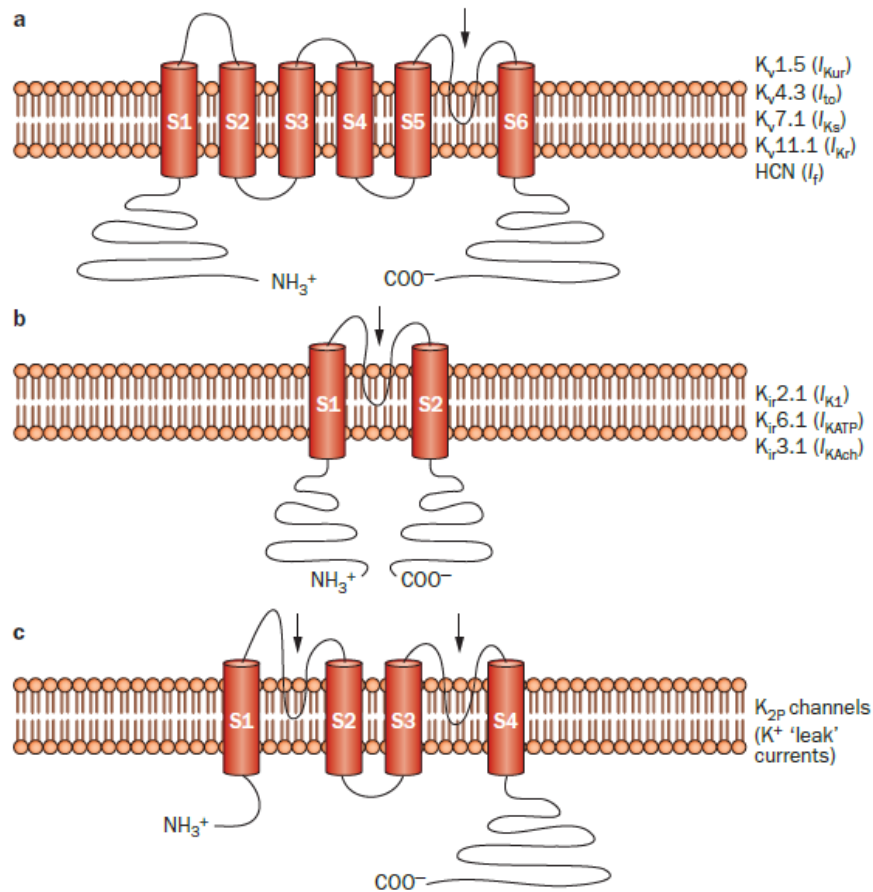


Figura 8. Estructura de diferentes tipos de canales de potasio cardíacos: representación esquemática de subunidades a seleccionadas del canal de potasio. A, subunidad a de un canal con 6 subunidades transmembrana y 1 región de poro dependiente de voltaje (Kv) que son mediadoras de *I*_{Kur}, *I*_{to}, *I*_{Ks}, *I*_{Kr} y *I*_f. B, las subunidades a del canal con 2 subunidades transmembrana y 1 región de poro rectificador interno de (*K*_{ir}) mediadora de *I*_{K1}, *I*_{KATP} e *I*_{KAch}. C, el canal con 4 subunidades transmembrana y 2 regiones de poros (*K*_{2P}) que median las corrientes de "fuga". Las flechas indican la (s) región (es) formadora (s) de poros. HCN indica un canal activado por nucleótidos cíclicos activado por hiperpolarización; *I*_f, el rectificador interno mixto de Na⁺ y K⁺ "funny"; *I*_{K1}, corriente interna rectificadora de K⁺; *I*_{KACH}, corriente interna rectificadora de K⁺ activada por acetilcolina; *I*_{KATP}, corriente de K⁺ sensible a ATP; *I*_{Kr}, componente rápido de la corriente rectificadora retardada de K⁺; *I*_{Kur}, componente ultrarrápido de la corriente rectificadora retardada de K⁺; *I*_{to}, corriente de salida transitoria de K⁺ (Giudicessi & Ackerman, 2012).

4. Electrocardiograma

El electrocardiograma (ECG) es una prueba no invasiva, que se realiza a través electrodos colocados en la piel, los cuales están conectados a un electrocardiógrafo. Esta técnica es de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades cardiacas.

Cuando se registra un ECG, se inscribe una serie de ondas por cada ciclo cardiaco (Figura 9). Estas ondas fueron designadas como P, Q, R, S, y T, de acuerdo con su orden de inscripción. La onda P corresponde a la despolarización auricular, el complejo QRS a la despolarización ventricular y la onda T a la repolarización ventricular; en ocasiones, a

continuación de la onda T se registra una pequeña onda U. El complejo QRS puede tener distintas morfologías, con deflexión negativa inicial o sin ella. Si la primera deflexión es negativa se le denomina onda Q. La onda R es la primera deflexión positiva del complejo y la onda S es la deflexión negativa que le sigue. Estas ondas conforman distintos intervalos y segmentos. El intervalo PR es la distancia comprendida desde el inicio de la onda P hasta el inicio del complejo QRS; El segmento ST abarca desde el final del QRS hasta el inicio de la onda T; El intervalo QT comprende desde el principio del QRS hasta el final de la onda T (Bayés De Luna, 1998).

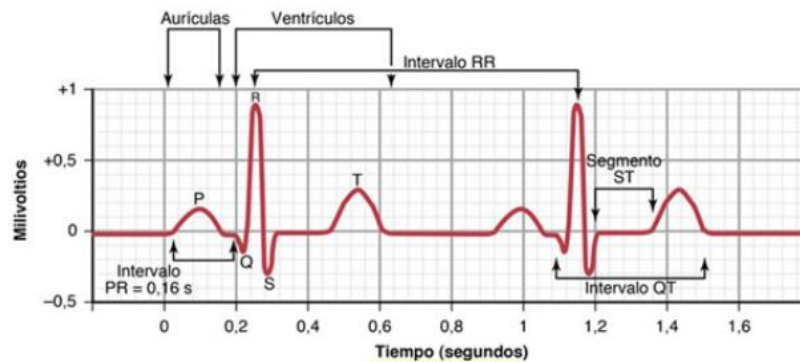


Figura 9. ECG normal. Tomada de Guyton & Hall, 2016

5. Arritmias hereditarias

Las arritmias hereditarias (AH) también denominadas enfermedades eléctricas primarias o canalopatías arritmogénicas (CA) se definen como trastornos eléctricos primarios del corazón que, como característica principal, no se asocian a alguna cardiomiopatía o alteración estructural concomitante, que predisponen a arritmias y, generalmente, son causados por variantes o mutaciones en genes que codifican canales iónicos o proteínas reguladoras de los mismos (Lombardi, 2013). Las canalopatías arritmogénicas más frecuentes son el síndrome de QT largo (SQTL), el síndrome de Brugada (SBr), la taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica (TVPC) y el síndrome de QT corto (SQTC) (Bezzina, Lahrouchi, & Priori, 2015). Algunos trastornos arritmogénicos de etiología diversa como la disfunción del nodo sinusal (DNS) y la taquicardia ventricular idiopática (TVI) pueden ser canalopatías arritmogénicas causadas por variantes en estos genes, particularmente cuando se presentan en edades tempranas (Nof, Glikson, & Antzelevitch, 2009) (Napolitano & Priori, 2002).

5.1. Síndrome de QT largo

Es un trastorno genético de la repolarización cardiaca, que predispone a arritmias ventriculares (torsade de points y fibrilación ventricular), síncope y a la muerte súbita (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres, & Ackerman, 2007). Al ser la canalopatía arritmogénica más frecuente (Schwartz et al., 2009), se han identificado pacientes con SQTl en todos los grupos étnicos del mundo. Aunque en México no se tienen estadísticas confiables, en poblaciones caucásicas la prevalencia es de aproximadamente 1:2000 en nacimientos aparentemente sanos (Priori et al., 2015). Se calcula que el SQTl es responsable del 20% de las causas de muerte súbita no explicada cuya autopsia no reveló la causa de muerte en individuos jóvenes (Tester & Ackerman, 2007). El SQTl también puede ser causa de muerte de cuna y muerte fetal (Arnestad et al., 2007; Crotti et al., 2013). La presentación de síncope o paro cardiaco puede desencadenarse por estrés físico o emocional, o durante el reposo o el sueño (Schwartz, Ackerman, George, & Wilde, 2013). Clínicamente, se caracteriza por una prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma. Convencionalmente, se utiliza la fórmula de Bazett para corregir la duración del intervalo de acuerdo con la frecuencia cardiaca ($QTc = QT/\sqrt{RR}$, expresado en milisegundos). Los valores de QTc entre 380-430 ms para hombres y 380-450 ms para mujeres se consideran normales. Por otro lado, se ha considerado anormal un intervalo QTc ≥ 470 ms en los varones y ≥ 480 ms en las mujeres, sin embargo, en este rango podemos encontrar tanto a portadores de variantes patogénicas como a sujetos sanos (Tabla 2) (Giudicessi & Ackerman, 2013). En casos con el intervalo QT en rango dudoso, se aplican los criterios de Schwarz (Tabla 3), que es un sistema de puntaje que considera datos clínicos, familiares y electrocardiográficos para hacer el diagnóstico (Schwartz, Moss, Vincent, & Crampton, 1993).

Tabla 2. Valores de QTc corregidos por Bazzett

Clasificación	1-15 años (ms)	Hombre adulto (ms)	Mujer adulta (ms)
Normal	<440	<430	<450
Limítrofe	440-460	430-470	450-480
Prolongado	>460	>470	>480

Tabla 3. Puntuación de Schwartz. * 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 (Schwartz et al. 1982).

Crterios	Puntaje*
Hallazgos electrocardiográficos	
QTc	
>480ms	3
460-479ms	2
450-460ms	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	
Sincope	
Con estrés	2
Sin estrés	1
Sordera congénita	0,5
Historia familiar	
Diagnóstico definitivo de SQTL en familiares cercanos	1
MSI antes de los 30 años en familiares cercanos	0,5

En la gran mayoría de los casos, este síndrome se transmite de forma autosómica dominante (conocido también como síndrome de Romano-Ward), aunque la forma más grave que se acompaña de sordera congénita (Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen) es autosómica recesiva (Medeiros-Domingo, Iturralde-Torres, Ackerman, et al., 2007). Al momento, se conocen 14 genes que pueden causar el fenotipo clásico de SQTL, dos trastornos multisistémicos raros asociados al alargamiento del QT (Síndrome de Timothy anteriormente conocido como SQTL8; Síndrome de Andersen-Tawil, anteriormente SQTL7) y el Síndrome de Ankirina-B (SQTL4) (Tabla 4). Aproximadamente el 75% de los casos es causado por mutaciones en 3 genes: *KCNQ1* (SQTL1), *KCNH2* (SQTL2) o *SCN5A* (SQTL3), que codifican los canales Kv7.1, Kv11.1 (o hERG) y Nav1.5, respectivamente (Figura 10) (Tester & Ackerman, 2018). En aproximadamente 20% de los casos no se puede identificar el gen causal.

Tabla 4. Genes causales de síndrome de QT largo (Sicouri & Antzelevitch, 2018).PDF pérdida de función; GDF ganancia de función.

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%
LQT5	<i>KCNE1</i>	21q22.1	MinK	PDF, reducción de IKS	< 1%
LQT6	<i>KCNE2</i>	21q22.1	MiRP1	PDF, reducción de IKr	< 1%
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 IKAch	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%
LQT17	<i>TRPM4</i>	19q13.33	Melastatina-4	Reducción del manejo de cationes	Raro
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
Otros síndromes					
síndrome de Ankirina-B (LQT4)	<i>ANKB</i>	4q25-q27	Ankirina B	PDF, altera múltiples canales	< 1%
Síndrome de Andersen-Tawil (LQT7)	<i>KCNJ2</i>	17q23	Kir2.1	PDF, reducción de IK1	< 1%
Síndrome de Timothy (LQT8)	<i>CACNA1C</i>	12p13.3	Cav1.2	GDF, incremento de ICaL	Raro

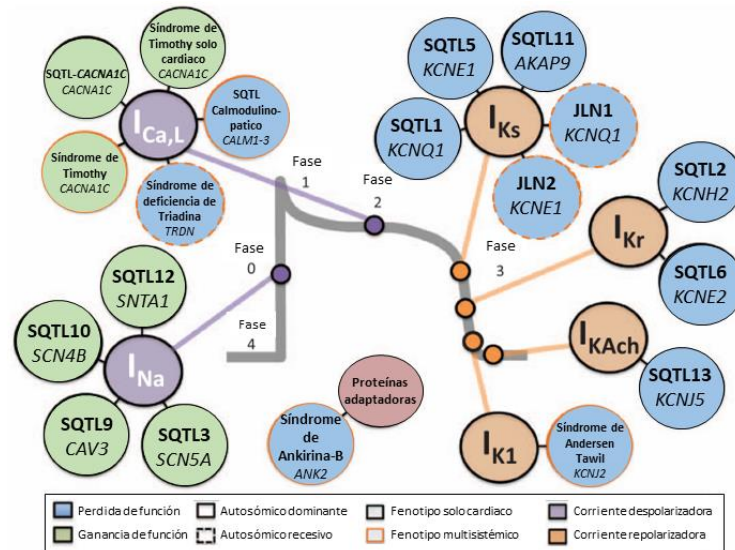


Figura 10. Clasificación de los genotipos del síndrome de QT largo centrada en las corrientes (Modificado de Giudicessi & Ackerman, 2016).

5.2. Síndrome de Brugada

Es una canalopatía arritmogénica que provoca alteraciones graves en la repolarización cardíaca, y se asocia a un mayor riesgo de muerte súbita secundaria a taquicardia ventricular polimórfica de reentrada y fibrilación ventricular. La prevalencia de este síndrome se estima en 1-12:10,000 (Lombardi, 2013), aunque posiblemente esta cifra subestima la prevalencia real, dado que muchos pacientes pueden presentar formas silentes de la enfermedad. Se presume que el SBr es la causa del 4% de las muertes súbitas, y del 20% de las muertes súbitas en individuos con corazones estructuralmente normales (Berne & Brugada, 2012). Este síndrome afecta más a hombres que a mujeres (8:1), los hombres generalmente tienen síntomas más graves y un mayor riesgo de MS, así como una mayor inducibilidad de FV durante los estudios electrofisiológicos (Berthome et al., 2019). Esto puede deberse a canales expresados diferencialmente entre géneros (Morita, 2019). Los síntomas generalmente aparecen alrededor de los 40 años de vida. Por lo general, es una afección vagal, presentándose las arritmias en reposo o al dormir. El SBr ocurre en personas con un corazón estructuralmente normal, pero se ha informado que algunos pacientes con SBr tienen anomalías microscópicas del miocardio, sugiriendo que algunos pacientes pueden cursar con alteraciones miocárdicas (Pieroni et al., 2018). A la fecha, el único tratamiento es la aplicación de un desfibrilador automático implantable (DAI) (Brugada, Brugada, & Brugada, 1998), sin embargo, la quinidina (antiarrítmico con actividad de bloqueo de canales de sodio como Nav1.5 y algunos canales de potasio como Kv1.4 y

Kv4.2, y Kv11.1) y medicamentos β -miméticos 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., 2016).

El diagnóstico se basa en la presencia de una elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales del ECG (V1-V3) en la ausencia de cambios estructurales del corazón, o en la inducción del patrón ECG tipo Brugada mediante agentes farmacológicos (Priori et al., 2015). El patrón electrocardiográfico puede presentarse de manera transitoria, por lo que en ocasiones es necesario hacer pruebas farmacológicas con bloqueadores del canal de sodio (flecainida o procainamida) para desenmascarar el patrón (Antzelevitch et al., 2005). En una revisión reciente de este síndrome, se reconocen 2 tipos de hallazgos electrocardiográficos: a) patrón tipo I, caracterizado por una elevación descendente del segmento ST ≥ 2 mm en más de una derivación precordial derecha (V1-V3), seguida de ondas T negativas; b) patrón tipo II, caracterizado por elevación del segmento ST ≥ 2 mm en precordiales derechas seguida de ondas T positivas o isobifásicas, lo que confiere al electrocardiograma un aspecto de silla de montar (Figura 11) (Brugada, Campuzano, Arbelo, Sarquella-Brugada, & Brugada, 2018). Aunque los dos patrones pueden observarse en el síndrome de Brugada, incluso en el mismo paciente, sólo el tipo I se considera diagnóstico de la enfermedad. El diagnóstico definitivo de síndrome de Brugada sólo debe establecerse cuando el patrón ECG tipo I se documenta en combinación con al menos uno de los siguientes criterios clínicos (Bayés De Luna et al., 2012).:

- Fibrilación ventricular (FV) documentada.
- Taquicardia ventricular (TV) polimórfica documentada.
- Inducibilidad de arritmias ventriculares durante el estudio electrofisiológico (EEF).
- Síncope o respiración agónica nocturna.
- Historia familiar de MS en edad previa a los 45 años.
- Patrón ECG tipo I en otros miembros de la familia.

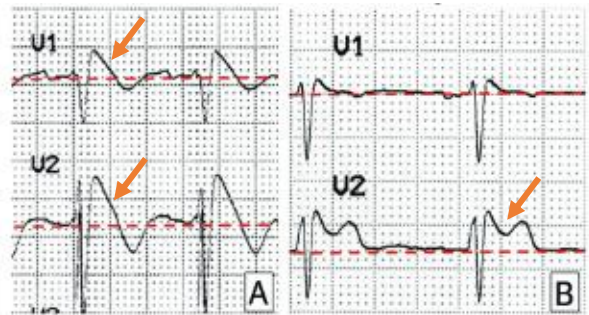


Figura 11. Patrones característicos de pacientes con SBr. A) Patrón tipo I: elevación descendente del segmento ST ≥ 2 mm en más de una derivación precordial derecha, con onda T negativas (morfología en “lomo de delfín”). B) Patrón tipo II: elevación del segmento ST ≥ 2 mm en precordiales derechas, con onda T positiva o isobifásica (morfología de “silla de montar”). La elevación de segmento se señala con una flecha en cada caso (Tomado de Brugada, Campuzano, Arbelo, Sarquella-Brugada, & Brugada, 2018).

El SBr es una enfermedad con patrón de herencia autosómica dominante, de penetrancia incompleta y expresividad variable. Entre los muchos factores que pueden afectar su penetrancia y expresividad están factores ambientales, el género, y la presencia de variantes genéticas comunes que pueden modificar el cuadro clínico (genes modificadores). A la fecha, se conocen 24 genes que pueden causar SBr. Las variantes que causan una pérdida de función del canal de sodio *SCN5A* son las más frecuentes (20-25% de los casos), y la contribución de los otros 23 genes de susceptibilidad para SBr explican solamente entre el 10 y 15% de los casos (Tabla 5). Así, en una proporción muy alta de pacientes (60-70%), el gen causal del SBr es desconocido (Crotti et al., 2012).

Tabla 5. Genes vinculados con el síndrome de Brugada. PDF pérdida de función; GDF ganancia de función.

Subtipo	Gen	Locus	Proteína	Efecto funcional	Frecuencia
SBr1	<i>SCN5A</i>	3p21-p24	Nav1.5, INa	PDF	20-25 %
SBr2	<i>GPD1L</i>	3p22.3	G3PD1L	PDF	Raro
SBr3	<i>CACNA1C</i>	2p13.3	Cav1.2	PDF	6-7 %
SBr4	<i>CACNB2</i>	10p12	Cav β 2	PDF	4-5 %
SBr5	<i>SCN1B</i>	19q13.1	Nav β 1	PDF	1-2 %
SBr6	<i>KCNE3</i>	11q13.4	MiRP2, Ito/lks	GDF	< 1 %
SBr7	<i>SCN3B</i>	11q23.3	Nav β 3	PDF	Rara
SBr8	<i>HCN4</i>	15q24.1	HCN4, If	PDF	Rara
SBr9	<i>KCND3</i>	1p13.2	Kv4.3, Ito	GDF	Rara
SBr10	<i>KCNJ8</i>	12p12.1	Kir6.1, IK-ATP	GDF	Rara
SBr11	<i>CACNA2D1</i>	7q21-22	Cava2-1	PDF	Rara
SBr12	<i>KCNE5</i>	Xq22.3	MiRP4, Kv4.3, Ito	GDF	Rara
SBr13	<i>RANGRF</i>	17p13.1	MOG1	PDF	Rara
SBr14	<i>KCND2</i>	7q31.31	KV4.2	GDF	Rara
SBr15	<i>TRPM4</i>	19q13.33	TRPM4	PDF	Rara
SBr16	<i>SCN2B</i>	11q23	Nav β 2	PDF	Rara
SBr17	<i>PKP2</i>	12p11.21	plakofilina 2	PDF	2.5 %
SBr18	<i>ABCC9</i>	12p12.1	SUR2	PDF	4-5 %
SBr19	<i>SLMAP</i>	3p21.2-p14.3	SLMAP	PDF	Rara
SBr20	<i>KCNH2</i>	7q35	Kv11.1, Ikr	GDF	1-2 %
SBr21	<i>SCN10A</i>	3p22.2	Nav1.8	PDF	<5%
SBr22	<i>FGF12</i>	3q28-q29	FCF12	PDF	Rara
SBr23	<i>SEMA3A</i>	7q21.11	SEMA3A	GDF	Rara
SBr24	<i>HEY2</i>	6q22.31	SUR2A, IK-ATP	GDF	Rara

5.3. Disfunción del Nodo Sinusal

La disfunción del nodo sinusal es una colección de afecciones en las que el impulso cardíaco se genera de manera anormal (De Ponti, Marazzato, Bagliani, Leonelli, & Padeletti, 2018). Esta condición se caracteriza por la formación y/o propagación anormal del impulso de marcapaso, causada por la disfunción intrínseca del nódulo sinusal. Se presenta con síntomas y signos como: bradicardia sinusal, paro sinusal, incompetencia cronotrópica y susceptibilidad a taquicardia auricular (especialmente fibrilación auricular); además se pueden observar episodios de taquicardia auricular que coexisten con bradicardia sinusal, llamado síndrome de taquicardia-bradicardia (Tabla 6).

Tabla 6. Manifestaciones electrocardiográficas de la DNS, estos pueden ser documentables en ECG, Holter-24h, prueba de esfuerzo (procesos no invasivos) y/o bajo estimulación cardíaca en estudio electrofisiológico (proceso invasivo).

Rasgos electrocardiográficos
Bradiarritmias auriculares 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
Taquicardias auriculares 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)

La DNS puede clasificarse como primaria, que incluye la disfunción extrínseca (engloba varias causas que ocasionan degeneración del sistema de conducción, como alteraciones anatómicas), y las alteraciones relacionadas con los canales iónicos o intrínsecas, que tienen un origen genético y a menudo están asociados con una presentación más temprana. Hay otro grupo asociado con alteraciones del metabolismo, farmacológicas y enfermedades extra-cardíacas llamadas secundarias (Tabla 7).

Tabla 7. Diferentes presentaciones de disfunción del nodo sinusal (Modificado de De Ponti, Marazzato, Bagliani, Leonelli, & Padeletti, 2018).

Presentaciones de la disfunción de nodo sinusal primaria y secundaria		
DNS PRIMARIA		DNS SECUNDARIA
Intrínseca	Extrínseca	
Genética	Fibrosis degenerativa	Desordenes metabólicos
Variantes en <i>SCN5A</i> , <i>HCN4</i> , Calcecestreina, Rianodina	Envejecimiento	Hiperkalemia
	Taquiarritmias atriales	Hipocalcemia
	Isquemia crónica	Hipotermia
	Miopatía atrial	Hipoxia
	Amiloidosis	Isquemia aguda
	Enfermedades del tejido conectivo	Agentes farmacológicos
	Hemocromatosis	Medicamentos antiarrítmicos (Clase I y II)
	Sarcoidosis	B-bloqueadores
	Distrofias musculares hereditarias	Bloqueadores de canales de calcio
	Miocarditis	Digoxina
Enfermedad valvular	Cimetidina	
Falla cardíaca	Clonidina, metildopa, reserpina	
hipertensión arterial	Litio, fenotiazina, amitriptilina	
Diabetes	Enfermedades extra cardíacas	
Obesidad	Hipotiroidismo	
Apnea del sueño obstructiva	Hipertensión intracraneal	
Enfermedades infecciosa		
Fiebre reumática		
Enfermedad de Chagas		
Difteria		

El diagnóstico de la DNS se realiza al encontrar tanto síntomas (mareos, síncope, insuficiencia cardíaca, fatiga e intolerancia al ejercicio) como signos electrocardiográficos (Tabla 6). Sin embargo, cuando la DNS se presenta de manera intermitente y la relación entre las anomalías electrocardiográficas y la presentación clínica es difícil de evaluar, puede ser necesaria una investigación adicional, como monitoreo Holter, prueba de esfuerzo con ejercicio, prueba de inclinación o un EEF (De Ponti, Marazzato, Bagliani, Leonelli, & Padeletti, 2018). La DNS no suele responder de manera adecuada al tratamiento farmacológico, por lo que una vez que se descartan los trastornos secundarios, la terapia primaria es la implantación de un marcapasos (De Ponti et al., 2018; Epstein et al., 2008). A pesar de que la DNS se ha asociado con procesos de remodelación eléctrica, fibrosis y degeneración del NS (pérdida de las células NS), la mayoría de los casos con DNS se consideran idiopáticos y se asume que su origen puede ser multifactorial, asociándose a pacientes de edad avanzada. (Morris & Kalman, 2014).

La DNS puede también ocurrir como un trastorno genético hereditario o en casos esporádicos. En general, estos individuos son diagnosticados en la primera década de la

vida (Abe et al., 2014; Ishikawa et al., 2017). Actualmente, se han reportado casos familiares de DNS con herencia autosómica dominante con penetrancia variable y casos con un patrón de herencia recesiva (Benson et al., 2003; Ruan, Liu, & Priori, 2009). A pesar de que varios estudios han demostrado que variantes genéticas en *SCN5A* y *HCN4* explican una gran parte (30% y 5%, respectivamente) de los casos familiares o esporádicos de DNS de inicio temprano (Tabla 8), se han relacionado variantes en los genes responsables de la corriente de calcio participante en la actividad sinusal, causando un fenotipo más severo global cardíaco, ya que estos genes son menos específicos y está asociado a TVPC (Postma et al., 2005). Además, se han visto anomalías en el tráfico de canales iónicos causadas por una mutación ankirina-B causan DNS severa al irrumpir la membrana y los relojes de Ca^{2+} (Le Scouarnec et al., 2008).

Tabla 8. Genética de la disfunción del nodo sinusal.

Gen	Locus	Proteína	Frecuencia de casos
<i>SCN5A</i>	3p22.2	Nav1.5	30%
<i>HCN4</i>	15q24.1	HCN4	5%
<i>RYR2</i>	1q42.1-q43	Receptor de Rianodina cardíaco	Desconocida
<i>CASQ2</i>	1p13.3-p11	Calcecuestrina 2	Desconocida
<i>ANK2</i>	4q25-q26	Ankirina-B	Desconocida

5.4. Taquicardia Ventricular Polimorfa Catecolaminérgica

Es una enfermedad hereditaria caracterizada por arritmias malignas que ocurren bajo estimulación adrenérgica, como el ejercicio o el estrés emocional; posee una tasa de mortalidad del 35% al 50% a los 35 años, por lo que constituye una de las canalopatías arritmogénicas más graves (Leenhardt et al., 1995). Se calcula que la prevalencia es de alrededor de 1:10,000. Característicamente, el ECG al reposo es normal, en ocasiones presentan bradicardia leve y ondas U. En el 75 -100% de los pacientes, el ejercicio puede inducir arritmias ventriculares graves como extrasístoles ventriculares polimorfas, o bien taquicardia ventricular polimorfa o bidireccional que pueden degenerar en fibrilación ventricular (Figura 12). Así, el síncope o la muerte súbita durante el ejercicio puede ser la primera manifestación de la enfermedad. El tratamiento consiste en restricción del ejercicio y uso de β -bloqueadores (Priori et al., 2002).

Desde el punto de vista genético, se conocen 7 genes asociados la enfermedad (Tabla 9), aunque la mayoría de los casos (60%) es causado por variantes en el gen receptor de rianodina (*RYR2*) que causa la forma autosómica dominante. Aproximadamente 5% de los

casos tienen un patrón de herencia autosómico recesivo causados por variantes en el gen de la calsecuestrina 2 (CASQ2) (Postma et al., 2002).

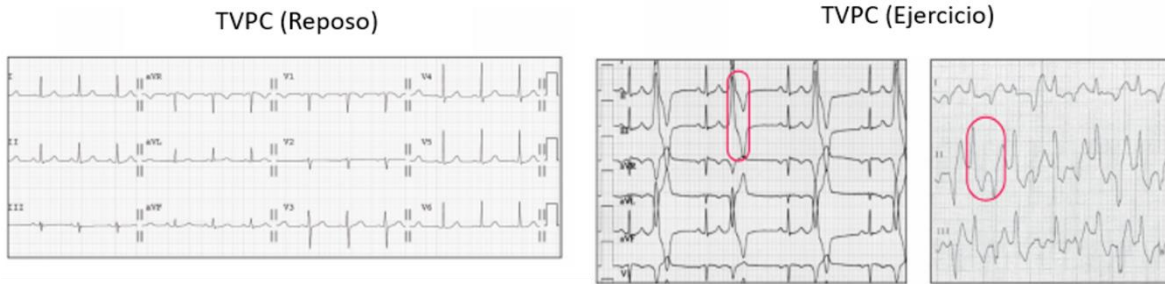


Figura 12. ECG de la TVPC. El ECG es normal al inicio del estudio (imagen izquierda), pero al hacer ejercicio aparecen complejos ventriculares prematuros (imagen media) y taquicardia bidireccional (imagen derecha). Los cambios característicos del ECG están indicados en rojo.

Tabla 9. Genes relacionados con la Taquicardia ventricular polimórfica Catecolaminérgica. *Patrón de herencia autosómico recesivo.

Gen	Locus	Proteína	Frecuencia de casos
1) Genes de mayor susceptibilidad para TVPC			
<i>RYR2</i>	1q42.1-q43	Receptor de Rianodina cardiaco	<50-60%
<i>CASQ2*</i>	1p13.3-p11	Calsecuestrina 2	<5%
2) Genes menos frecuentes de susceptibilidad para TVPC			
<i>TRDN</i>	6q22.31	Triadina	<1%
<i>CALM1*</i>	14q32.11	Calmodulina	<1%
<i>CALM2</i>	2p21	Calmodulina	<1%
<i>CALM3</i>	19q13.32	Calmodulina	<1%
<i>KCNJ2</i>	7p22-p14	Kir2.1	Rara

5.5. Síndrome de QT Corto

El Síndrome de QT corto (SQTC) fue descrito recientemente (Gussak et al., 2000), y se caracteriza por una disminución en la duración del intervalo QT, la presencia de arritmias cardíacas y un riesgo elevado de muerte súbita. La presentación clínica es variable, desde formas asintomáticas hasta fibrilación auricular paroxística o permanente, síncope, arritmias ventriculares y muerte súbita (Patel, Yan, & Antzelevitch, 2010).

La edad de inicio puede ser muy temprana (el primer año de vida), y en ocasiones ser la causa de muerte súbita en el lactante (Hong et al., 2005). Un intervalo QTc <320 ms es diagnóstico (Figura 13), aunque existe controversia sobre los criterios más adecuados, ya que al igual que en el SQTL, existe superposición entre los valores del intervalo QT en individuos normales y enfermos.



Figura 13. Patrón electrocardiográfico del SQTC, el círculo rojo señala el intervalo QT reducido. (Tomado de García-Elías & Benito, 2018).

La pérdida de la adaptación del intervalo QT a las variaciones de la frecuencia cardíaca, con una disminución de la pendiente de la curva intervalo QT/frecuencia cardíaca, puede ser un peldaño fundamental en el diagnóstico del SQTC. Además, el 50% de los pacientes exhiben ondas T puntiagudas y simétricas en derivaciones precordiales, que inician inmediatamente después de la onda S, con un segmento ST muy corto o prácticamente ausente.

Se conocen a la fecha 6 genes causales, los cuales ayudan a clasificar esta enfermedad en diferentes subtipos (Tabla 10).

Tabla 10. Síndrome de QT corto por subtipo genético. PDF pérdida de función; GDF ganancia de función (Modificado de Garcia-Elias & Benito, 2018)

Tipo	Gen	Proteína	Efecto funcional de la mutación	Frecuencia de casos (%)
SQTC1	<i>KCNH2</i>	Kv11.1 (Subunidad α de IKr)	GDF	15
SQTC2	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1 (Subunidad α de IKs)	GDF	<1
SQTC3	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	GDF	<1
SQTC4	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2 (Subunidad α 1C de I _{CaL})	PDF	<1
SQTC5	<i>CACNB2</i>	Proteína auxiliar de Cav1.2 (Subunidad β 2 de I _{CaL})	PDF	<1
SQTC6	<i>CACNA2D1</i>	Proteína auxiliar de Cav1.2 (Subunidad α 2 de I _{CaL})	PDF	<1

6. Retos para el diagnóstico clínico y molecular de las arritmias hereditarias.

En el pasado, el diagnóstico de las AHs se basaba en la evaluación de manifestaciones clínicas, el ECG y estudios electrofisiológicos. Sin embargo, se ha observado que frecuentemente estas enfermedades comparten muchas características fenotípicas y, en una proporción importante de los casos, el diagnóstico no es claro (Webster & Berul, 2013). Una de las características clínicas que puede no ser conclusiva son los patrones electrocardiográficos, los cuales pueden ser intermitentes o limítrofes en algunos pacientes,

además de que puede haber presentaciones asintomáticas, dificultando aún más el diagnóstico (Priori et al., 2015).

Desde el punto de vista molecular, cada una de las arritmias hereditarias pueden ser causadas por más de un gen, y a la vez distintas variantes en un mismo gen pueden causar diferentes expresiones fenotípicas (Figura 14). Así, se sabe que variantes en el canal de sodio *SCN5A* pueden causar SQTL, SBr, fibrilación ventricular idiopática, enfermedad del nodo sinusal, y hasta cardiomiopatía dilatada, una enfermedad donde hay cambios estructurales del músculo cardiaco (Fernández-Falgueras, Sarquella-Brugada, Brugada, Brugada, & Campuzano, 2017).

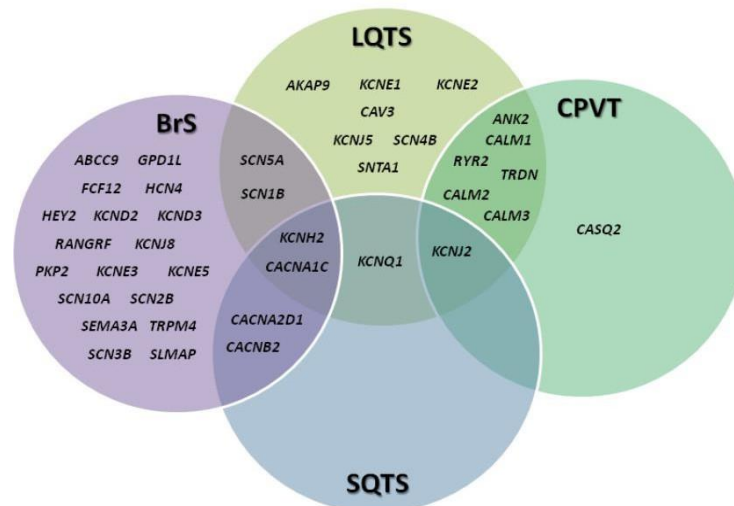


Figura 14. Diagrama de superposición entre los genes asociados con síndrome de Brugada (BrS), síndrome de QT largo (LQTS), taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) y síndrome de QT corto (SQTS). (Tomada de Fernández-Falgueras et al., 2017).

7. Limitaciones del Diagnóstico Molecular

Es fundamental tratar de llegar al diagnóstico molecular, ya que el diagnóstico clínico no siempre es claro, y la identificación del gen causal puede tener implicaciones en el tratamiento. Además, el identificar la mutación causal permite hacer diagnóstico presintomático en otros miembros de la familia, y ayuda a generar conocimiento básico que puede tener implicaciones clínicas en el mediano y largo plazo. Estos estudios requieren una estrecha cooperación entre cardiólogos, genetistas clínicos y genetistas moleculares ya que el análisis e interpretación puede ser difícil y limitado (M. J. Ackerman, 2015; Hofman & Wilde, 2016).

Actualmente, la primera estrategia para el estudio molecular de las AHs es la secuenciación de nueva generación dirigida de los genes conocidos que causan estas enfermedades. Con esta estrategia puede encontrarse la mutación causal o probablemente causal en un rango variable de los casos para cada enfermedad: desde solamente el 20-30% de los casos en SBr hasta el 75-80% de los casos de SQTL (Tabla 11) (M. J. Ackerman, 2015; Louis, Calamaro, & Vinocur, 2018). Aunque esta estrategia tiene una alta sensibilidad para detectar variantes puntuales, no puede identificar inserciones o deleciones grandes, y tiene una menor especificidad para detectar deleciones e inserciones pequeñas. Así, en algunas familias esta estrategia tendrá que complementarse con otras estrategias como la secuenciación del exoma o del genoma completo, y amplificación de sondas de ligandos múltiples (MLPA) (Barc et al., 2011; Sonoda et al., 2018).

Tabla 11. Resumen del papel de las pruebas genéticas en diversas enfermedades (Modificado de Louis et al., 2018).

Arritmia hereditaria	Rendimiento diagnóstico en probandos definitivos	Impacto subjetivamente estimado de las pruebas genéticas en los probandos		
		Diagnostico	Prognosis	Terapia
SQTL	75-80%	+++	+++	++
SBr	20-30%	+	+	-
TVPC	60-70%	+++	+	-
SQTC	?	+/-	-	-

Una de las limitaciones principales de los estudios moleculares es el encontrar variantes nuevas con un papel no claramente causal en la enfermedad, ya que se tratan de polimorfismos de muy baja frecuencia, o son cambios de aminoácido para los que no se sabe la consecuencia sobre la función de la proteína. Además, la mayoría de las variantes encontradas 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 ingles).

Actualmente, solo una pequeña fracción de todas las variantes identificadas en familias o individuos con SQTL, SBr y TVPC se han estudiado funcionalmente, y una proporción aún menor se estudia directamente en modelos animales o cardiomiocitos. Aunque hay programas que predicen las consecuencias funcionales de las variantes de manera computacional, a la fecha ninguno de estos métodos ha sido validado rigurosamente para darle valor clínico. Como resultado, la falta de validación biológica o funcional de los efectos de las variantes sigue siendo la limitación más importante en la interpretación de las

variantes genéticas encontradas en pacientes con AHs. Sin embargo, los estudios familiares pueden ser útiles para identificar genes causantes y modificadores al analizar la cosegregación de variantes sospechosas y enfermedades cuando la estructura familiar es apropiada. La penetrancia incompleta o la expresión subclínica pueden complicar el análisis de segregación en casos familiares, esto es especialmente complicado en enfermedades de baja penetrancia como SBr (Probst et al., 2009).

8. Clasificación de la patogenicidad de variantes.

Uno de los grandes problemas del diagnóstico molecular es que, dada la enorme variación genética natural, el identificar una variante genética nueva no implica que cause enfermedad. Los informes de pruebas moleculares reportan las variantes indicando la alteración en la secuencia del DNA, el cambio que causa en la proteína correspondiente, y luego, críticamente, se clasifica cada variante en cuanto a su posible patogenicidad. Es importante destacar que se ha sugerido que se limite el uso del término “mutación” ya que puede causar confusión. Las pautas del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG por sus siglas en inglés) recomiendan el término “variante” y uno de los siguientes cinco calificativos: patogénica, probablemente patogénica, de significado incierto, probablemente benigna y benigna (Richards et al., 2015).

En general, las variantes que producen cambios en el marco de lectura, codón de terminación o grandes deleciones pueden considerarse patógenicas. Por el contrario, determinar la patogenicidad de las variantes con sentido erróneo (no sinónimo) es más complejo. Sin embargo, este tipo de variantes pueden considerarse variantes de interés clínico si cumplen uno o más de los siguientes criterios (Cotton & Scriver, 1998; Hofman, Langen, & Wilde, 2010):

- 1) Si está ausente o tiene una frecuencia alélica muy baja en un número significativo de controles sanos de la población general ($MAF < 0.001$; 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, gnomAD); así como bases que incluyen variantes patogénicas (e.g. ClinVar y HGMD).

- 2) La variante debe cosegregar con la enfermedad en la familia, es decir, que sólo los portadores de la variante presenten la enfermedad (i.e. el fenotipo coincide con el genotipo), y los familiares sanos no presentan la variante. Las variantes que ocurrieron *de novo* en el paciente están fuertemente asociadas con patogenicidad.
- 3) Variantes que causan cambios de aminoácido con diferente polaridad y/o tamaño, así como cambios en una región conservada de la proteína, sugieren una mayor probabilidad de causar enfermedad. Existen varios programas bioinformáticos que dan una predicción sobre el posible efecto funcional de una variante con base en estas características (e.g. Polyphen Harvard, SIFT, Mutation Tester).
- 4) Los estudios en modelos *in vitro* o modelos animales pueden ayudar a establecer el efecto funcional de la variante sobre la proteína. Si bien, ningún modelo *in vitro* o animal recapitula fielmente la fisiología en seres humanos y las limitaciones económicas y tecnológicas muchas veces hacen prohibitivo el desarrollo de estos modelos. Los resultados positivos en este tipo de sistemas constituyen un importante hallazgo que respalda la patogenicidad de una variante.

Para esto, el ACMG publicó una serie de pautas actualizadas para interpretar variantes genéticas, que incluyen criterios estandarizados y estrictos para la clasificación (Figura 15).

Para el caso específico de las canalopatías, Campuzano et al. han propuesto un sistema de puntuación numérica para clasificar una variante (Tabla 12), 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 con predicciones *in silico*, y estudios *in vitro* e *in vivo*; la segregación de la mutación en la familia; y la información clínica que existe disponible sobre la variante.

Actualmente, la compleja correlación entre el genotipo y el fenotipo de las AHs es objeto de una extensa investigación. Por un lado, la prioridad es mejorar el rendimiento de las pruebas genéticas. Dada la enorme variación genética y la baja representación de la población Latina en este tipo de estudios, se necesita describir el espectro de variantes. Por otro lado, es necesario comprender mejor la fisiopatología de las AHs, los mecanismos que causan

las arritmias y las posibles implicaciones del diagnóstico molecular en el tratamiento farmacológico.

MUY FUERTE	PVSI	Variante nula (sin sentido, desplazamiento de fotogramas, canónica ± 1 o 2 sitios de empalme, codón de iniciación, delección simple o multiexón) en un gen donde el LOF es un mecanismo conocido de enfermedad.
FUERTE	PS1	El mismo cambio de aminoácidos que una variante patogénica establecida previamente, independientemente del cambio de nucleótidos.
	PS2	De novo (tanto la maternidad como la paternidad confirmadas) en una paciente con la enfermedad y sin antecedentes familiares.
	PS3	Estudios funcionales in vitro o in vivo bien establecidos que respaldan un efecto dañino en el gen o producto génico.
	PS4	La prevalencia de la variante en los individuos es significativamente mayor en comparación con la prevalencia en los controles.
MODERADO	PM1	Ubicado en un hotspot mutacional y/o dominio funcional crítico y bien establecido (p. Ej., Sitio activo de una enzima) sin variación benigna.
	PM2	Ausente en controles (o con una frecuencia extremadamente baja si es recesivo) en Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project o Exome Aggregation Consortium.
	PM3	Para trastornos recesivos, detectados en trans con una variante patogénica.
	PM4	La longitud de la proteína cambia como resultado de eliminaciones/inserciones en el marco en una región no repetida o variantes de pérdida de codón de paro.
	PM5	Cambio nuevo de sentido erróneo en un residuo de aminoácido donde se ha visto anteriormente un cambio de sentido erróneo diferente determinado como patógeno.
	PM6	Asumido de novo, pero sin confirmación de paternidad y maternidad.
DE APOYO	PP1	Cosegregación con enfermedad en múltiples miembros de la familia afectados en un gen que definitivamente se sabe que causa la enfermedad.
	PP2	Variante sin sentido en un gen que tiene una baja tasa de variación sin sentido benigna y en el que las variantes sin sentido son un mecanismo común de la enfermedad.
	PP3	Múltiples líneas de evidencia computacional respaldan un efecto nocivo sobre el gen o producto genético (conservación, evolución, impacto de empalme, etc.).
	PP4	El fenotipo o los antecedentes familiares del paciente son altamente específicos para una enfermedad con una sola etiología genética.
	PP5	Una fuente de buena reputación informa recientemente que la variante es patógena, pero la evidencia no está disponible para que el laboratorio realice una evaluación independiente.

PATOGÉNICO	(i) 1 MUY FUERTE + ≥ 1 FUERTE o ≥ 2 MODERADA o 1 MODERADA + 1 DE APOYO o ≥ 2 DE APOYO	PROBABLEMENTE PATOGÉNICO	(i) 1 MUY FUERTE + 1 MODERADA o	Significado incierto	(i) Los criterios de patogenicidad o benignidad no se cumplen
	(ii) ≥ 2 FUERTE o		(ii) 1 FUERTE + 1-2 MODERADA o		(ii) Los criterios de patogenicidad y benignidad son contradictorios
(ii) 1 FUERTE + ≥ 3 MODERADA o 2 MODERADA + ≥ 2 DE APOYO o 1 MODERADA + ≥ 4 DE APOYO	(iii) 1 FUERTE & ≥ 2 DE APOYO o	(iv) ≥ 3 MODERADA o			
	(v) ≥ 2 MODERADA + ≥ 2 DE APOYO o	(vi) 1 MODERADA + ≥ 4 DE APOYO			

Figura 15. Clasificación de patogenicidad de variantes genéticas según el ACMG (Modificado de Richards et al., 2015)

Tabla 12. Clasificación de patogenicidad de variantes genéticas asociadas con canalopatías arritmogénicas (Tomado de Campuzano et al. 2015).

Criterio	Variación genética	Puntuación
Comprobación clínica	- Identificada en un gen relacionado con la enfermedad	3 puntos
	- Identificada en un gen nuevo	2 puntos
Base 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 in vitro	- Resultado positivo	2 puntos
	- Resultado negativo	0 puntos
Estudios in vivo	- Resultado positivo	2 puntos
	- 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 punto
	- Resultado negativo o no disponible en bases de datos diferentes	0 puntos

Patogénico (≥ 12 puntos)	Probablemente patogénico (11-9 puntos)	Variante de significado incierto (8-5 puntos)	Probablemente no patogénico (≤ 4 puntos)	Benigno (Variante reportada en estudios de población con un MAF >1% y/o no segregación en familiares afectados)
------------------------------------	--	---	--	---

II. Planteamiento del Problema

Las arritmias hereditarias (Síndrome de QT largo, Síndrome de Brugada, Disfunción del nodo sinusal, Síndrome de QT corto, Taquicardia Ventricular Polimorfa Catecolaminérgica) son enfermedades que alteran el funcionamiento normal del corazón al causar anomalías en su ritmo. Cada una de estas enfermedades posee características clínicas (síntomas y alteraciones en estudios de función cardiaca) y genómicas (variantes), las cuales pueden sobreponerse entre sí, pudiendo dificultar el diagnóstico. En la población mexicana existen reportes aislados de variantes relacionadas con estas enfermedades, pero, el espectro de estas variantes y la relación que ellas puedan tener con el fenotipo de los pacientes se desconoce. Debido a lo anterior proponemos la siguiente pregunta:

¿Cuáles son las características clínicas y genómicas de un grupo de pacientes mexicanos con arritmias hereditarias?

III. Hipótesis

En la población mestiza mexicana existen variantes genéticas de interés clínico diferentes a las reportadas en otras poblaciones. El estudio clínico y genómico de pacientes con CA contribuirá a entender mejor estas enfermedades y las variantes genéticas que las causan.

IV. Justificación

La muerte súbita cardíaca (MSC) es una de las principales causas de muerte en adultos jóvenes y niños en todo el mundo, frecuentemente es debida a arritmias hereditarias. Diferentes estudios han determinado que hasta el 30% de los casos de muerte súbita inexplicada (MSI) pueden deberse a AH. En las últimas dos décadas se han identificado una gran cantidad de genes involucrados en estas enfermedades y se han descrito mutaciones que pueden causar diferentes AH. Sin embargo, en una proporción significativa de pacientes con un fenotipo bien definido, la secuenciación de nueva generación no ha permitido identificar la variante causal de la enfermedad. Las poblaciones latinas están subrepresentadas en los estudios genómicos de las AH. Aunque existen informes aislados de variantes patogénicas en pacientes mexicanos con arritmias hereditarias, no se ha descrito el espectro de estas variantes en la población general. La identificación de nuevas variantes causales puede contribuir a la mejor comprensión de estas enfermedades, puede ser útil para el diagnóstico y el tratamiento oportunos de los pacientes, así como para identificar familiares en riesgo de muerte súbita. Además, la descripción de variantes genéticas en poblaciones subrepresentadas como la mexicana pueden dar elementos que ayuden a reclasificar variantes genéticas que sean consideradas como de significado clínico desconocido.

V. Objetivo general

Caracterizar clínica y genómicamente a los pacientes mexicanos con arritmias hereditarias y sus familiares, describir el espectro de las variantes y su relación con el fenotipo de la enfermedad.

VI. Objetivos específicos

1. Describir las características clínicas de los pacientes seleccionados con arritmias hereditarias.
2. Identificar el espectro de variantes de los pacientes con arritmias hereditarias.
3. Determinar las formas de herencia en los casos familiares de los diferentes tipos de arritmias.
4. Analizar las características genotipo-fenotipo en los pacientes diagnosticados con arritmias hereditarias.
5. Comparar los criterios de Campuzano y los criterios de la ACMG para definir la patogenicidad de las variantes.

VII. Materiales y Métodos

1. Tipo de estudio

El estudio es de tipo observacional, retrospectivo, transversal, descriptivo.

2. Muestreo

El muestreo fue de tipo consecutivo.

3. Población de estudio.

1. 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 (Anexo 1). Se incluyeron pacientes de ambos sexos, con diagnóstico clínico de canalopatía arritmogénica (CA), el cual fue determinado según los criterios de Schwartz para el Síndrome de QT largo, los criterios del consenso de Síndrome de Brugada para el síndrome de Brugada, y finalmente la guía de manejo de pacientes con arritmias ventriculares y la guía de manejo de pacientes con bradicardia y retraso en la conducción cardíaca de la Asociación Estadounidense del Corazón (AHA) para la Taquicardia Ventricular Polimorfa Catecolaminérgica y Disfunción del nodo sinusal, respectivamente. No fueron incluidos aquellos pacientes que presentaron alteraciones estructurales del músculo cardíaco evidentes en estudios paraclínicos, o que contaran con diagnóstico de enfermedad cardíaca atribuible a una cardiomiopatía congénita o heredada (Tabla 13).

Tabla 13. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para la captación de pacientes.



Criterios de inclusión.

- Cumplir con los criterios clínicos para el diagnóstico de alguna arritmia hereditaria según los lineamientos de la AHA, CCSB, AFMA.
- Aceptar participar en el estudio.



Criterios de exclusión.

- Presentar alteraciones estructurales del músculo cardíaco evidentes en estudios paraclínicos.
- Contar con diagnóstico de enfermedad cardíaca atribuible a una miocardiopatía congénita o heredada.



Criterios de eliminación.

- Presentar en el transcurso del estudio evidencia de alteraciones estructurales del músculo cardíaco.
- Deseo de participante de retirarse del estudio.

Los pacientes fueron referidos del INCICH y de otras instituciones de salud pública, como también a través de la consulta privada de diferentes médicos especialistas en todo el territorio mexicano. Los datos clínicos de pacientes y de los familiares que aceptaron participar en el estudio, se obtuvieron mediante recopilación de información proveniente del expediente médico, incluyendo estudios de gabinete (electrocardiogramas, Holter,

pruebas de esfuerzo, estudios electrofisiológicos, ecocardiogramas, cardioresonancias, etc.). El registro de antecedentes heredofamiliares se llevó a cabo mediante entrevista directa con el caso índice o con alguno de sus familiares. Durante la entrevista también se realizó un árbol genealógico y se recolectó una muestra de sangre periférica de aproximadamente 10cc para la extracción de ADN del caso índice y de todos los familiares de primer grado disponibles.

4. Extracción de DNA genómico

El DNA genómico fue extraído a partir de leucocitos en sangre total en EDTA en todos los casos de CA y sus familiares, para esto se utilizó el kit Maxi Blood de QIAGEN (Cat. 51194), para el cual se colocaron, en un tubo de centrifugado de 50 ml, 500 ul de QUIAGEN protease (Cat No./ID: 19155), se agregaron luego 5 ml de sangre homogeneizada y se mezcló gentilmente. Seguido de esto se añadieron 6 ml de buffer AL (Cat No./ID: 19075) y se mezclaron por inversión 15 veces, posteriormente se agitaron vigorosamente por 1 min, al realizar esto se incubaron a 70 C° por 10 min. Al terminar la incubación se añadieron 5 ml de etanol 100% frío (-20 C°) y se mezclaron por inversión 10 veces, luego vigorosamente por 30 s. Se traspasó todo el contenido a la columna, se centrifugó a 1850 g (3000 rpm) por 3 min, luego de retirar de la centrífuga, se descartó el filtrado y se agregaron 5 ml de buffer AW1 (Cat. no. 19081) a la columna y se centrifugó a 4500 g (5000 rpm) por 1 min. Luego de retirar de la centrífuga, se agregaron 6 ml de buffer AW2 (Cat. no. 19072) a la columna, lo cual se volvió a centrifugar, esta vez a 4500 g (5000 rpm) por 15 min. Se agregaron 350 ul de H₂O grado BM (Cat. H20MB0106) sobre la membrana, se tapó y dejaron por 2 horas, se centrifugaron y el filtrado se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml previamente identificados. La integridad del DNA extraído se observó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.0% (Anexo 4), teñido con GelRed® 10,000X en agua (Cat. B05- 41003) y cuantificado por espectrofotometría en el Nanodrop 2000 (Cat. ND2000).

5. Secuenciación de Nueva Generación (SNG)

El abordaje inicial para el estudio genético de los casos índice sin análisis previo y los casos de MSI, fue la SNG sitio-dirigida, la cual se llevó a cabo mediante el kit comercial de secuenciación TruSight Cardio® de Illumina (Cat. FC-141-1011) que permitió secuenciar las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes de 174 genes implicados en diferentes condiciones cardíacas hereditarias. El proceso de SNG se realizó en un

secuenciador Mi-Seq® (Illumina). Esta estrategia también se aplicó a los pacientes en quienes no se encontró un diagnóstico molecular definitivo que fueron estudiados previamente con plataformas de SNG diferentes (Figura 16). En 3 familias se realizó secuenciación del exoma utilizando el kit All Exome Sequencing Sure Select versión 5 de Agilent.

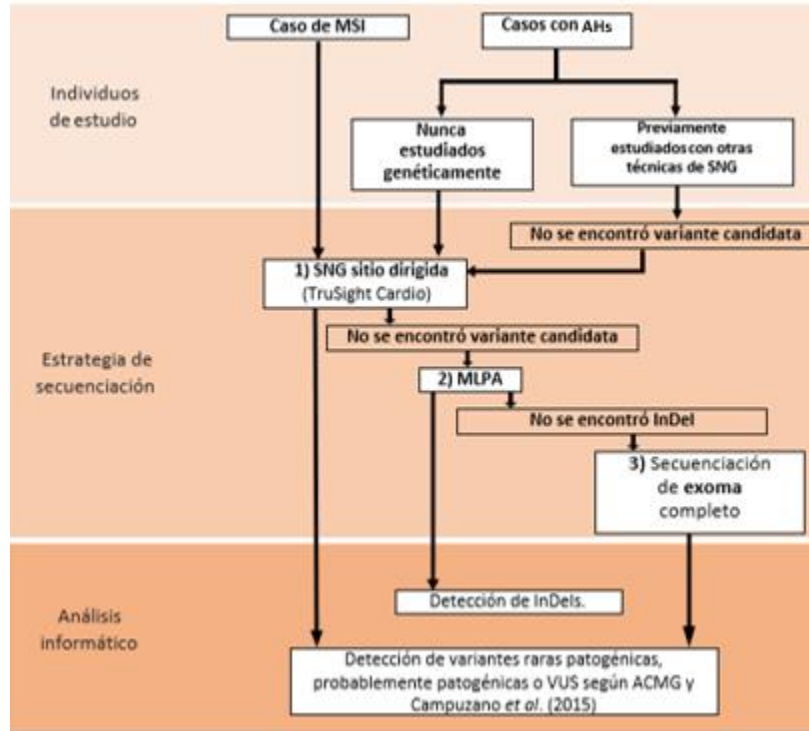


Figura 16. Estrategias de secuenciación de nueva generación para la identificación de variantes patogénicas que causan AHD.

6. Procesamiento de datos obtenidos por SNG

Los datos crudos del proceso de SNG se obtuvieron en formato FastQ-Sanger (Figura 17), la puntuación de calidad utilizada fue la escala Phred de probabilidades de error (Tabla 14).

```

Etiqueta                               Secuencia
@FORJUSP02AJWD1
CCGTC AATT CATT TAAGTTT AACCTTGCGGCCG TACTCCCAGGCGGT
+
AAAAAAAAAAAA: :99@: : :??@: : FFAAAAACCAA: : :BB@@?A?
Base = T, Q = A = 25                    Puntaje Q (Calidad ASCII)

```

Figura 17. Formato FastQ-Sanger. Este formato consta de cuatro líneas para cada lectura. La línea 1 comienza con un carácter “@”, seguido del nombre del identificador del secuenciador dado a la lectura por el secuenciador, como se describió anteriormente. 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, Fields, Goto, Heuer, & Rice, 2009) .

Tabla 14. Escala Phred de probabilidades de error. *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, 1998b, 1998a).

Q (Calidad Phred)*	Probabilidad de detección errónea	Precisión de la detección
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1000	99.9%
40	1 en 10000	99.99%
50	1 en 100000	99.999%

7. Reporte de calidad

Los datos con un valor Phred ≥ 30 que se encontraron en ambas hebras del DNA y en más de 10 lecturas se consideraron de calidad confiable y fueron empleadas para el análisis de datos.

8. Procesamiento de datos

Los datos crudos en formato FastQ-Sanger fueron procesados a través de una tubería bioinformática (pipeline) con el alineamiento de las lecturas respecto a un genoma de referencia, en la mayoría de los casos hg19, GRCh37; para luego realizar la detección de variantes (Figura 18).

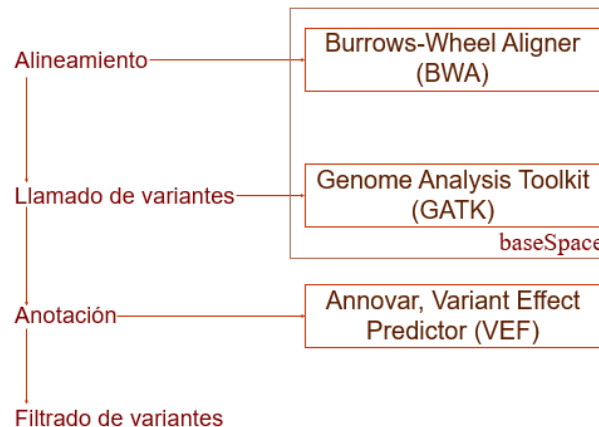


Figura 18. Pipeline o tubería informática para el análisis de datos genómicos obtenidos con diferentes tecnologías y plataformas de SNG.

El alineamiento se realizó con el paquete BWA Enrichment v2.1.0 (H. Li & Durbin, 2010)

de acuerdo a los parámetros por defecto del paquete BaseSpace de Illumina o directamente en un pipeline bioinformático generado para estos fines. Se obtuvo como resultado del alineamiento un archivo SAM (Sequence Alignment/Map). 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 programa de código abierto Genome Analysis Toolkit (GATK) versión 4-1-2-0, (software.broadinstitute.org)(Depristo et al., 2011).

9. Anotación de variantes

La anotación de variantes se realizó con los softwares ANNOVAR (<http://wannovar.wglab.org>) (H. Yang et al., 2016) y/o Variant Effect Predictor (<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) (McLaren et al., 2016). Con estos programas se obtuvo la siguiente información de cada variante:

- a) El cambio de aminoácido y su posición en la proteína.
- b) 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, Henikoff, & Ng, 2009) entre otros. En promedio se utilizaron 12 programas de predicción diferentes por variante (Anexo 3).
- c) La frecuencia alélica en diferentes poblaciones del mundo según los proyectos Genome Aggregation Database (GnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) (Karczewski et al., 2020) y 1000 Genomes (<https://www.internationalgenome.org/>) (Altshuler et al., 2010).
- d) Datos clínicos reportados por la base de datos ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

10. Selección de Variantes de Interés

Se consideraron variantes de interés clínico de AHs 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 contaran con las siguientes características:
 - a) Que interrumpen o alteren el marco de lectura abierto (i.e. variantes 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) Que fueran nuevas (no reportadas) o raras (frecuencia del alelo menor < 0.001 de acuerdo con la base GnomAD Browser o 1000 Genomes Browser).
 - c) Variantes de sentido erróneo que tuvieran una predicción funcional dañina o deletérea en ≥ 8 programas computacionales.
3. Variantes con las características descritas previamente, pero localizadas en genes causales de otras Cas.
4. Polimorfismos raros ($MAF < 0.005$) y comunes ($MAF > 0.005$) en genes causales de AHs encontrados con mayor frecuencia en la población Latina de GnomAD Browser.

10. Secuenciación Sanger.

Al tener seleccionadas nuestras variantes de interés, se confirmó su presencia a través de secuenciación por terminación Sanger en los casos índice y sus familiares disponibles para buscar co-segregación, o dado el caso, mutaciones *de novo*. Se utilizó el kit BigDye® Direct Cycle Sequencing (Cat. N° 4458687) (Figura 19).

Al finalizar estos pasos, se realizó la electroforesis capilar de cada una de las muestras en un Secuenciador Automático 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems), se obtuvieron

como resultados electroferogramas en archivos .ab1, los cuales fueron visualizados en el programa FinchTV (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>).

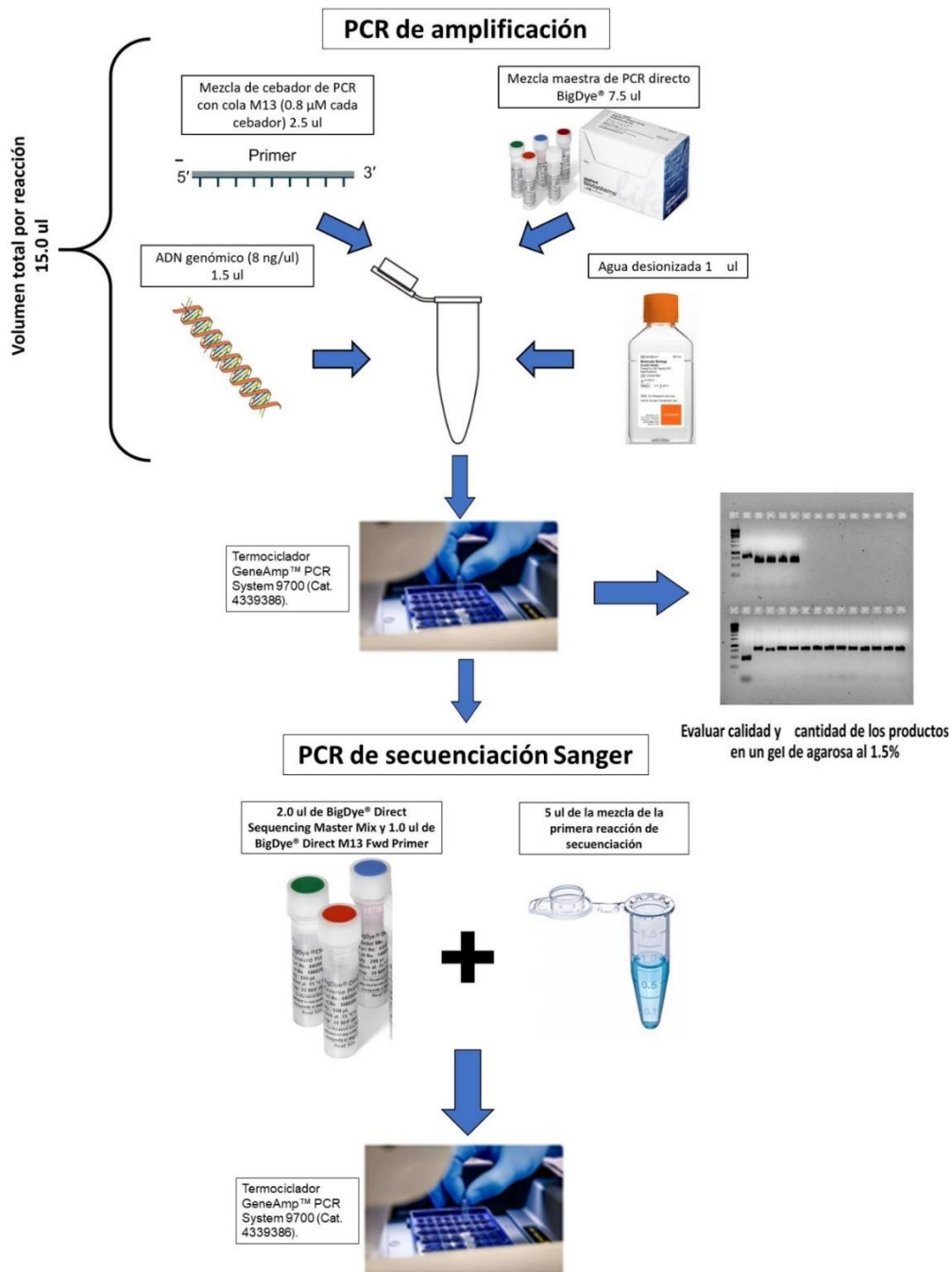


Figura 19. Proceso de secuenciación Sanger

11. Valoración de patogenicidad

Las variantes de interés fueron evaluadas por los criterios del ACMG, con ayuda del programa en línea Varsome (varsome.com) y los criterios propuestos por Campuzano et al., (2015). Se compararon los resultados de ambos criterios, clasificando cada variante como patogénica, probablemente patogénica o variante de significado clínico desconocido.

12. Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA)

En aquellos casos donde no se pudo encontrar una variante candidata, se aplicó la técnica de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples. El proceso, inició con la desnaturalización de ADN (Día 1), donde se etiquetaron los tubos o tiras de 0,2 ml, seguido de la colocación de 5 ul de muestra de ADN (35 ng/ul) a cada tubo. Se utilizó TE para el control negativo de ADN. Los tubos fueron colocados en el termociclador; se desnaturalizó la muestra de ADN durante 5 min a 98 °C; luego se enfrió a 25 °C antes de retirar los tubos del termociclador. Para preparar la reacción de la hibridación, se agitó el amortiguador MLPA y el MLPA probemix antes de usarse. Se preparó una mezcla maestra de hibridación que contenía para cada reacción: 1.5 ul de amortiguador MLPA + 1.5 ul de probemix., mezclándose bien mediante pipeta o agitador. Después de la desnaturalización del ADN, se agregaron 3 ul de mezcla maestra de hibridación a cada tubo de muestra. Se mezcló bien con una pipeta arriba y abajo. Se continuó con el programa del termociclador: se incubó durante 1 min a 95 °C, luego de 16 a 20 horas a 60 °C. Para la reacción de la ligación (Día 2) agitamos los dos amortiguadores Ligase (A y B) antes de usarlos. Preparamos una mezcla maestra Ligase-65. Para cada reacción, se mezclaron: 25 ul de dH₂O + 3 ul de Ligase Buffer A + 3 ul de Ligase Buffer B. Luego se agregó 1 ul de la enzima Ligase-65. Se mezcló bien por pipeta suavemente hacia arriba y hacia abajo. Nunca se agitaron las soluciones enzimáticas. Continuamos con el programa del termociclador: pausa a 54 °C. Cuando las muestras estaban a 54 °C, se agregaron 32 ul de mezcla maestra de ligasa a cada tubo. Se mezcló suavemente por pipeta hacia arriba y hacia abajo. Es importante resaltar que la mezcla maestra de ligasa debe agregarse mientras las muestras están en el termociclador. Se continuó con el programa del termociclador: 15 min de incubación a 54 °C (para ligadura); 5 min a 98 °C para la inactivación por calor de la enzima Ligase-65. Pausa a 20 °C. En este punto, los tubos se extrajeron del termociclador. Finalmente se preparó la reacción de PCR. El SALSA PCR primer mix fue agitado. La polimerasa se calentó durante 10 s en la mano para reducir la

viscosidad. Al tener los reactivos listos, se realizó la mezcla maestra de polimerasa. Para cada reacción, se mezclaron: 7.5 ul de dH₂O + 2 ul de la mezcla de cebador SALSA PCR + 0.5 ul de SALSA Polimerasa. Se mezclaron bien por pipeta arriba y abajo. A temperatura ambiente, se agregaron 10 ul de mezcla maestra de polimerasa a cada tubo. Se mezclaron por pipeta suavemente hacia arriba y hacia abajo. Posterior a esto se colocaron los tubos en el termociclador y continuó el programa del termociclador; 35 ciclos de 30 s a 95 °C; 30 s 60 °C; 60 s 72 °C. Se terminó con 20 min de incubación a 72 °C; y se pausó a 15 °C. Los resultados de este proceso fueron procesados para lectura de fragmentos, y los resultados fueron analizados en el programa coffalyser (https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_6MeHxYlkoncoMKK1lyFiV7oYoxUldFXrxFIKiljS2m59PkUkDgPZyA).

13. Análisis estadístico

Las variables numéricas se expresaron como media \pm DE y categóricas como porcentajes. Al realizar comparaciones entre variables categóricas y variables numéricas se utilizó la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney. Las variables categóricas se analizaron utilizando chi-cuadrada o la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. Todos los análisis se realizaron con la información disponible de las variables utilizando la versión SPSS 25; Los valores de $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

VIII. Resultados

1. Población de estudio

Previo al inicio de este análisis, 80 pacientes y sus familias habían sido captados entre junio de 2012 y julio de 2018. Luego, 6 pacientes y sus familiares fueron captados desde agosto de 2018 hasta septiembre de 2019, dando un total de 86 pacientes mexicanos mestizos con diagnóstico definitivo o probable de AH, incluyendo: 34 pacientes con SQTL, 14 pacientes con SBr, 13 pacientes con DNS, 5 pacientes con TVPC, y 20 pacientes con un diagnóstico no bien definido. De éstos, 74 fueron captados en el Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez' (INCICH), 9 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. Se recolectó información de 344 familiares de primer grado, dando un total de 430 casos para el estudio.

2. Diagnóstico clínico

Se realizó una revisión de historias clínicas en el Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez (INCICH), utilizando un formato de recolección de datos (Anexo 2), con el cual se alimentó una base de datos clínicos. En estas historias se encontró cambio o actualización de diagnóstico en 20 casos índice, de los cuales fueron eliminados 10 por no cumplir criterios diagnósticos de canalopatía arritmogénica. Luego de este proceso de análisis, el total de casos índices incluidos en el estudio fue de 76 (Tabla 15).

3. Diagnóstico Molecular

El diagnóstico molecular de un paciente fue definido como el hallazgo de al menos una variante clasificada como patogénica o probablemente patogénica. El primer abordaje del estudio genético fue la SNG sitio-dirigida. Previo al inicio de este análisis, ya se había realizado estudio molecular en los 80 pacientes registrados hasta ese momento, utilizando diferentes plataformas para la SNG (IonTorrent, Haloplex y el panel TruSight Cardio). Los 6 pacientes restantes fueron secuenciados durante la realización de este análisis, utilizando únicamente el panel TruSight Cardio. El análisis de calidad de datos

mostró que el porcentaje de cobertura de la región blanco fue >95% en todos los datos provenientes de SNG sitio-dirigida de este estudio. Sin embargo, la profundidad (i.e. número de veces que cada base fue leída) fue notablemente baja empleando la técnica de IonTorrent y el panel Haloplex, por lo que 38 muestras requirieron volver a secuenciarse con el panel de TruSight Cardio.

Todas las variantes que cumplieron con los criterios de elección previamente establecidos fueron confirmadas por secuenciación Sanger. Luego del análisis de los resultados moleculares, se eliminaron a 4 casos por presentar durante su evolución datos ecocardiográficos de cardiomiopatía dilatada, quedando un total de 72 casos índice en este estudio, de los cuales se realizó diagnóstico molecular en 47 casos (Tabla 15).

Tabla 15. Rendimiento diagnóstico.

SÍNDROME	PACIENTES (n=)	DIAGNOSTICO MOLECULAR (n=)	DIAGNOSTICO MOLECULAR (%)
SQTL	34	26	76
SBR	14	8	57
DNS	13	9	69
TVPC	5	1	20
OTRO DIAGNOSTICO	6	3	50
TOTAL	72	47	65

Al tener alguna variante de interés clínico en el caso índice, se buscó la presencia de esta en sus familiares a través de secuenciación Sanger. De 255 familiares disponibles, 46 familiares fueron positivos, resultando en un total de 93 casos con diagnóstico molecular.

El estudio de MLPA se llevó a cabo en 25 casos, cuando la SNG sitio-dirigida no reveló variantes potencialmente patogénicas, encontrando una duplicación del exón 2 del gen *KCNH2* en un solo caso con SQTL (SQTL-21), el cual no se encontró en sus familiares.

De los diferentes tipos de variantes encontradas, la mayor parte eran variantes de un sólo nucleótido (SNVs) con sentido erróneo (no sinónimas). Una menor proporción de variantes causaba un cambio de marco de lectura o fueron variantes sin sentido (codones de paro) (Tabla 16).

Tabla 16. Tipos de variantes encontradas

Tipo de Variantes	Frecuencia	Porcentaje (%)
Sentido erróneo	34	71
Sin sentido	11	23
InDel	2	4
Sitio donador de Splicing	1	2
Total	48	100

Con respecto a la distribución de genes con mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas, el gen con mayor frecuencia de variantes de este tipo fue *SCN5A* (43%), seguido por los genes *KCNH2* (24%) y *KCNQ1* (18%) (Figura 20).

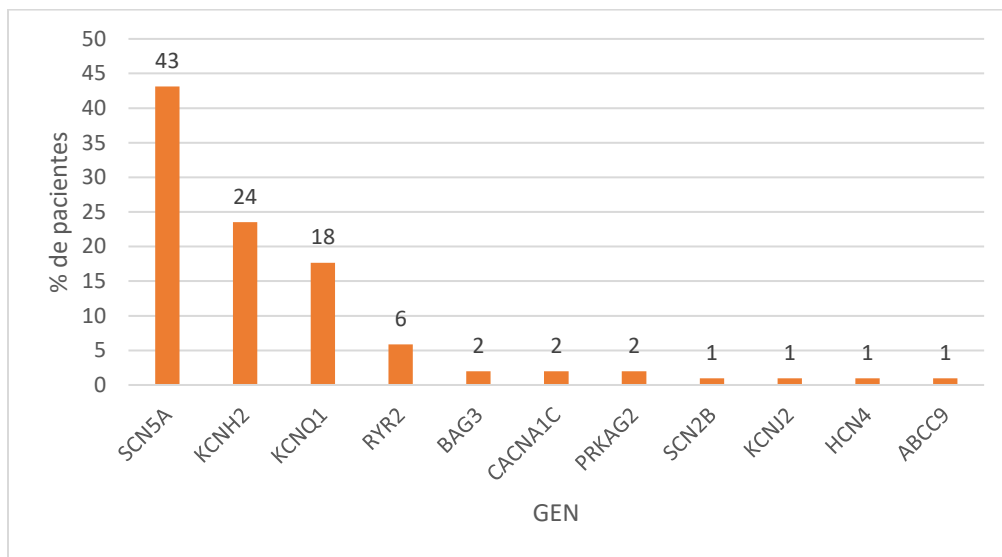


Figura 20 Frecuencia de variación en genes específicos.

4. Análisis Genético en casos con SQT

Se estudiaron 32 casos índice mestizo-mexicanos con fenotipo de SQT Romano-Ward (SQT-RW) y 2 con fenotipo de Jervell Lange-Nielsen (SQT-JLN). El 62% de los casos fue de sexo femenino. El 91% de los casos tuvo una puntuación de Schwartz >4 puntos. El síncope fue el síntoma más recurrente entre los casos (62%), mientras que el 32% presentó un evento de muerte súbita. La mayor parte (77%) recibía tratamiento con β -bloqueador y poco menos de la mitad (44%) era portador de un DAI (Tabla 17).

Tabla 17. Características clínicas de los casos índice con SQTL

Paciente	Sexo	Edad de inicio de sintomatología	Edad al diagnóstico	QTc (ms)	Síntomas y eventos documentados	Historia familiar de MSC y SQTL	Puntuación de Schwartz	Tratamiento
SQTL-1	Femenino	-	-	532	Síncope (estrés emocional)	Positiva	6.5 puntos	Ninguno
SQTL-2	Femenino	11	19	560	MSR (reposo)	Negativa	5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-3	Masculino	16	16	506	Síncope (reposo)	Positiva	6 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-4	Masculino	24	24	460	Síncope (esfuerzo físico)	Positiva	6.5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-5	Femenino	2	2	505	Síncope y TdP (esfuerzo físico)	Negativa	6 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-6	Femenino	20	20	533	Síncope (esfuerzo físico), sordera congénita.	Positiva	7 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-7	Masculino	2	2	540	Ninguno	Positiva	4.5 puntos	β -bloqueadores
SQTL-8	Femenino	7	23	625	Síncope, TdP y MSR (esfuerzo físico).	Negativa	6 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-9	Femenino	37	39	575	Síncope, MSC y TdP (Estrés emocional)	Negativa	7.5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-10	Femenino	17	22	502	Síncope y TdP (esfuerzo físico)	Positiva	9 puntos	β -bloqueadores
SQTL-11	Femenino	27	27	487	MRS (En reposo)	Negativa	5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-12	Masculino	6	0	450	Ninguno	Negativo	3 puntos	β -bloqueadores
SQTL-13	Masculino	7	9	481	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	6 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-14	Femenino	0	36	502	Ninguno	Positiva	4 puntos	Ninguno
SQTL-15	Masculino	10	10	490	Síncope (esfuerzo físico)	Positiva	6.5 puntos	β -bloqueadores
SQTL-16	Masculino	18	20	550	Síncope (reposo)	Negativa	5.5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-17	Masculino	8	0	590	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	7 puntos	Ninguno
SQTL-18	Masculino	5	9	576	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	7 puntos	DAI
SQTL-19	Femenino	22	22	621	MRS y TVH (Sueño)	Negativa	5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-20	Femenino	2	9	600	Ninguno	Negativo	3 puntos	Ninguno
SQTL-21	Femenino	57	57	590	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-22	Femenino	1	1	653	Síncope (estrés emocional)	Positiva	4.5 puntos	β -bloqueadores
SQTL-23	Femenino	28	28	501	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	6 puntos	β -bloqueadores
SQTL-24	Femenino	18	23	515	Síncope (reposo)	Negativa	5 puntos	β - bloqueadores, DAI
SQTL-25	Femenino	16	16	560	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	5 puntos	β -bloqueadores
SQTL-26	Masculino	12	18	491	TVH	Negativo	3 puntos	β -bloqueadores
SQTL-27	Masculino	6	6	560	Síncope (esfuerzo físico)	Negativa	7 puntos	Ninguno

SQTL-28	Femenino	5	7	-	Síncope y MS (esfuerzo físico)	Negativa	No aplica (caso de MSI)	β -bloqueadores
SQTL-29	Femenino	17	23	554	Síncope y TdP (Reposo)	Negativa	5 puntos	β -bloqueadores, Marcapasos
SQTL-30	Masculino	10	10	523	Síncope (Esfuerzo físico)	Positivo	5 puntos	β -bloqueadores
SQTL-31	Femenino	2	6	523	Síncope y MSR (esfuerzo físico), sordera congénita.	Negativo	5.5 puntos	β -bloqueadores
SQTL-32	Femenino	15	16	567	Ninguno	Negativo	3 puntos	β -bloqueadores, DAI
SQTL-33	Masculino	3	3	527	Síncope	Negativo	5 puntos	Marcapasos
SQTL-34	Femenino			-	-	-	-	Ninguno

La prueba genética en pacientes con SQTL se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG y MLPA (Anexo 5).

Al realizar el análisis molecular, se encontró que 26 (76%) de nuestros casos poseían una variante clasificada como patogénica o probablemente patogénica, un 6% poseía variantes de significado incierto (VUS), y en 6 casos (20%) no se identificó ninguna variante de interés (Figura 21). En este grupo se encontraron los únicos dos casos de homocigocidad (3% del total) ambos con diagnóstico de síndrome de Jervell-Lange-Nielsen.

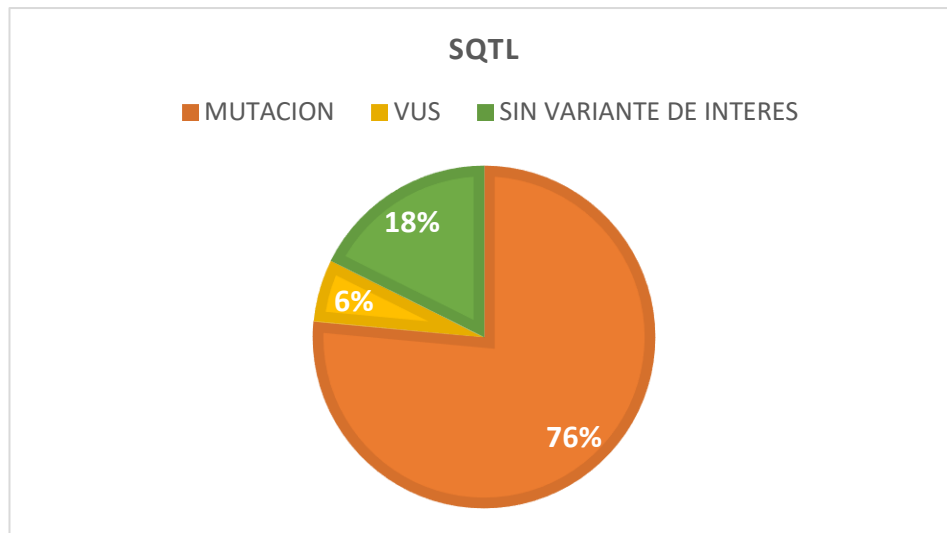


Figura 21. Diagnóstico molecular de los pacientes con SQTL.

De manera general, *KCNH2* y *KCNQ1* fueron los genes con mayor número de variantes patogénicas o probablemente patogénicas. Notablemente, se encontraron dos casos con variantes en el gen *RYR2* únicamente, el cual se conoce como gen causal de TVPC

(Figura 22, Tabla 18).

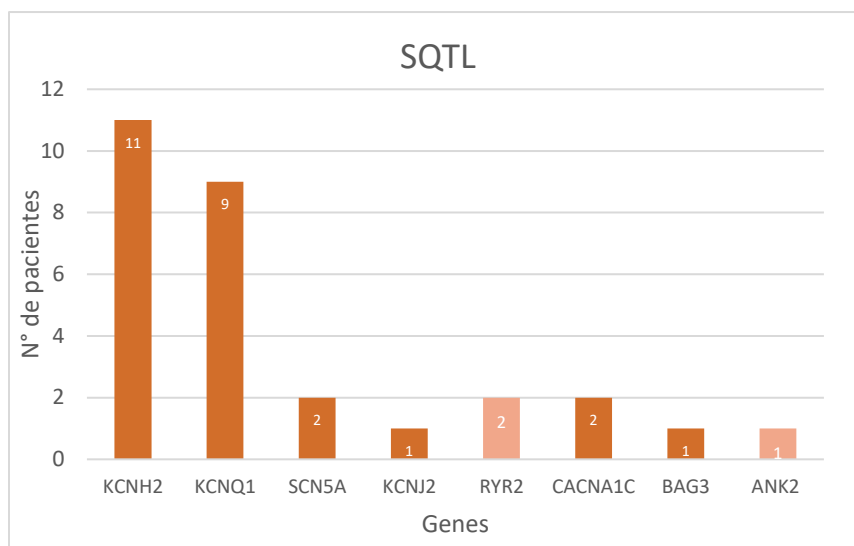


Figura 22. Distribución de genes afectados en pacientes con SQTL, variantes patogénicas o probablemente patogénicas (color oscuro) y variantes de significado incierto (color claro).

Entre las variantes en genes causales de SQTL, 13 (50%) estaban reportadas como patogénicas, 9 (35%) fueron definidas como tal en el presente estudio mediante la evaluación a través de los criterios de patogenicidad ya mencionados, y 4 fueron clasificadas como VUS según estos criterios (Tabla 18). La variante *KCNH2* p.R885S, encontrada en el paciente SQTL-17, fue inicialmente clasificada como significado incierto por el ACMG, esta luego fue clasificada como probablemente patogénica según los criterios de Campuzano, principalmente por la puntuación obtenida por la cosegregación familiar.

Casos homocigotos y heterocigotos compuestos

El caso SQTL-28 fue un heterocigoto compuesto para variantes de cambio de sentido en *KCNQ1* (p.A300T/p.P535T); y la paciente SQTL-14 fue homocigota para una variante en *ANK2* (p.E1126G), y además presenta una variante sin sentido en forma heterocigota en el gen *BAG3* (Tabla 18) (Figura 23); es importante mencionar que las variantes con pérdida de función en este gen están asociadas a cardiomiopatía dilatada, pero al momento no ha presentado alteraciones estructurales de músculo cardíaco (37 años). Los dos únicos casos con diagnóstico clínico de síndrome de Jervell-Lange-Nielsen (SQTL-6 y SQTL-31), fueron homocigotos para variantes en *KCNQ1* (p.G168R y

p.Q521*). Además, se encontró a un hermano del caso SQTL-7 con una variante homocigota en *KCNQ1* p.K414Sfs*5, el cual presentaba un QTc >480 ms, sordera congénita y sufrió MSC a los 8 años; sugiriendo un diagnóstico de síndrome de JLN.

Casos sin variantes en genes causales de SQTL

De los 6 pacientes sin variantes en genes causales de SQTL, 2 fueron portadores de variantes con cambio de sentido en *RYR2* (Tabla 18). Ninguna de éstas estaba previamente estudiada funcionalmente. Entre los 4 pacientes restantes, todos obtuvieron un resultado genético negativo en genes causales de CAs.

Paciente	Variantes en genes causales de SQT1								Variantes en genes causales de otras AHs / Miocardiopatías							
	Gen	Cambio cDNA	Cambio aminoácido	Identificador	Patogenicidad				Gen	Cambio cDNA	Cambio aminoácido	Identificador	Patogenicidad			
					ACMG	Criterios	CAMPUZANO	Puntuación					ACMG	Criterios	CAMPUZANO	Puntuación
SQTL-1	KCNH2	7_150649899_G/A ENST00000262186	p.Q391*	Sin id	Patogénico	PVS1, PM1, PM2, PP3	Probablemente Patogénico	8	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-2	KCNH2	7_150648643_C/T ENST00000262186	p.T613M	rs199473524	Patogénico	PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5, PS3	Probablemente Patogénico	11	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-3	KCNQ1	11_2610029_C/G ENST00000357077	p.D446E	rs199472780	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PM5, BP4, PP2	Significado incierto	8	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-4	KCNH2	7_150649784_G/C/G ENST00000262186	p.A429Lfs*5	rs794728498	Patogénico	PVS1, PM1, PM2, PP5	Probablemente Patogénico	10	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-5	CACNA1C	12_2693728_C/T ENST00000347598	p.L762F	Reportada (sin id)	Significado incierto	PM2, PP3, PP5, BP1	Probablemente Patogénico	10	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-6	KCNQ1	11_2591882_G/A ENST0000015584	p.G168R (Homocigoto)	rs1794890	Patogénico	PS1, PM1, PM2, PP2, PP3, PP5	Patogénico	12	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-7	KCNQ1	11_2608910_G/- ENST00000155840.5	p.K414Sfs*5	rs778786253	Patogénico	PVS1, PM2, BS2	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-8	KCNH2	7_150648640_G/A ENST00000262186	p.A614V	rs199472944	Patogénico	PM1, PM2, PP1, PP2, PP3, PP5	Patogénico	12	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-9	KCNJ2	17_68171587_C/T ENST00000243457.3	p.S136F	rs199473376	Patogénico	PS3, PM1, PM2, PP2, PP3	Significado incierto	8	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-10	KCNH2	7_150648846_-/T ENST00000262186.5	p.G546Rfs*109	Sin id	Patogénico	PVS1, PM2, PP3	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-11	CACNA1C	12_2702421_G/A ENST00000347598.4	p.R858H	rs786205753	Significado incierto	PM2, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	11	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-13	KCNQ1	11_2594125_C/T ENST00000155840	p.S277W	rs199472730	Patogénico	PM1, PM2, PM5, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-14	ANK2	4_114254362_A/G ENST00000357077	p.E1126G (Homocigoto)	rs1166721962	Significado incierto	PM2, PP3, BM1	Probablemente Patogénico	9	BAG3	10_121432010_C/T ENST00000369085	p.Q251X	rs1343231277	Patogénico	PVS1, PM2, PP3	Probablemente Patogénico	9
SQTL-15	KCNH2	7_150648656_C/T ENST00000262186	p.D609N	rs199472941	Patogénico	PM1, PM2, PP3, PP5	Patogénico	12	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-17	KCNH2	7_150645571_G/T ENST00000262186	p.R885S	rs143512106	Probablemente Patogénico	PM2, PP3	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SQTL-18	KCNH2	7_150648726_C/G ENST00000262186	p.W245C	rs199473430	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PM5, PP3, PP5	Significado incierto	9	-	-	-	-	-	-	-	-

		ENST000003308 83															
SQTL-19	-		-	-	-	-	-	-	RYR2	1_2379478 71_T/A ENST0000 0366574	p.Y4287N	rs190009333	Significado incierto	PM2, PP3	Significado incierto	8	
SQTL-20	KCNQ1	11_2591882_G/A ENST000001558 4	p.G168R	rs179489	Patogénico	PS1, PM1, PM2, PP2, PP3, PP5	Patogénico	12	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-21	DUP KCNH2 EXON 2		-	Reportada (sin id)	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-22	KCNQ1	11_2610029_C/G ENST000003570 77	p.D446E	rs199472780	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PM5, BP4, PP2	Significado incierto	8	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-23	SCN5A	3_38592932_C/T ENST000004136 89	p.R1644H	rs28937316	Patogénico	PM2, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	11	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-24	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-25	SCN5A	3_38592932_C/T ENST000004136 89	p.R1644H	rs28937316	Patogénico	PM2, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	10	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-26	KCNH2	7_150648871_C/ T ENST000002621 86.5	p.R537Q	rs794728373	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PP3, PP5	Significado incierto	8	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-27	KCNQ1	11_2604765_C/T ENST000001558 40	p.A341V	rs12720459	Patogénico	PS3, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	Patogénico	12	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-28	KCNQ1	11_2797202_C/A ENST000001558 40	p.P535T	Sin id	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PP2, PP3	Probablemente Patogénico	9	-		-	-	-	-	-	-	
	KCNQ1	11_2594193_G/A ENST000001558 40	p.A300T	rs120074187	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PP2, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	10	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-29	-		-	-	-	-	-	-	RYR2	1_2378380 75_G/A ENST0000 0366574	p.R2920Q	rs756302327	Significado incierto	PM2, PP3	Significado incierto	8	
SQTL-30	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-31	KCNQ1	11_2790120_C/T ENST000001558 40.5	p.Q521* (Homocigota)	Sin id	Patogénico	PSV1, PM1, PM2, PP3,	Significado incierto	8	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-32	KCNH2	7_150655281_G/ T ENST000002621 86.5	p.S261*	Sin id	Patogénico	PSV1, PM2, PP3	Significado incierto	8	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-33	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	
SQTL-34	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	

Tabla 18 Variantes identificadas en casos con SQTL

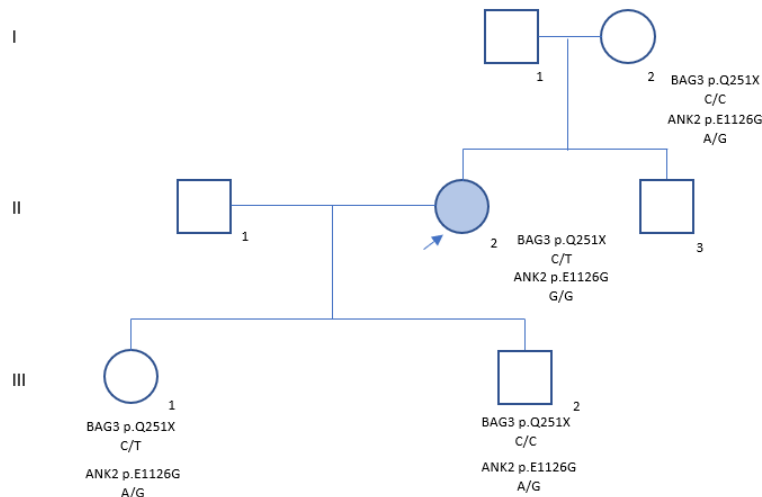


Figura 23 Árbol familiar del caso SQTL-14. Se muestran con una figura oscura al individuo con Diagnóstico de SQTL.

5. Análisis Genético en casos con SBr

Se estudiaron 14 pacientes con diagnóstico clínico de SBr. La mayor parte (86%) fue de sexo masculino. Siete presentaron patrón Brugada tipo I en el ECG en reposo, 2 pacientes requirieron de prueba con ajmalina para desenmascarar el patrón diagnóstico. El 43% de los casos índice había presentado un evento de síncope. El 50% recibía tratamiento con β -bloqueador y el 36% fue portador de un DAI (Tabla 19).

Tabla 19 Características clínicas de los casos índice con SBr

Pacientes	Sexo	Edad de inicio de sintomatología	Edad al diagnóstico	Sintomatología	Hallazgos en el ECG	Episodios electrofisiológicos	Historia familiar de MS o Cas	Tratamiento
SBr-1	Femenino	24	25	MSR	Patrón Brugada tipo I	Ninguno	MS en familiares de 1º grado	β -bloqueadores
SBr-2	Femenino	3	8	Palpitaciones, fatiga y síncope durante esfuerzo físico	Patrón Brugada tipo I, paro sinusal	TVP, TVM, TSV, Flutter auricular	CA en familiares de 1º grado	β -bloqueadores, DAI
SBr-3	Masculino	6	11	Palpitaciones y disnea	Patrón Brugada tipo I, paro sinusal	Taquicardia auricular, flutter auricular.	CA en familiares de 1º grado	Marcapasos
SBr-4	Masculino	51	51	Síncope y palpitaciones en reposo	Patrón Brugada tipo II en reposo. Patrón tipo I con ajmalina.	TSV. Estudio electrofisiológico negativo para TV	Negativa	Ninguno

					Bloqueo AV completo			
<i>SBr-5</i>	Masculino	15	0	Palpitaciones y mareos	Elevación S-T	FA	Negativa	β -bloqueadores
<i>SBr-6</i>	Masculino	18	18	Palpitaciones y síncope con esfuerzo físico	Patrón Brugada tipo I con ajmalina	Ninguno	MS en familiares de 1º grado	DAI
<i>SBr-7</i>	Masculino	28	28	Palpitaciones y disnea	Desnivel positivo del ST en V1-V3 y AVR	Extrasístoles ventriculares aisladas 2 morfologías	Negativa	Ninguno
<i>SBr-8</i>	Masculino	51	54	Síncope en reposo	Patrón Brugada tipo I, Bloqueo AV Bradicardia sinusal	Ninguno	Síncope en familiares de 1º grado	β -bloqueadores
<i>SBr-9</i>	Masculino	47	47	Ninguno	Patrón Brugada tipo I	Ninguno	MS en familiares de 1º grado	β -bloqueadores
<i>SBr-10</i>	Masculino	15	0	Palpitaciones y disnea		Flutter auricular	Negativa	Ninguno
<i>SBr-11</i>	Masculino	1 mes	1 mes	Palpitaciones y diaforesis con esfuerzos leves		FA, flutter auricular y TSV	Negativa	β -bloqueadores
<i>SBr-12</i>	Masculino	2	2	Convulsiones febriles seguido de MSR	elevación S-T V1	TSV, TVP	Negativa	DAI
<i>SBr-13</i>	Masculino	35	36	Síncope en reposo	Patrón Brugada tipo I	Ninguno	Negativa	β -bloqueadores
<i>SBr-14</i>	Masculino	0	25	Ninguno	Patrón Brugada tipo I	Ninguno	MS en familiares de 1º grado	Ninguno

La prueba genética en pacientes con SBr se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG y MLPA (Anexo 5).

Al realizar el análisis molecular, se encontró que 9 (64%) de nuestros casos poseían una variante clasificada como patogénica o probablemente patogénica, un 7% (1 casos) poseía una VUS, y en 4 casos (29%) no se pudo obtener un diagnóstico molecular (Figura 24).

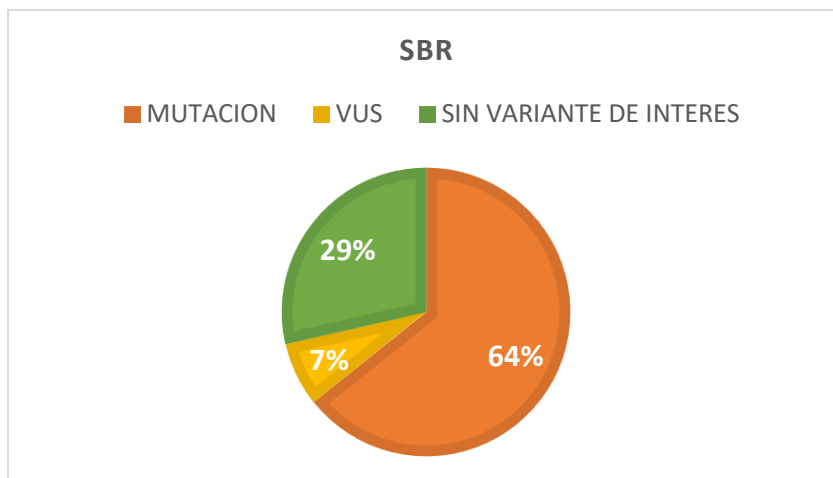


Figura 24. Distribución de variantes encontradas en casos de SBr según su clasificación de patogenicidad.

De las variantes de interés clínico identificadas en genes causales de SBr, la mayor parte se localizaron en el gen *SCN5A* (Figura 25).

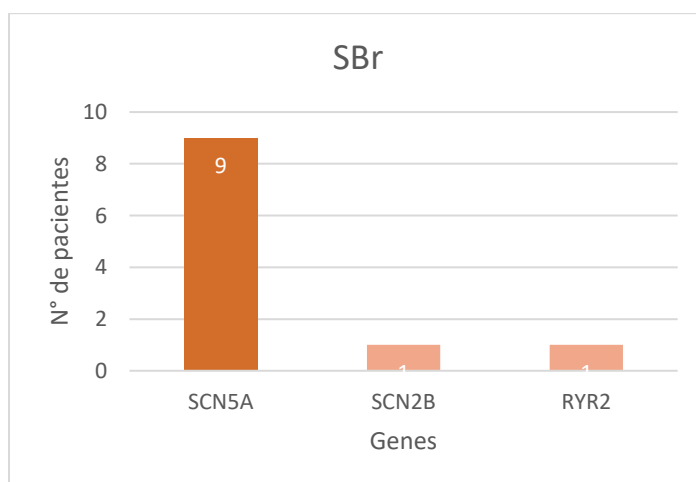


Figura 25. Distribución de genes con variantes de interés en pacientes con SBr, variantes patogénicas o probablemente patogénicas (color oscuro) y variantes de significado incierto (color claro).

Entre las variantes en genes causales de SBr, 2 (18%) estaba reportada como patogénica, 8 (73%) fueron clasificadas como tal en el presente estudio; tras evaluar los criterios de patogenicidad ya mencionados, y 1 fue clasificada como VUS (Tabla 20).

Heterocigotos compuestos

El caso SBr-2 es heterocigoto compuesto para dos variantes en el gen *SCN5A*, presentando una delección con cambio de aminoácido (NM_198056.2; c.4034 G>T, c.4035-4046del, p.W1345F, L1346-S1349del) heredada por rama paterna y una variante de sentido erróneo (NM_198056.2; c.5189C/T, p.P1730L; rs752599203) heredada por

rama materna. Presenta además una variante de sentido erróneo heterocigota en el gen *RYR2* clasificada como VUS (NM_001035; c.7654G/A; p.V2552M; rs746822781).

Pacientes	Variantes en genes causales de SBr								Variantes en genes causales de AHs / Miocardiopatías							
	Gen	Cambio cDNA	Cambio aminoácido	Identificador	Patogenicidad				Gen	Cambio cDNA	Cambio aminoácido	Identificador	Patogenicidad			
					ACMG	Criterios	CAMPUZANO	Puntuación					ACMG	Criterios	CAMPUZANO	Puntuación
SBr-1	SCN2B	11_118039346_G/C ENST00000278947	p.S64C	Sin id	Significado incierto	PM2, PP3, BS1	Significado incierto	8	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-2	SCN5A	3_38601835_G/T_CTCATCTT_CAGC/- ENST00000333535.9	p.W1345F ΔLIFS1346-1349	Sin id	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PP1, PP2, PP4	Probablemente Patogénico	9	RYR2	1_237813318_G/A ENST00000366574.2	p.V2552M	Sin id	Significado incierto	PM2, PP3	Significado incierto	8
	SCN5A	3_38592674_G/A ENST00000413689.1	p.P1730L	rs752599203	Probablemente Patogénico	PM2, PP2, PP3	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-3	SCN5A	3_38592740_C/A ENST00000413689	p.T1708N	Reportada (sin id)	Probablemente Patogénico	PP1,PP2,PM1, PM2, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-4	SCN5A	3_38592740_C/A ENST00000413689	p.T1708N	Reportada (sin id)	Probablemente Patogénico	PP1,PP2,PM1, PM2, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-5	SCN5A	3_38607917_C/T ENST00000413689.1	p.D1275N	rs137854618	Probablemente Patogénico	PM2, PM5, PP2, PP3, PP5	Patogénico	12	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-8	SCN5A	3_38592734_C-T ENST00000413689	p.S1710L	rs137854604	Patogénico	PM1, PM2,PP2, PP3, PP5, BS2	Probablemente Patogénico	11	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-9	SCN5A	3_38674667_C/T/C ENST00000413689	p.E44fs	Sin id	Probablemente Patogénico	PVS1, PM2	Significado incierto	8	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-12	SCN5A	3_38551391_C/T ENST00000413689.1	p.G1607R	rs199473292	Probablemente Patogénico	PM2, PP2, PP3	Probablemente Patogénico	9	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-13	SCN5A	3_38592969_G/A ENST00000413689.1	p.R1578C	rs878855292	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PP2, PP3	Probablemente Patogénico	10	-	-	-	-	-	-	-	-
SBr-14	SCN5A	3_38645550_G/- ENST00000413689.1	p.L515Sfs*5	Sin id	Patogénico	PVS1, PM2, PP3	Significado incierto	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 20. Variantes identificadas en casos con SBr.

Segregación de las variantes *SNC5A* p.W1345F L1346-S1349del, *SNC5A* p.P1730L y *RYR2* p.V2552R en la familia del caso SBr-2

El análisis de segregación en la familia del caso SBr-2 mostró que la variante *SNC5A* p.W1345F L1346-S1349del y la variante *RYR2* p.V2552R fueron heredadas por rama paterna, y la variante *SNC5A* p.P1730L por rama materna. Hasta ahora no existen antecedentes de arritmias, síncope o MS por rama materna. La madre (II-7) y el sobrino (IV-3) portadores la variante p.P1730L presentaron resultados diferentes al análisis del ECG en reposo, estando sin alteraciones en la madre, pero evidenciándose alteraciones inespecíficas de la repolarización en el sobrino. El padre (II-6) portador de las variantes *SNC5A* p.W1345FΔLIFS1346-1349 y *RYR2* p.V2552R es aparentemente asintomático, dos de las hermanas (III-6; III-7) portadoras tanto de la variantes *SNC5A* p.P1730L y *RYR2* p.V2552R son también aparentemente asintomáticas. Dos primos hermanos paternos (III-2; III-3) poseen solamente la variante *RYR2* p.V2552R, teniendo ECG normales, pero uno de ellos ha presentado cansancio y disnea a la actividad física. Finalmente un tercer primo paterno (III-4), hermano de los ya mencionados, posee solamente la variante *SNC5A* p.W1345FΔLIFS1346-1349, este presenta un claro patrón tipo I de Brugada, pero es asintomático hasta el momento (Figura 26).

Casos sin variantes en genes causales de SBr

En los casos SBr-6, SBr-7, SBr-10 y SBr-11 no se identificaron variantes en genes de SBr.

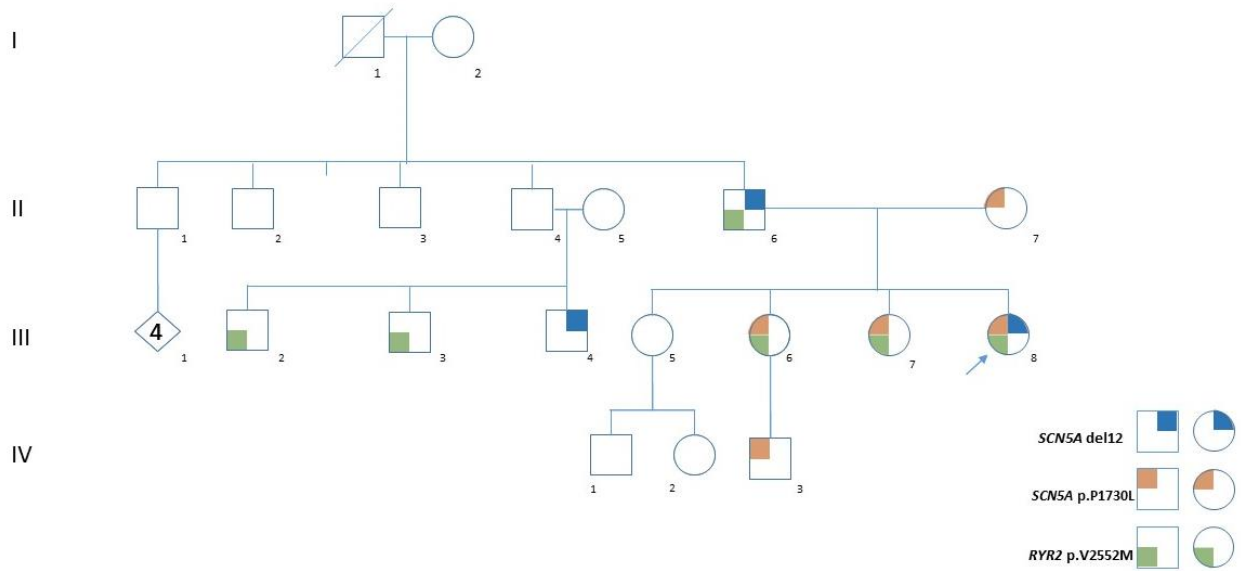


Figura 26. Árbol familiar del caso SBR-2.

6. Análisis Genético en casos con DNS

Se estudiaron 13 casos con DNS diagnosticados a una edad temprana. El 84.6 % de los casos fueron de sexo masculino (Tabla 21).

Tabla 21. Características clínicas de los casos índice con DNS.

Paciente	Sexo	Edad de inicio de síntomas	Edad de diagnóstico	Síntomas	Hallazgos en el ECG y episodios documentados	Antecedentes heredofamiliares de MS o de arritmia cardiaca	Tratamiento
DNS-1	Masculino	10	10	Disnea al esfuerzo	Bloqueo AV	Ninguno	<i>β</i> -bloqueadores Marcapasos
DNS-2	Masculino	4	10	Ninguno	QTc prolongado, Taquicardia nodal, TVMNS, Bloqueo AV, Parálisis auricular.	Ninguno	Marcapasos
DNS-3	Masculino	24	35	Síncope y palpitaciones en el esfuerzo, Fatiga y disnea	Flutter auricular. Bloqueo AV. Trastornos de la conducción intraventricular	Ninguno	Marcapasos
DNS-4	Masculino	34	34	Palpitaciones y opresión en el cuello	Pausas sinusales, Fibrilación auricular	Ninguno	<i>β</i> -bloqueadores Marcapasos
DNS-5	Masculino	4	4	Síncope en esfuerzo	Pausas sinusales. TV y trastornos intraventriculares	Familiar de 1º grado	Marcapasos
DNS-6	Masculino	14	15	Palpitaciones en el esfuerzo, fatiga y disnea.	Flutter auricular	Ninguno	Marcapasos
DNS-7	Masculino	4	5	Palpitaciones y síncope en reposo	Trastornos interventriculares, TV helicoidal, FA.	Ninguno	Marcapasos

DNS-8	Femenino	2	2	Síncope	Bloqueo AV	Ninguno	Marcapasos
DNS-9	Femenino	4	4	Síncope en esfuerzo, disnea.	Trastornos interventriculares	MS en familiares de 1º grado	<i>β</i> -bloqueadores Marcapasos
DNS-10	Masculino	2	2	Palpitaciones	Taquicardia y fibrilación auricular	MSR infantil en familiar 2º grado con DNS	Marcapasos
DNS-11	Masculino	10	10	Palpitaciones en esfuerzo	Flutter auricular Taquicardia auricular.	QTc prolongado y bloqueo AV en familiares de 1º y 2º grado	Marcapasos
DNS-12	Masculino	17	17	Ninguno	Bloqueo AV, parálisis auricular	Ninguno	<i>β</i> -bloqueadores Marcapasos
DNS-13	Masculino	15	15	Palpitaciones, síncope, dolor precordial.	Flutter auricular, TV monomórfica	Ninguno	<i>β</i> -bloqueadores Marcapasos

La prueba genética en pacientes con DNS se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG y MLPA (Anexo 5).

Al realizar el análisis molecular, se encontró que 9 (69%) de nuestros casos poseían una variante clasificada como patogénica o probablemente patogénica, un 8% (1 casos) poseía una VUS, y en 3 casos (23%) no se logró un diagnóstico molecular (Figura 27).

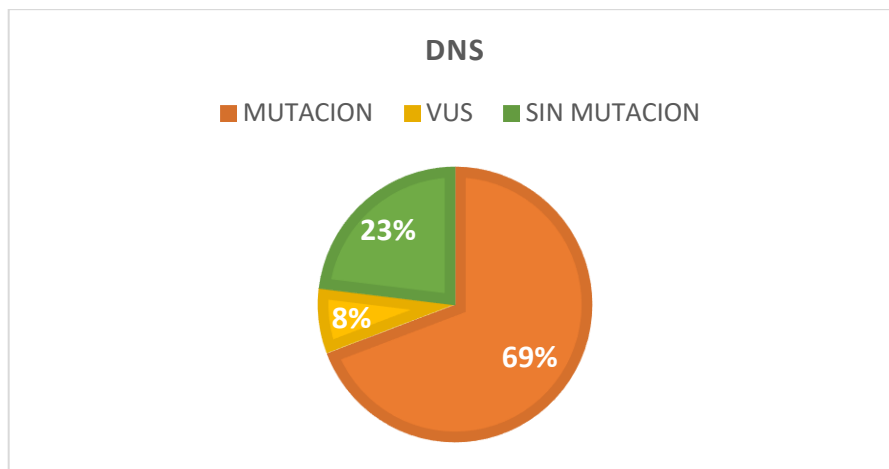


Figura 27. Diagnóstico molecular de los pacientes con DNS.

Entre las variantes identificadas en genes causales de DNS, la mayor parte (83%) se localizaron en el gen *SCN5A* (Figura 28).

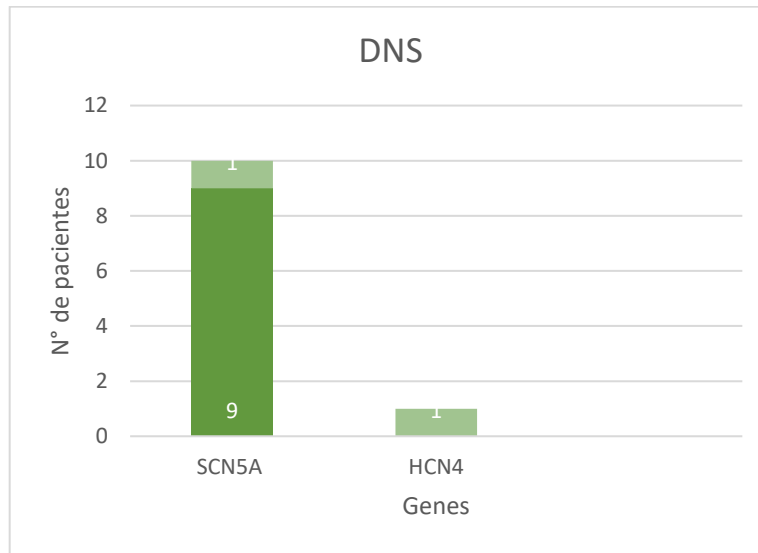


Figura 28. Distribución de genes afectados en pacientes con DNS, variantes patogénicas o probablemente patogénicas (color oscuro) y variantes de significado incierto (color claro).

Entre las variantes en genes causales de DNS, 3 (30%) estaban reportadas como patogénicas, 6 (60%) fueron clasificadas como tal en el presente estudio al ser analizadas con los criterios de la ACMG, y 1 fue clasificada como VUS (Tabla 22).

Tabla 22. Variantes identificadas en casos con DNS

Paciente	Variantes en genes causales de DNS							
	Gen	Cambio cDNA	Cambio aminoácido	Identificador	Patogenicidad			Puntuación
					ACMG	Criterios	CAMPUZANO	
DNS-1	-	-	-	-	-	-	-	-
DNS-2	SCN5A	3_38628896_C-T ENST00000413689	p.R811C	rs794728864	Probablemente Patogénico	PM2, PP3, PP2	Probablemente Patogénico	9
DNS-3	SCN5A	3_38662410_C-T ENST00000413689	p.R179*	rs1480085793	Patogénico	PVS1, PM2, PP3	Patogénico	12
DNS-4	HCN4	15_73622068_T-G ENST00000261917	p.I479T	Sin id	Significado incierto	PM2, PP3, BP1	Significado incierto	8
DNS-5	SCN5A	3_38592641_C/- ENST00000413689	p.D1741Gfs*48	rs1251085820	Patogénico	PVS1, PM1, PM2	Significado incierto	7
DNS-6	SCN5A	3_38592734_C-T ENST00000413689	p.S1710L	rs137854604	Patogénico	PM1, PM2, PP2, PP3, PP5, BS2	Probablemente Patogénico	11
DNS-7	SCN5A	3_38592530_C-A ENST00000413689	p.A1724D	Sin id	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PP2, PP3	Significado incierto	8
DNS-8	-	-	-	-	-	-	-	-
DNS-9	-	-	-	-	-	-	-	-
DNS-10	SCN5A	3_38592734_C-T ENST00000413689	p.S1710L	rs137854604	Patogénico	PM1, PM2, PP2, PP3, PP5, BS2	Patogénico	12
DNS-11	SCN5A	3_38592740_C/A ENST00000413689	p.T1708N	Reportada (sin id)	Probablemente Patogénico	PP1, PP2, PM1, PM2, PP3, PP5	Significado incierto	8
DNS-12	SCN5A	3_38607917_C/T ENST00000413689.1	p.D1275N	rs137854618	Patogénico	PM2, PM5, PP2, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	9
DNS-13	SCN5A	3_38627291_C/T ENST00000413689.1	p.R893H	rs199473172	Probablemente Patogénico	PM1, PM2, PP2, PP3	Significado incierto	8

7. Análisis Genético en casos con TVPC.

Se captaron 5 casos con diagnóstico clínico de taquicardia ventricular (TV). Tres casos con TVPC fueron mujeres (60%). Todos presentaron un QTc normal. Los 2 casos estaban tratados con β -bloqueadores y solo 1 caso con TVPC era portador de un DAI (Tabla 23).

Tabla 23. Características clínicas de los casos índice con TVPC

Paciente	Sintomatología	Episodios electrofisiológicos documentados	Historia familiar de CA o MS	Tratamiento
TVPC-1	Ninguno	Taquicardia Ventricular polimorfa	Familiar de 1° con Ca y MS	Ninguno
TVPC-2	Ninguno	Prueba de esfuerzo con bigeminismo	Ninguno	Ninguno
TVPC-3	MSR y síncope en esfuerzo físico-estrés	Prueba de esfuerzo y EEF positivos para TV	Ninguno	β -bloqueadores DAI
TVPC-4	MSR y síncope en reposo	Fibrilación ventricular	Ninguno	β -bloqueadores DAI
TVPC-5	Síncope en esfuerzo físico-estrés	Ninguno	Ninguno	β -bloqueadores DAI

La prueba genética en pacientes con DNS se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG y MLPA (Anexo 5).

Entre las variantes en genes causales de TVPC, 1 (25%) estaba reportada como patogénica y 3 fueron clasificadas como VUS (Tabla 24).

Tabla 24. Variantes identificadas en casos con TVPC

Paciente	Variantes en genes causales de TVCP							
	Gen	Cambio cDNA	Cambio aminoácido	Identificador	Patogenicidad			
					ACMG	Criterios	CAMPUZANO	Puntuación
TVPC-1	RYR2	1_237802323_G/A ENST00000366574.2	p.V2313M	Sin id	Significado incierto	PM5, PM2, PP3	Significado incierto	8
TVPC-2	-		-	-	-	-	-	-
TVPC-3	RYR2	1_237608752_T/C ENST00000366574	p.S408P	Sin id	Significado incierto	PM2, PP3	Significado incierto	8
TVPC-4	RYR2	1_237941984_C/A ENST00000366574.2	p.Q3932K	Sin id	Significado incierto	PM2, PP3	Significado incierto	8
TVPC-5	RYR2	1_237942026_G/A ENST00000366574	p.G3946S	rs794728777	Probablemente Patogénico	PS1, PM2, PM5, PP3, PP5	Probablemente Patogénico	11

8. Análisis Genético de otras arritmias hereditarias.

Entre los pacientes con otros diagnósticos de arritmias hereditarias tenemos a 2 pacientes con Fibrilación Auricular idiopática, 2 pacientes con Taquicardia Ventricular monomórfica, una paciente diagnosticada inicialmente como una DNS, pero que al realizar el estudio molecular y

verificar los electrocardiogramas, se cambió su diagnóstico a Síndrome de QT corto, y una paciente con diagnóstico inicial de SQTL (Tabla 25).

Tabla 25. Características clínicas de los casos índice con otras AHs

Paciente	Diagnostico	Sintomatología	Episodios electrofisiológicos documentados	Historia familiar de CA o MS	Tratamiento
PRKAG2-1	SPRKAG2	Palpitaciones, disnea y síncope al esfuerzo físico	FA, flutter auricular, TVM	Familiares de 1° grado con CA y MS	β-bloqueadores Marcapasos
TVM-1	TVM	Palpitaciones	Bloqueo AV, flutter auricular, TVM	Negativo	β-bloqueadores DAI
TVM-2	TVM	Síncope al esfuerzo físico	Flutter auricular y TVM	Familiar de 1° grado con CA	β-bloqueadores DAI
SQTC-1	SQTC	Bradicardia	Bloqueo AV, flutter auricular, TVM, Intervalo QTc 277ms	Negativo	β-bloqueadores Marcapasos
FA-1	FA	Palpitaciones	FA	Negativo	Ninguno
FA-2	FA	Palpitaciones, fatiga y disnea.	FA, flutter auricular	Negativo	Ninguno

La prueba genética en estos pacientes se llevó a cabo con diferentes paneles o estrategias de SNG y MLPA (Anexo 5).

Entre los pacientes con FA, se encontró una VUS en uno de los pacientes masculinos, en el gen *ABCC9* (p.A226T) (Tabla 26). En una de las pacientes con TVM, se encontró la única variante donadora de sitio de splicing en el gen *SCN5A* (c.998+1G>A). Se reportó también que la paciente con diagnóstico de SQTC presenta una variante ya publicada en el gen *KCNQ1* (p.V141M) (Figura 29). Finalmente, nos encontramos con una paciente femenina originalmente diagnosticada con SQTL, al someterla al estudio genético se encontró una variante ya reportada como probablemente patogénica en el gen *PRKAG2* (p.H401D), gen al cual se le atribuyen varios síndromes arritmogénicos. Al estudiar su clínica e historia familiar se llegó a la sospecha de que esta posee un síndrome llamado trastorno progresivo familiar de conducción cardíaca (TPCC) (Figura 30).

Tabla 26. Variantes identificadas en casos con otras AHs

Paciente	Variantes en genes causales de AHs / MCPs							
	Gen	Cambio cDNA	Cambio aminoácidos	Identificador	Patogenicidad			
					ACMG	Criterios	CAMPUZANO	Puntuación
PRKAG2-1	PRKAG2	7_151265834_G/C ENST0000028787 8.4	p.H401D	rs878855017	Probablemente Patogénico	PP1, PP3, PM2	Probablemente Patogénico	10
TVM-1	SCN5A	3_38649641_C/T ENST0000041368 9.1	c.998+1G>A	rs1167495153	Patogénico	PVS1, PM2, PP3	Probablemente Patogénico	9
TVM-2	ABCC9	12_22068742_C/T ENST0000026120 0.4	p.A226T	Sin id	Significado incierto	PM2, PP3	Significado incierto	8
SQTC-1	KCNQ1	11_2549192_G/A ENST0000015584 0.5	p.V141M	rs199472687	Patogénico	PS3, PM1, PM2, PP2, PP3, PP5	Patogénico	12
FA-1	-	-	-	-	-	-	-	-
FA-2	-	-	-	-	-	-	-	-

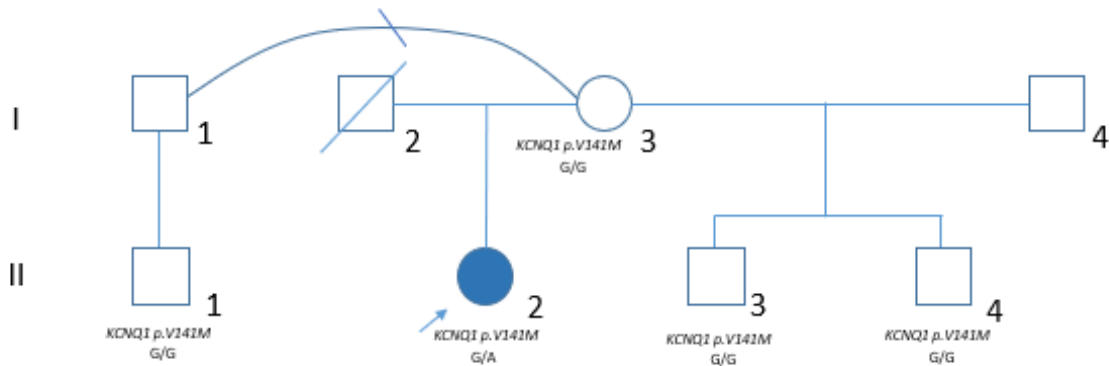


Figura 29. Árbol familiar del caso SQTC-1. Se muestra con una figura oscura al individuo con un QTc corto

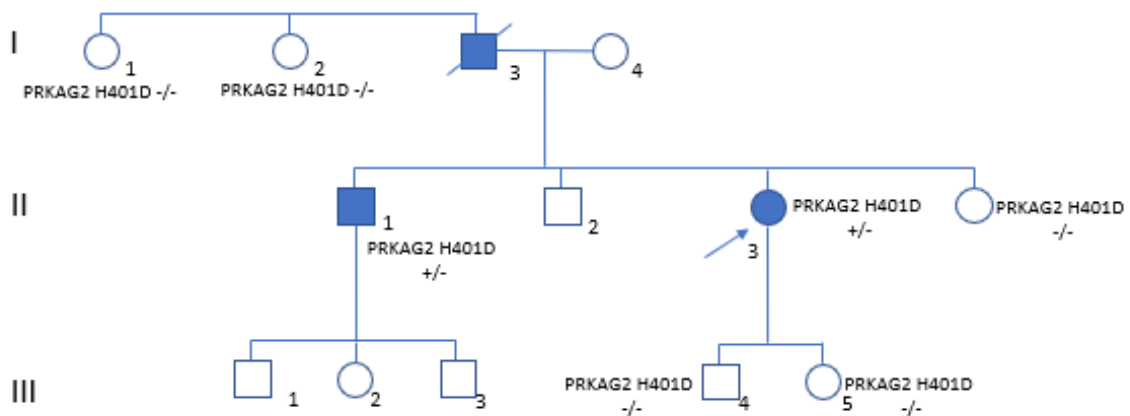


Figura 30. Árbol familiar del caso PRKAG2-1. Se muestran en figuras oscuras los individuos con Bloqueo AV.

9. Gen SCN5A

De los casos índices portadores de variantes en el gen *SCN5A*, se vio que la mayoría eran hombres (81% vs 36%). Las variantes en este gen fueron más comunes en pacientes con diagnóstico de SBr (43% vs 3%) al igual que DNS (43% vs 3%).

Al ubicar topográficamente las variantes del gen *SCN5A* a lo largo de la proteína, podemos observar que el 2% se encuentra en la región N-terminal, el 10% se encuentra en el Dominio I, 2% en el conector inter-dominio I-II, 10% en el Dominio II, 15% en el Dominio III, 61% se el Dominio IV, de los cuales el 64% está concentrado entre las S5, S6, y el conector S5-S6 (Figura 31).

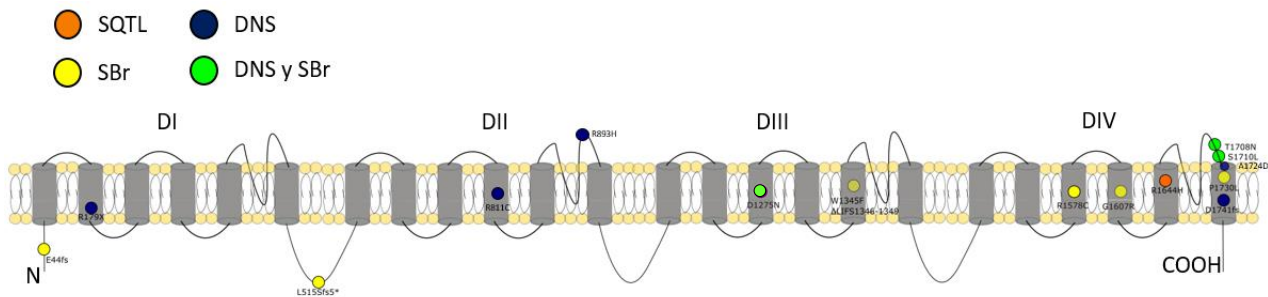


Figura 31. Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen *SCN5A*

Con respecto a las alteraciones del ECG en estos pacientes, los intervalos P-R se vieron alargados ($213 \text{ ms} \pm 39$ en su medición mayor) con respecto al resto de los casos ($158 \text{ ms} \pm 27$ en su medición mayor; $P < 0.001$). Fue más frecuente encontrar alteraciones de la morfología de la onda T al compararse con el resto de los casos (78.9% vs 27.6% $P < 0.001$), entre las que se encuentran ondas T negativas, bifásicas o picudas. El segmento QRS también estuvo alterado en este grupo, con un 26% de pacientes presentando ensanchamiento o segmentación de este, comparado con un 4% en los casos cuyo gen afectado no era el *SCN5A* ($P = 0.02$). Adicional a esto, la elevación del segmento ST se observó en un 36%, en contraste con un 4% en el resto de los pacientes ($P = 0.002$).

En este grupo de pacientes, el flutter auricular estuvo presente en un 30%, mientras solo el 9% de los pacientes sin variante en *SCN5A* presentaron estos eventos ($P = 0.03$). La muerte súbita recuperada fue menos frecuente en estos casos (en solo el 5% de los casos), a diferencia del resto de los pacientes, en los que se presentó en un 37% ($P = 0.008$).

10. Gen *KCNH2*

Todos los pacientes que tuvieron alguna variante en el gen *KCNH2* estaban diagnosticados con SQTL. La distribución topográfica de las variantes en la proteína es más homogénea en comparación con las otras, encontrándose en la región N-Terminal, asas conectoras, y en la región COOH-Terminal. El 14% de las variantes se vieron ubicadas en la región N-terminal del poro, el 24% se encuentra en el conector S1-S2, un 14% se encuentra en la S4 y otro en el conector S4-S5, finalmente un 9% se observó en la región COOH terminal (Figura 32).

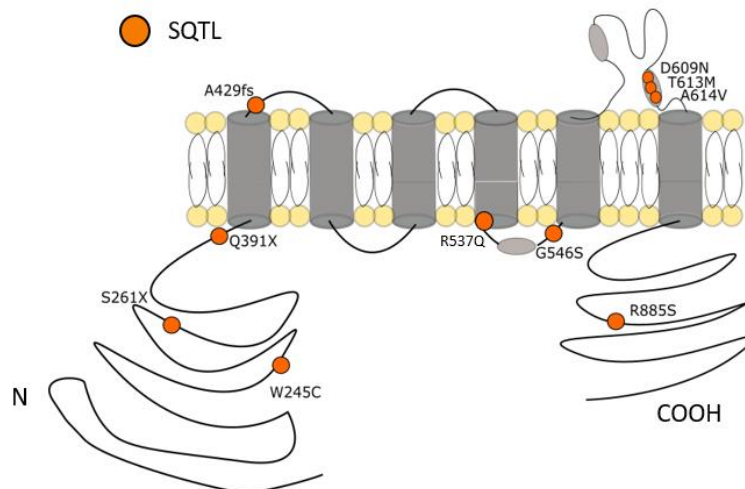


Figura 32. Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen *KCNH2*

En los pacientes de SQTL con variantes en el gen *KCNH2* se encontró que era menos común la aparición de MSR al comparar con pacientes con afección de otros genes (13% vs 53% $P=0.019$).

11. Gen *KCNQ1*

Al ubicar las variantes en las regiones topográficas de la proteína, un 6% se encuentra en la S1, un 22% en la S2, un 17% entre las S5, S6 y el conector S5-S6, y la gran mayoría se encuentre situada en la en la región COOH-Terminal (55%) (Figura 33).

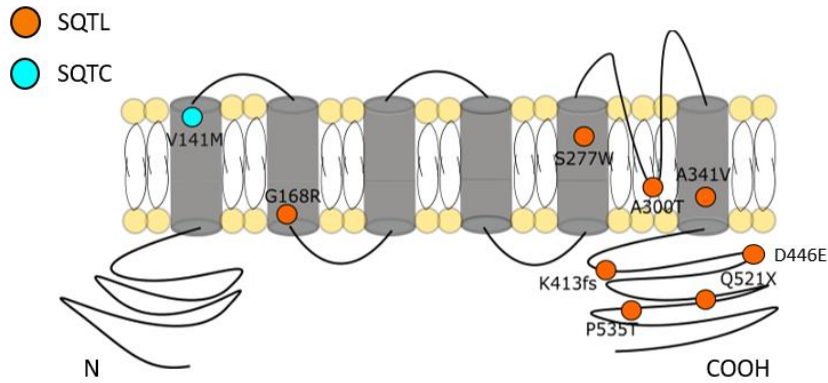


Figura 33. Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen *KCNQ1*

El aspecto clínico más evidente en los pacientes con variantes en *KCNQ1*, fue una edad más temprana de aparición de los síntomas (6 ± 6 años vs 18 ± 14 años; $P = 0.003$) y de diagnóstico (7 ± 6 años vs. 22 ± 14 años; $P = 0.001$).

En estos pacientes también se vio un aumento de la frecuencia de fibrilación ventricular en comparación con el resto (30% vs. 7%; $P = 0.03$).

12. Gen *RYR2*

Topográficamente, la totalidad de las variantes en este gen se encontraron en la región N-terminal de la proteína (Figura 34).

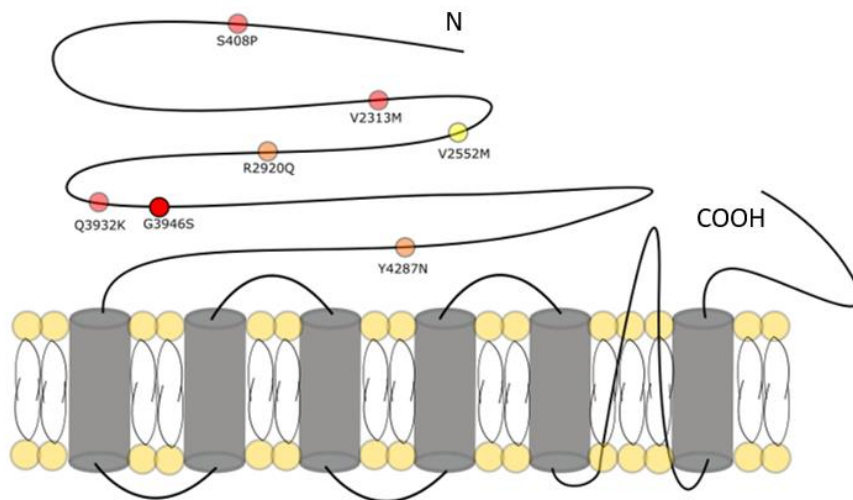


Figura 34. Distribución topográfica de las variantes encontradas en el gen *RYR2*

Los pacientes con variante en el gen *RYR2* fueron los que más presentaron muerte súbita recuperada (67% vs. 20%; $P = 0.01$). Curiosamente, el caso SCTL-19 fue el único paciente con bloqueo Auriculo-Ventricular intrahisiano, quien tiene la variante *RYR2* p.Y4287N.

IX. Discusión

El presente estudio se basa en el primer proyecto de análisis genético de pacientes mexicanos con AHs. Un gran número de estudios publicados utilizan la secuenciación de exoma completo como método de abordaje de estos pacientes (Chugh & Huertas-Vazquez, 2014; Loporcaro, Tester, Maleszewski, Kruisselbrink, & Ackerman, 2014). Sin embargo, se ha reportado que la secuenciación sitio dirigida en los cardiogénes responsables de las AHs proporciona una cobertura alta y uniforme (región objetivo del 99,9% a > 20x), con una secuenciación de alta calidad, de hasta un 100% de sensibilidad y precisión para SNV e InDels que se encuentran en zonas codificantes, con un mejor rendimiento, tiempo de respuesta más corto, menores requisitos informáticos y menores costos (Pua et al., 2016); además evita el ruido genético que se obtiene con la secuenciación de exoma (Landstrom et al., 2018). Nuestra experiencia con la secuenciación sitio-dirigida desde la plataforma Trusight Cardio (Illumina) fue similar, obteniendo resultados de alta calidad y muy alta especificidad, ya que el 100% de las mutaciones encontradas por SNG fueron confirmadas en los pacientes por secuenciación Sanger.

1. Rendimiento Diagnóstico

Nuestro rendimiento diagnóstico global para canalopatías fue de un 65%. Para el SQTL, se encontró una variante relacionada a este síndrome, clasificada como patogénica o probablemente patogénica según los criterios del ACMG o de Campuzano *et al.* (2015) en el 76% de los casos. Este rendimiento diagnóstico fue similar al reportado en estudios de poblaciones de origen caucásico-europeo (Tester et al., 2010; Winbo et al., 2020), australiano (Burns et al., 2016) y tailandés (Saprungruang et al., 2018), donde el gen más frecuentemente afectado fue *KCNQ1* (SQTL tipo 1; 30-35%), seguido de *KCNH2* (SQTL tipo 2; 25-30%) y *SCN5A* (SQTL tipo 3; 5-10%) (M. J. Ackerman et al., 2011; Kapplinger et al., 2009). En nuestro grupo, estos mismos genes fueron los más afectados. Sin embargo, llama la atención que el gen con mayor número de variantes patogénicas o probablemente patogénicas fue *KCNH2* (42%), seguido por *KCNQ1* (34%) y *SCN5A* (8%). Llama la atención la alta frecuencia de mutaciones en el gen *CACNA1C* (8%) con respecto a lo reportado en la literatura, esto se puede atribuir al bajo número de casos, y podría ser modificado al aumentar el tamaño de la muestra. Las mutaciones del canal de Ca²⁺ de tipo L se han relacionado con enfermedades cardíacas como el síndrome de Timothy. Este síndrome se caracteriza por la presencia de un intervalo QT prolongado, anomalías cognitivas,

sindactilia y muerte súbita cardíaca. Nuestros casos con variantes patogénicas o probablemente patogénicas en *CACNA1C* (SQTL-5 y SQTL-11) solo presentaron fenotipo cardíaco, lo cual se ha reportado anteriormente en algunos pacientes con mutaciones en este gen (Wemhöner et al., 2015)

El 64% de los pacientes con SBr portaban una variante patogénica o probablemente patogénica; lo cual es mayor a lo reportado en la literatura (~20-30%). Así, el rendimiento diagnóstico en nuestro estudio fue mayor a lo esperado (Antzelevitch et al., 2005). Esto se puede atribuir a una mejor selección clínica de los pacientes, ya que todos los que reportaron una variante patogénica presentaron un claro patrón Brugada tipo 1. A pesar de que el SBr es considerado una AH genéticamente heterogénea, la gran mayoría de las variantes reportadas (~95%) suelen encontrarse en *SCN5A* (Brugada et al., 2018; Selga et al., 2015); de manera similar, el 100% de las variantes patogénicas identificadas en pacientes con SBr de este estudio se localizaron en este gen; mientras que la única VUS se localizó en *SCN2B*, un gen causal de SBr poco frecuente (Gourraud et al., 2016). En nuestro grupo con diagnóstico de SBr la relación entre hombres y mujeres fue de 6:1; se ha demostrado constantemente que el sexo masculino está asociado con un mayor riesgo de eventos arrítmicos (Gourraud et al., 2016), pero no se ha definido a través de qué mecanismo ocurre esto, ya que se ha visto evidencia contradictoria sobre el papel de las hormonas sexuales (Sharif-Kazemi et al., 2011; Shimizu et al., 2007; G. Yang et al., 2019). Estas características indican una baja penetrancia, la cual dificulta el mapeo de genes y los estudios de cosegregación familiar. Por otro lado, se han encontrado genes que regulan la expresión de *SCN5A* como el *TBX5* y *TBX20* (Arnolds et al., 2012), que apenas empieza a explorarse su posible participación en síndromes como el Brugada y el SQTL, dando la posibilidad de encontrar nuevos genes de susceptibilidad fuera de los ya descritos.

Hasta el momento, hay pocos estudios realizados en poblaciones con DNS de inicio temprano o congénito, y los que existen se enfocan en la búsqueda de variantes en el gen *SCN5A* (De Ponti et al., 2018; Ishikawa, Tsuji, & Makita, 2016). Según estos estudios, las variantes de *SCN5A* representan el 30-40% de los casos familiares o de aparición temprana de DNS. Por otro lado, las variantes de *HCN4*, representan solo el 4% de casos reportados. De nuestros casos con DNS 8 de los 13 pacientes fueron portadores (62%) de una variante patogénica o probablemente patogénica en el gen *SCN5A*, lo cual es el doble de lo reportado anteriormente. A diferencia de otras series reportadas, la alta frecuencia de mutaciones de *SCN5A* pudo ser debido a diferencias en los criterios de inclusión/exclusión entre los estudios (el estudio excluyó casos con

alteraciones estructurales), o la gravedad de nuestros casos (pacientes de inicio temprano con implantación de marcapasos/DAI). Sin embargo, esta frecuencia puede cambiar al aumentar el número de casos investigados. Solo 1 paciente presentó una variante en *HCN4*, quien además presenta la mayor edad al diagnóstico comparado al resto del grupo (34 años). Esto es similar a lo reportado en otros estudios donde los portadores de variantes en *HCN4* requieren implante de marcapasos a una edad más avanzada en comparación con los portadores de variantes en *SCN5A* (Ishikawa et al., 2017)

El rendimiento diagnóstico que obtuvimos en pacientes con TVPC fue similar a lo reportado en otros estudios, donde encuentran mutaciones putativamente patogénicas en >50% de los casos con TVPC (Mazzanti et al., 2014; Sumitomo, 2016).

A pesar de que la SNG sitio-dirigida identificó variantes patogénicas o probablemente patogénicas en una proporción alta de casos, los casos en los que no se detectó una variante de interés clínico fueron analizados por una estrategia alternativa, la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA), que puede identificar inserciones o deleciones mayores a 150-200 pb que no son detectables mediante SNG.

De los 24 casos en quienes se realizó este análisis, se logró el diagnóstico molecular en solamente un caso con SQTL quien presentó duplicación del exón 2 en el gen *KCNH2*, ya reportada en una paciente sueca con SQTL (Stattin et al., 2012). Este rendimiento diagnóstico para MLPA fue similar a lo reportado en estudios anteriores de pacientes con este síndrome (Barc et al., 2011; Sonoda et al., 2018; Williams et al., 2015). Una limitación importante que tiene este estudio es que solamente está disponible para 5 de los más de 23 genes relacionados con AHs (*KCNH2*, *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNE2* y *SCN5A*), reduciendo su potencial para incrementar el rendimiento diagnóstico.

También se observó que el análisis molecular en estos pacientes con AHs identificó la presencia de más de una variante potencialmente asociada a MSC, lo que podría explicar la expresividad variable y penetrancia incompleta en familias afectadas, apoyando la hipótesis de que algunos casos de AHs podrían tener un origen oligogénico, que no serían resueltos mediante la búsqueda de variantes de alta penetrancia.

Finalmente, en 15 casos no se encontró ninguna variante de interés clínico o InDel en los genes estudiados. Para lograr un diagnóstico molecular en estos casos, tenemos las siguientes opciones:

1. Volver a alinear y anotar los datos genómicos de estos casos: durante nuestro estudio una estrategia que resultó útil para los casos sin variantes de interés clínico fue el volver a anotar los datos de secuenciación, esto nos ayudó a identificar una variante probablemente patogénica en 1 caso (SQTL-7). En otros grupos se ha demostrado que esta técnica aumenta el rendimiento diagnóstico en hasta un 10%. La identificación de variantes no observadas previamente mediante el realineamiento puede atribuirse al perfeccionamiento y actualización constante de los algoritmos usados para el alineamiento y la identificación de variantes. (Ewans et al., 2018; Sun et al., 2019; Wenger, Guturu, Bernstein, & Bejerano, 2017).
2. Realizar secuenciación de exoma: en nuestro grupo de pacientes se realizó exoma completo a 3 familias donde no se identificaron genes de susceptibilidad nuevos. Secuenciar un mayor número de genes no necesariamente aumenta las probabilidades de identificar genes causales nuevos, y es necesario que exista una estructura familiar adecuada, con varios individuos afectados y no afectados, en donde pueda observarse cosegregación de una mutación sospechosa. Desde 2006, la secuenciación del exoma solo ha permitido identificar 3 genes nuevos causales de AHs (*CALM1*, *CALM2* y *CALM3*) (Crotti et al. 2013; Reed et al. 2015).
3. Buscar casos de etiología oligogénica: el diagnóstico molecular generalmente se limita a la búsqueda de mutaciones de alta penetrancia, sin embargo, cada vez son más frecuentes los reportes que sugieren una mayor complejidad genética en las AHs, como lo son la documentación de casos digénicos u oligogénicos (Nieto-Marín et al., 2019; Tan, Duff, Kuriachan, & Gerull, 2014). Posibles ejemplos de estos casos son los pacientes SBr-2 y SQTL-14 en este estudio. Sin embargo, demostrar que una enfermedad es causada por la suma de los efectos de diferentes variantes en distintos genes es muy complejo, y puede requerir el estudio funcional de numerosas variantes y combinaciones simultáneas de variantes en modelos *in vitro* complejos (i.e. cardiomiocitos derivados de células madre de pacientes con AHs) lo cual dificulta su estudio. Además, variantes

comunes en genes causales de AHs podrían contribuir al fenotipo, agravando o modulando la expresividad de la enfermedad. Estas variantes pueden ser identificadas mediante enfoques alternativos, como los estudios de asociación caso-control a una AH, los estudios de asociación a rasgos electrocardiográficos en la población abierta, o los análisis de variación genética en fenotipos extremos.

4. Análisis fuera del exoma: Se calcula que el 85% de las mutaciones que causan enfermedades mendelianas se encuentran en secuencias codificantes. Por esto, es importante buscar variantes que puedan explicar la variabilidad fenotípica de las AH que esté en zonas no codificantes. Desafortunadamente, a pesar de que ha habido avances importantes en el conocimiento de estas secuencias mediante proyectos internacionales como ENCODE (“An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome,” 2012), por falta de conocimiento de la biología de las zonas no codificantes (intrones, promotores, pseudogenes, transposones, ADN satélite, etc.), las herramientas para interpretar las consecuencias funcionales de variantes en estas zonas que pudieran causar enfermedades mendelianas son difíciles de trabajar. Es importante incluir estas zonas durante el análisis de secuenciación, lo cual ayuda en la detección de variantes de interés clínico, como ocurrió en el caso TVM-1, en el que se encontró la variante patogénica SCN5A c.998+1G>A ([rs1167495153](#)), ubicada en el promotor de este gen.

2. Criterios de patogenicidad

Para clasificar las variantes de acuerdo con su patogenicidad se utilizaron dos criterios diferentes. Primeramente, se utilizaron los criterios de la ACMG, los cuales fueron acordados en el 2015 (Figura 15). Estos criterios están diseñados para la estandarización de la interpretación y el informe de las variantes genéticas identificadas en el laboratorio clínico, y se encuentran constantemente en revisión, ya que se identificaron varias áreas en las que las directrices carecen de especificidad o están sujetas a interpretaciones ambiguas o contradictorias. Una de estas áreas es el desacuerdo sobre el valor de los datos funcionales (Tabla 27), que es una fuente importante de discrepancias de clasificación. El valor de los datos funcionales depende de la relevancia de la propiedad medida para la fisiopatología de la enfermedad, la calidad del experimento, la reproducibilidad del resultado y la magnitud del cambio en la función. Así, una evaluación consistente de estas consideraciones es un desafío. Para abordar esto, se han actualizado de los marcos de clasificación de variantes, como el Sherlock (Nykamp et al., 2017),

que contiene reglas que capturan diversos grados de confianza, lo que ayuda a distinguir los experimentos sobre el splicing y las alteraciones en proteínas, además que ayudan a valorar y descartar estudios mal realizados o no concluyentes.

Tabla 27. Ventajas, desventajas y limitaciones de las técnicas *in vitro* para los estudios funcionales de los canales iónicos. HEK Human embrionic kidney (Riñón embrionario humano); CHO Chinese hamster ovary (ovario de Hamster chino); hiPSC-CMs Human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas).

Técnica <i>in vitro</i>	Ventajas	Desventajas y limitaciones
Ovocitos de Xenopus	<ul style="list-style-type: none"> - No expresan una gran cantidad de canales iónicos y receptores. - Algunos canales solo pueden expresarse en ovocitos y no en células de mamíferos. - Clamp de voltaje de dos electrodos se pueden realizar de forma rápida y semiautomática. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los ovocitos expresan algunos canales y receptores endógenos. - No ha sido posible expresar todos los canales en los ovocitos. - Se mantienen mejor a temperatura ambiente, lo que puede alterar la síntesis y procesamiento de los canales de mamíferos en comparación con las condiciones fisiológicas. - No son las células nativas en las que normalmente se expresan los canales.
Células HEK-293	<ul style="list-style-type: none"> - Proporcionan factores endógenos y vías de señalización para promover el plegamiento, la expresión y la función de los péptidos del canal iónico en la superficie celular. - Adaptable a técnicas automatizadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Poseen una corriente de K⁺ de salida de voltaje con inactivación en estado cerrado, corriente de salida de Na⁺ y de Ca²⁺.
Células CHO	<ul style="list-style-type: none"> - Muy baja actividad de canales de K⁺ endógenos 	<ul style="list-style-type: none"> - Tienen una considerable conductancia catiónica activada por Ca²⁺ que puede complicar los experimentos que involucran la elevación de Ca²⁺ intracelular.
hiPSC-CMs	<ul style="list-style-type: none"> - Tiene componentes importantes de complejos macromoleculares de canales iónicos cardíacos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Propiedades anormales que incluyen latidos espontáneos y potenciales de acción heteromorfológicos con potencial diastólico reducido.

Otra revisión de los criterios del ACMG publicados en 2013 (Green et al., 2013), específica para arritmias hereditarias, dio como resultado los criterios de patogenicidad de variantes genéticas asociadas con canalopatías cardíacas, propuestos por Campuzano et al. 2015 (Tabla 12), donde intentan corregir deficiencias en los criterios existentes hasta ese momento. Entre las correcciones más relevantes está la puntuación de los estudios *in vitro*, debido a que son una de las principales confirmaciones experimentales de patogenicidad en canalopatías cardíacas. Además, éstos le dan una mayor importancia a la cosegregación familiar, la cual solo es un criterio de apoyo para el ACMG. Otra diferencia importante es que de los criterios de Campuzano

no distinguen entre mutaciones de cambio de sentido y las que causan pérdida de función, lo cual es un criterio fuerte de patogenicidad de acuerdo con los criterios de la ACMG. En el presente estudio 60 variantes coincidieron en su clasificación de patogenicidad por ambos criterios, mientras que 8 variantes fueron clasificadas de manera diferente, esto refleja que aún es necesario mejorar y perfeccionar la evaluación de patogenicidad. Esto se ha visto en el ACMG, ya que han refinado y actualizado sus criterios, mientras que los propuestos por Campuzano no. Estos criterios son auxiliares, pero definitivamente no son determinantes para el diagnóstico, y sobre todo para la toma de decisiones en el manejo y tratamiento de estos pacientes y sus familiares.

De las 34 variantes no reportadas previamente (ACMG/Varsome), dos pudieron ser clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas según los criterios de Campuzano (*CACNA1C* p.R858H, *KCNH2* p.R885S), porque la variante mostró cosegregación con la enfermedad en la familia o por cumplir el criterio “estudio *in vitro* o variante radical”. Esto nos hace resaltar la importancia que tiene el realizar análisis de los familiares, no solo por la importancia de detectar de manera temprana pacientes aparentemente asintomáticos, sino por su capacidad de definir la clasificación de una variante cuya patogenicidad no es concluyente al momento de su evaluación inicial.

Aunque los criterios de Campuzano resultaron una herramienta útil en la determinación sistemática del efecto de algunas variantes, la variante *ANK2* p.E1126G fue clasificada como VUS, siendo un caso índice con SQTL homocigota para esta variante. Esto es debido a que estos criterios no hacen distinción entre variantes de efecto dominante y recesivo; ni consideran la posibilidad de penetrancia incompleta, lo que complicó la valoración de la patogenicidad de algunas variantes en casos potencialmente digénicos. De los pacientes a los cuales no se puede detectar alguna variante patogénica o probablemente patogénica, pero si se detectó una VUS, la clasificación no se pudo modificar principalmente por falta de información de las familias de estos pacientes, haciendo imposible la búsqueda de cosegregación. En otros casos, la variante fue clasificada como de significancia incierta debido a la ausencia de estudios funcionales de la misma, sobre todo en los casos de pacientes con variantes de interés clínico en el gen *RYR2*, ya que por las características de este gen su estudio resulta complejo.

Hay que resaltar que, durante el desarrollo de este estudio, los criterios del ACMG dependientes de la información en bases de datos poblacionales y de reporte de variantes asociadas a enfermedad fueron modificándose al ser actualizados, cambiando algunos reportes de patogenicidad, aumentando los casos de clasificación de variantes como patogénicas o probablemente patogénicas, por lo que es importante la evaluación continua de las VUS para definir su patogenicidad.

3. Casos de Interés

3.1. SQTL con mutaciones en BAG3 y ANK2

El caso SQTL-14 cumple los criterios de Schwartz para el diagnóstico de QT largo, y a los 37 años no tiene evidencia clínica o ecocardiográfica de trastornos miopáticos ni cardiomiopatía dilatada (CMD). Esta paciente tiene 3 hijos, ninguno con diagnóstico de SQTL o CMD al momento. Es de llamar la atención que la SNG reveló la presencia de una variante patogénica en *BAG3* (p.Q251X). *BAG3* no es considerado como un gen causal de SQTL, sino de miopatía fibrilar y CMD. Se ha reportado que mutaciones de pérdida de función de este gen causan CMD, generalmente sin arritmias (Franaszczyk et al., 2014; Lee et al., 2012). Interesantemente, existe el reporte de paciente chino que presentaba síntomas de QT largo, debilidad muscular severa y miocardiopatía hipertrófica, quien era heterocigoto para 2 variantes de cambio de sentido en *BAG3* (p.P209L y p.R258W). En su familia, el padre era portador heterocigoto de la variante p.R258W, este presentaba QT largo sin las otras características fenotípicas (Lee et al., 2012).

Por otro lado, la paciente SQTL-14 resultó ser homocigota para una variante en el gen *ANK2* (p.E1126G). Esta variante está reportada en la base de datos gnomAD (Karczewski et al., 2020) con una muy baja frecuencia (0.000004). Este gen está relacionado al síndrome de Ankirina-B, el cual además de prolongación del segmento QT, cursa con bloqueos cardíacos y TVPC. Ninguno de los familiares heterocigotos para *ANK2* p.E1126G presentó alteraciones importantes en el ECG. Es posible que esta variante solo cause SQTL al presentarse en forma homocigota, como ha sido reportado para algunas variantes en el gen *KCNQ1* (Novotny et al., 2006; Priori et al., 1998; Zafari et al., 2017).

Es necesario determinar si el SQTL de la paciente SQTL-14 se debe al efecto combinado de *BAG3* p.Q251X y de *ANK2* p.E1458G en forma homocigota. Para esto se deben realizar estudios funcionales de la variante *ANK2*. Por otro lado, no debe descartarse la posibilidad de que exista otra variante no detectada por SNG que sea responsable del SQTL en esta paciente.

3.2. SQTC

En este estudio presentamos el caso de una niña donde el diagnóstico molecular llevó al diagnóstico clínico. La niña presentó bradicardia fetal y evidencia clínica de canalopatía desde la infancia, y fue reclutada a nuestro estudio con diagnóstico probable de DNS. Sin embargo, la SNG reveló la presencia heterocigota de la variante *KCNQ1* p.V141M, previamente publicada como causal de síndrome de QT corto. Como consecuencia de este hallazgo, se confirmó que en el ECG presentaba un QTc = 290ms. A diferencia de otros pacientes con SQTC, esta variante se ha asociado con características clínicas diferentes: bradicardia fetal, fibrilación auricular permanente, bloqueo AV completo intermitente y DNS (Gussak et al., 2000; Sarquella-Brugada et al., 2015; Villafañe, Fischbach, & Gebauer, 2014). En general, los pacientes con SQTC con otras mutaciones muestran un inicio de edad posterior, pero una mayor prevalencia de arritmias ventriculares y muerte súbita cardíaca (Campuzano et al., 2018). En nuestro paciente, similar a los pacientes con esta mutación publicada en la literatura, no han desarrollado arritmias ventriculares en el seguimiento, lo que sugiere que es una entidad independiente de SQTC.

3.3. Fenotipo mixto de SBr y TVPC

Presentamos el caso SBr-2, el cual es de particular interés por ser un heterocigoto compuesto para una variante en el gen *SCN5A*; una variante patogénica compleja donde cambia un triptofano por una fenilalanina en la posición 1345 de la proteína y se deletan los siguientes 4 aminoácidos, y una variante probablemente patogénica (p.P1730L) según los criterios ACMG y de Campuzano. Esta paciente presenta además una variante de sentido erróneo en *RYR2* clasificada como VUS en forma heterocigota (p.V2552M). Hasta donde sabemos, esta combinación de variantes genéticas es la primera de su tipo y no existen pautas para un manejo adecuado. Aunque este caso no puede categorizarse únicamente como SBr, es el fenotipo de ECG predominante. Concomitantemente, la paciente presentó datos de disfunción del nodo sinusal, parálisis auricular, arritmias auriculares, TV monomórfica sostenida y TV bidireccional relacionada con el ejercicio. Esta última arritmia ocurre en TVCP, y sugiere un trastorno de la función del receptor de rianodina *RYR2*.

Al buscar estas mutaciones en de los miembros de la familia, se diagnosticó un caso de síndrome de Brugada en un primo hermano por rama paterna que porta la delección compleja en *SCN5A*.

De manera interesante, 2 primos hermanos portadores de la variante p.V2552M en el gen *RYR2* no presentan el cuadro clínico de TVCP, aunque uno de ellos refiere palpitaciones incesantes durante el ejercicio, sin llegar a síncope. El padre de estos niños, tío paterno del caso índice, se encuentra en estudio por una arritmia no especificada en el extranjero. Debido a la pandemia, se pospuso la realización de estudios Holter y pruebas de esfuerzo para el resto de los familiares. Resulta interesante que ocurran arritmias que sugieren alteraciones en canales de sodio concomitantemente con arritmias que sugieren alteraciones en *RYR2* únicamente al presentarse la combinación de las 3 variantes. Se requieren estudios funcionales con diferentes combinaciones de estas 3 variantes para poder entender mejor el mecanismo de generación de tantos diferentes tipos de arritmia en esta paciente.

4. El gen *SCN5A* y los fenotipos mixtos

En la literatura se ha propuesto una nueva entidad patológica conocida como "síndrome de sobreposición" de canalopatías cardíaca causadas por alteraciones del canal de sodio: los portadores de la mutación tienden a exhibir propiedades clínicas superpuestas, como SQTL, SBr, trastornos de la conducción cardíaca y DNS (Hayashi, Sumiyoshi, Nakazato, & Daida, 2018). Como ejemplo tenemos las variantes p.E161K, p.T187I, p.K1578fs, y p.R1623X, estas fueron identificadas en pacientes con SBr y DNS, revelando el fenotipo clínico de superposición (Makiyama et al., 2005; Smits et al., 2005). Se planea realizar estudios funcionales de las variantes individuales y diferentes combinaciones para comprender mejor estos casos y refinar su manejo.

La mayor parte de las variantes detectadas en *SCN5A* se localizaron en la región más distal del canal de Nav1.5, especialmente en las subunidades formadoras de poro (S5 y S6) incluyendo el asa-P del dominio IV que forma parte del filtro de selectividad del canal de sodio (p.R1644H, p.T1708N, p.S1710L, p.A1724D, p.P1730L y p.D1741fs) (Figura 31). Notablemente, las variantes *SCN5A* p.T1708N, *SCN5A* p.S1710L (rs137854604) y *SCN5A* p.D1275N (rs137854618) se encontraron en pacientes con diferentes AHs, específicamente DNS y SBr, sugiriendo que esta región podría estar implicada en el desarrollo de fenotipos mixtos (Hayashi et al., 2018; Yagihara et al., 2016).

La variante *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). La variante *SCN5A* p. D1275N luego de realizar estudios *in vivo* se asoció con una disminución de la amplitud del potencial de acción, consistente con la disminución de la corriente máxima de sodio, y con una duración prolongada del potencial de acción, consistente con el aumento de la corriente tardía (H. Watanabe et al., 2011). Aunque alteran diferentes parámetros electrofisiológicos de los canales, ambas variantes causan dos efectos aparentemente opuestos simultáneamente: una importante reducción de la duración o intensidad de la I_{Na} en el pico (disminución de la función); y un incremento de la I_{Na} tardía o persistente (aumento de la función). Este mismo fenómeno se reportó anteriormente para la variante p.1795insD identificada en pacientes con fenotipos mixtos como bradicardia, conducción cardíaca retardada, prolongación del intervalo QTc y aumento del intervalo ST precordial (Remme et al., 2006). Al mismo tiempo, llama la atención que los portadores de la variante p.T1708N poseen un fenotipo mixto de presentación variable, incluyendo QTc prolongado, SBr o DNS, incluso entre portadores en la misma familia. Estos fenotipos mixtos pueden deberse a la presencia de variantes moduladoras de varios fenotipos arrítmicos. Por ejemplo, Aoki *et al* demostraron que las diferencias fenotípicas en una familia con SBr y DNS con una mutación *SCN5A*, podrían explicarse por modificadores como las variantes de genes *SCN1B* y *DSG2* (Aoki, Nakamura, Ohno, Makiyama, & Horie, 2017). Es posible que esto pueda explicar las diferentes presentaciones fenotípicas de nuestros pacientes, por lo que será necesario estudiar la cosegregación de polimorfismos en genes de AHs en la familia.

5. *RYR2* como gen de susceptibilidad para SQTL

Las variantes en el gen que codifica el receptor de rianodina (RyR2) son la principal causa de taquicardia ventricular polimorfa catecolaminérgica, desde hace más de una década se demostró que mayoría de las variantes causales de TVPC en este gen 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 (DADs por sus siglas en inglés).

RYR2 no está considerado un gen causal de SQTL, aunque ya se ha considerado su posible papel en la fisiopatología del SQTL (Campuzano & Sarquella-brugada, 2017). Hasta el momento, solo se ha documentado 1 caso con diagnóstico inequívoco de SQTL portador de una variante probablemente causal en *RYR2* (p.V4299M), negativo para variantes patogénicas en genes causales de SQTL (Kaufenstein et al., 2011). Otros casos descritos se inclinan más a una “superposición fenotípica” entre TVPC y SQTL, presentando QTc >460ms, el cual se alargó con pruebas de epinefrina, además de la presencia de taquicardias ventriculares polimórficas o contracciones ventriculares prematuras; todos portadores de variantes en *RYR2* (p.I4756S, p.V4298M, p.K4594Q, p.T2390I) (Letsas et al., 2020; Tanaka, Kawabata, Scheinman, & Hirao, 2015; Taniguchi et al., 2017; T. Watanabe et al., 2016). 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. En un estudio preliminar presentado por Valdivia *et al.* se estudió el efecto funcional de la variante *RYR2*-p.R2920Q, identificada en el caso SQTL-29 (quien aparentemente no es portadora de otras mutaciones en genes causales de SQTL), señalando que esta variante confiere a los canales RYR2 una ganancia de función por aumentar su afinidad al calcio. Sin embargo, esto no explica la prolongación del intervalo QT. Una hipótesis sugiere que la liberación espontánea de Ca²⁺ por el RS (canales de rianodina) durante la fase sistólica del PA puede causar post-despolarizaciones tempranas (EADs) que alargan el QTc, debido a una liberación de calcio inducida por sobrecarga de almacenamiento (SOICR), antes de que la membrana alcance los niveles de PA diastólicos, activando los canales NCX, lo que aumenta las corrientes de entrada, despolarizando el sarcolema y reactivando los canales de Ca²⁺ tipo L, similar al mecanismo de las DADs (Némec, Kim, & Salama, 2016; Volders et al., 2000). Este mecanismo está en investigación. Finalmente, será interesante explorar la variante *RYR2* p.Y4287N, identificada en el caso SQTL-19, el cual presenta un claro caso de SQTL.

6. Perspectivas

Algunos genes que codifican proteínas esenciales en la función eléctrica cardíaca pueden tener variantes raras neutras o no patogénicas; por lo que su identificación no implica un diagnóstico definitivo, y asumir erróneamente su patogenicidad podría impactar negativamente un paciente

o a sus familiares (J. P. Ackerman et al., 2016). Debido a esto para poder alcanzar un diagnóstico molecular certero son de vital importancia el estudio funcional y de cosegregación familiar. Es importante resaltar que en ciertos casos es complicado realizar el estudio funcional en los modelos *in vitro* como células HEK-293 y ovocitos de *Xenopus*, debido al número de variantes que se pueden encontrar en un solo individuo y a las diferentes combinaciones que se pueden encontrar en una familia. Tomando en cuenta a lo anterior, nos inclinamos a que el modelo experimental ideal para estudiar estos casos oligogénicos son los cardiomiocitos derivados de células madre pluripotenciales de humano. Sin embargo, los estudios funcionales no pueden ser llevados a cabo en todos los casos ya que estos son muy frecuentemente de difícil acceso para algunas instituciones que realizan el diagnóstico genético, ya sea por costos, por necesidad de equipos o por la complejidad de los canales. Una alternativa a esto es analizar el posible efecto de algunas variantes mediante su modelaje *in silico* (Polanco, Uversky, Marquez, & Buhse, 2019), lo que permitiría obtener un acercamiento al efecto de estas para optimizar el diagnóstico molecular.

Otra estrategia para mejorar el rendimiento diagnóstico en los pacientes con AHs es a través del aprendizaje automático (ML por sus siglas en inglés, machine learning). Este es un campo de la informática que implica la generación de algoritmos capaces de aprender iterativamente, explorando y utilizando patrones dentro de los datos para actuar específicamente, sin ser programados explícitamente (automáticos) (Benjamins J, Yeung M, Reyes-Quintero A, Ruijsink B, van der Harst P, 2020). La aplicación de estos sistemas, en su mayoría, se dirige para mejorar la predicción diagnóstica. En el área de la genómica, se han empleado principalmente para facilitar procesos como la llamada de variantes, la anotación del genoma y la clasificación de variantes, y la correspondencia de fenotipo a genotipo (Dias & Torkamani, 2019). DeepVariant, un algoritmo utilizado para llamado de variantes basado en redes neuronales convolucionales, entrenado en alineamiento de lecturas sin conocimiento previo sobre genómica, demostró superioridad a las herramientas estándar en algunas tareas de llamadas de variantes gracias a la capacidad de las redes neuronales convolucionales (CNN por sus siglas en inglés; Convolutional neural network) para identificar dependencias complejas en datos de secuenciación (Poplin et al., 2018)

X. Conclusiones

- El rendimiento diagnóstico de AHs en pacientes mexicanos mediante SNG sitio-dirigida fue similar al reportado en otras poblaciones, demostrando que esta es una herramienta útil para la detección de variantes causales y potencialmente causales de AHs.
- La técnica de MLPA ayudo en el diagnóstico molecular de un caso no resuelto por SNG-sitio dirigida, lo que nos muestra la utilidad de la aplicación de métodos alternativos para la evaluación de casos no concluyentes.
- Los criterios actuales para evaluar la patogenicidad de las variantes de interés clínico demostraron ser útiles, pero aun poseen deficiencias que necesitan ser refinadas, y así lograr realizar reportes fidedignos de patogenicidad a los pacientes.
- Aunque la mayoría de los casos con AHs se consideran síndromes monogénicos, es probable que algunos sean el resultado de la interacción de variantes patogénicas con otras variantes del mismo tipo o con diferentes polimorfismos raros y/o comunes, lo que explicaría la expresividad variable que suele observarse entre diferentes pacientes y familias con AH.
- La detección de variables en el gen *RYR2* en pacientes con SQTl apoya la hipótesis planteada anteriormente de que este gen puede ser de susceptibilidad para el Síndrome de QT largo, además de la TVPC.

XI. Referencias

1. 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. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 7(3), 511–517. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.001340>
2. 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>
3. 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>
4. 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*. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
5. Altshuler, D. L., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., Chakravarti, A., Clark, A. G., ... Peterson, J. L. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061–1073. <https://doi.org/10.1038/nature09534>
6. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. (2012). *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
7. Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., ... Wilde, A. (2005). *Brugada Syndrome Report of the Second Consensus Conference Endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000152479.54298.51>
8. Aoki, H., Nakamura, Y., Ohno, S., Makiyama, T., & Horie, M. (2017). Cardiac conduction defects and Brugada syndrome: A family with overlap syndrome carrying a nonsense SCN5A mutation. *Journal of Arrhythmia*, 33(1), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2016.05.007>
9. Arnestad, M., Crotti, L., Rognum, T. O., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., ... Schwartz, P. J. (2007). Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation*.

- <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.658021>
10. Arnolds, D. E., Liu, F., Fahrenbach, J. P., Kim, G. H., Schillinger, K. J., Smemo, S., ... Moskowitz, I. P. (2012). TBX5 drives Scn5a expression to regulate cardiac conduction system function. *Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2509–2518.
<https://doi.org/10.1172/JCI62617>
 11. Barc, J., Briec, F., Schmitt, S., Kyndt, F., Le Cunff, M., Baron, E., ... Schott, J. J. (2011). Screening for copy number variation in genes associated with the long QT syndrome: Clinical relevance. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.08.621>
 12. 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>
 13. Bayés De Luna, A. (1998). *Electrocardiografía Clínica*. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=VjxEAgAACAAJ>
 14. Bayés De Luna, A., Brugada, J., Baranchuk, A., Borggrefe, M., Breithardt, G., Goldwasser, D., ... Brugada, P. (2012). Current electrocardiographic criteria for diagnosis of Brugada pattern: A consensus report. *Journal of Electrocardiology*, 45(5), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2012.06.004>
 15. Benjamins J, Yeung M, Reyes-Quintero A, Ruijsink B, van der Harst P, J.-O. L. (2020). Machine Learning-based AI in novel image data processing for hybrid cardiovascular imaging. In *Hybrid Cardiac Imaging For Clinical Decision-Making* (Springer).
 16. Benson, D. W., Rhodes, T. H., Alfred, L., Jr, G., Benson, D. W., Wang, D. W., ... George, A. L. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A) Find the latest version : mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *Journal of Clinical Investigation*, 112(7), 1019–1028. <https://doi.org/10.1172/JCI200318062>.Introduction
 17. Berne, P., & Brugada, J. (2012). Brugada Syndrome. *Circulation Journal*, 76, 1563–1571. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0717>
 18. Berthome, P., Tixier, R., Briand, J., Geoffroy, O., Babuty, D., Mansourati, J., ... Gourraud, J. B. (2019). Clinical presentation and follow-up of women affected by Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 16(2), 260–267.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.08.032>
 19. Bezzina, C. R., Lahrouchi, N., & Priori, S. G. (2015). Genetics of Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*, 116(12), 1919–1936.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304030>

20. Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2017). *Medical Physiology* (3rd ed.). Elsevier Inc.
21. Brugada, J., Brugada, R., & Brugada, P. (1998). Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: A marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease structural heart disease. *Circulation*, Vol. 97, pp. 457–460. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.5.457>
22. Brugada, J., Campuzano, O., Arbelo, E., Sarquella-Brugada, G., & Brugada, R. (2018). Present Status of Brugada Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(9), 1046–1059. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.06.037>
23. Burns, C., Ingles, J., Davis, A. M., Connell, V., Gray, B., Hunt, L., ... Semsarian, C. (2016). Clinical and genetic features of Australian families with long QT syndrome: A registry-based study. *Journal of Arrhythmia*, 32(6), 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.joa.2016.02.001>
24. Campuzano, O., & Sarquella-brugada, G. (2017). Update on the genetic basis of long QT syndrome. In *Human Genetic Diseases* (pp. 2–31). Retrieved from <https://www.avidscience.com/wp-content/uploads/2017/07/update-on-the-genetic-basis-of-long-qt-syndrome.pdf>
25. Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Cesar, S., Arbelo, E., Brugada, J., & Brugada, R. (2018). Recent Advances in Short QT Syndrome. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5(October), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00149>
26. Casini, S., Tan, H. L., Bhuiyan, Z. A., Bezzina, C. R., Barnett, P., Cerbai, E., ... Veldkamp, M. W. (2007). Characterization of a novel SCN5A mutation associated with Brugada syndrome reveals involvement of DIIS4-S5 linker in slow inactivation. *Cardiovascular Research*, 76(3), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.08.005>
27. Cock, P. J. A. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2009). 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>
28. Cotton, R. G. H., & Scriver, C. R. (1998). Proof of “disease causing” mutation. *Human Mutation*, 12(1), 1–3. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-M)
29. Crotti, L., Marcou, C. A., Tester, D. J., Castelletti, S., Giudicessi, J. R., Torchio, M., ... Ackerman, M. J. (2012). Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1-Through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for

- brugada syndrome genetic testing: Implications for genetic testing. *Journal of the American College of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.04.037>
30. Crotti, L., Tester, D. J., White, W. M., Bartos, D. C., Insolia, R., Besana, A., ... Ackerman, M. J. (2013). Long QT syndrome-associated mutations in intrauterine fetal death. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.3219>
 31. De Ponti, R., Marazzato, J., Bagliani, G., Leonelli, F. M., & Padeletti, L. (2018). Sick Sinus Syndrome. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 10(2), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2018.02.002>
 32. 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), 491–501. <https://doi.org/10.1038/ng.806>
 33. Dhein, S., & Salameh, A. (1998). *Cardiac Gap Junctions: Physiology, Regulation, Pathophysiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00398-016-0106-1>
 34. Dias, R., & Torkamani, A. (2019). Artificial intelligence in clinical and genomic diagnostics. *Genome Medicine*, 11(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0689-8>
 35. Epstein, A. E., DiMarco, J. P., Ellenbogen, K. A., Estes, 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). *Journal of the American College of Cardiology*, 51(21), e1–e62. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.032>
 36. Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., ... Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron*, 25(3), 533–535. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81057-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81057-0)
 37. Ewans, L. J., Schofield, D., Shrestha, R., Zhu, Y., Gayevskiy, V., Ying, K., ... Roscioli, T. (2018). Whole-exome sequencing reanalysis at 12 months boosts diagnosis and is cost-effective when applied early in Mendelian disorders. *Genetics in Medicine*, 20(12), 1564–1574. <https://doi.org/10.1038/gim.2018.39>
 38. Ewing, B., & Green, P. (1998a). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8(3), 186–194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
 39. Ewing, B., & Green, P. (1998b). 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>
40. 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), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology6010007>
 41. Franaszczyk, M., Bilinska, Z. T., Sobieszcząńska-Malek, M., Michalak, E., Sleszycka, J., Sioma, A., ... Ploski, R. (2014). The BAG3 gene variants in Polish patients with dilated cardiomyopathy: four novel mutations and a genotype-phenotype correlation. *Journal of Translational Medicine*, *12*(1), 192. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-192>
 42. Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., & Tijskens, P. (2005). The assembly of calcium release units in cardiac muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1047*, 76–85. <https://doi.org/10.1196/annals.1341.007>
 43. Garcia-Elias, A., & Benito, B. (2018). Ion channel disorders and sudden cardiac death. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms19030692>
 44. George, A. L. (2013). Molecular and genetic basis of sudden cardiac death. *J Clin Invest. The Journal of Clinical Investigation*, *123*(1), 75–83. <https://doi.org/10.1172/JCI62928>
 45. Giudicessi, J. R., & Ackerman, M. J. (2012). Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias - Diagnosis and therapy. *Nature Reviews Cardiology*, *9*(6), 319–332. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.3>
 46. Giudicessi, J. R., & Ackerman, M. J. (2013). Genotype- and Phenotype-Guided Management of Congenital Long QT Syndrome. *Current Problems in Cardiology*, *38*(10), 417–455. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2013.08.001>
 47. Giudicessi, J. R., & Ackerman, M. J. (2016). Calcium revisited. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, *9*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.116.002480>
 48. Gourraud, J.-B., Barc, J., Thollet, A., Le Scouarnec, S., Le Marec, H., Schott, J.-J., ... Probst, V. (2016). The Brugada Syndrome: A Rare Arrhythmia Disorder with Complex Inheritance. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2016.00009>
 49. Grandi, E., Sanguinetti, M. C., Bartos, D. C., Bers, D. M., Chen-Izu, Y., Chiamvimonvat, N., ... Yarov-Yarovoy, V. (2017). Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *Journal of Physiology*, *595*(7), 2209–2228. <https://doi.org/10.1113/JP272864>
 50. Green, R. C., Berg, J. S., Grody, W. W., Kalia, S. S., Korf, B. R., Martin, C. L., ...

- Biesecker, L. G. (2013). ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genetics in Medicine*, *15*(7), 565–574. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.73>
51. Gussak, I., Brugada, P., Brugada, J., Wright, R. S., Kopecky, S. L., Chaitman, B. R., & Bjerregaard, P. (2000). Arrhythmias, Electrophysiology and Electrocardiography Idiopathic Short QT Interval: A New Clinical Syndrome? *Cardiology*, *55905*, 99–102. Retrieved from www.karger.comwww.karger.com/journals/crd
 52. Guyton, C., & Hall, J. (2016). Guyton Y Hall Tratado De Fisiología Médica John E. Hall. *Elsevier*, *13a*, 2924. <https://doi.org/10.1007/s12369-009-0019-1>
 53. Hayashi, H., Sumiyoshi, M., Nakazato, Y., & Daida, H. (2018). Brugada syndrome and sinus node dysfunction. *Journal of Arrhythmia*, *34*(3), 216–221. <https://doi.org/10.1002/joa3.12046>
 54. Hofman, N., Langen, I. Van, & Wilde, A. A. M. (2010). Genetic testing in cardiovascular diseases. *Current Opinion in Cardiology*, *25*(3), 243–248. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e3283374d69>
 55. 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>
 56. Hong, K., Piper, D. R., Diaz-valdecantos, A., Brugada, J., Oliva, A., Burashnikov, E., ... Diaz-enfante, E. (2005). *De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero*. *68*, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.06.023>
 57. 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>
 58. 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>
 59. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., ... MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *BioRxiv*, *581*(May), 531210. <https://doi.org/10.1101/531210>
 60. Kass, R. S. (2006). Sodium channel inactivation in heart: A novel role of the carboxy-terminal domain. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *17*(SUPPL. 1), 21–25. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2006.00381.x>

61. Kauferstein, 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>
62. 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*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
63. Landstrom, A. P., Boczek, N. J., Ye, D., Miyake, C. Y., De la Uz, C. M., Allen, H. D., ... Kim, J. J. (2016). Novel long QT syndrome-associated missense mutation, L762F, in CACNA1C-encoded L-type calcium channel imparts a slower inactivation tau and increased sustained and window current. *International Journal of Cardiology*, 220, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.081>
64. Landstrom, A. P., Fernandez, E., Rosenfeld, J. A., Yang, Y., Dailey-Schwartz, A. L., Miyake, C. Y., ... Kim, J. J. (2018). Amino acid-level signal-to-noise analysis of incidentally identified variants in genes associated with long QT syndrome during pediatric whole exome sequencing reflects background genetic noise. *Heart Rhythm*, 15(7), 1042–1050. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.02.031>
65. Le Scouarnec, S., Bhasin, N., Vieyres, C., Hund, T. J., Cunha, S. R., Koval, O., ... Mohler, P. J. (2008). Dysfunction in ankyrin-B-dependent ion channel and transporter targeting causes human sinus node disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15617–15622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805500105>
66. Lee, H. C., Cherk, S. W., Chan, S. K., Wong, S., Tong, T. W., Ho, W. S., ... Mak, C. M. (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>
67. Leenhardt, A., Lucet, V., Denjoy, I., Grau, F., Ngoc, D. D., & Coumel, P. (1995). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Children : A 7-Year Follow-up of 21 Patients. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.5.1512>
68. Letsas, K. P., Prappa, E., Bazoukis, G., Lioni, L., Pantou, M. P., Gourzi, P., ... Sideris, A. (2020). A novel variant of RyR2 gene in a family misdiagnosed as congenital long QT syndrome: The importance of genetic testing. *Journal of Electrocardiology*, 60, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2020.03.001>
69. Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
70. Li, J., Greener, I. D., Inada, S., Nikolski, V. P., Yamamoto, M., Hancox, J. C., ...

- Boyett, M. R. (2008). *Computer Three-Dimensional Reconstruction of the Atrioventricular Node*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.172403>
71. Lombardi, R. (2013). Genetics and sudden death. *Current Opinion in Cardiology*. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e32835fb7f3>
72. Louis, C., Calamaro, E., & Vinocur, J. M. (2018). Hereditary arrhythmias and cardiomyopathies: Decision-making about genetic testing. *Current Opinion in Cardiology*, *33*(1), 78–86. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000477>
73. Makiyama, T., Akao, M., Tsuji, K., Doi, T., Ohno, S., Takenaka, K., ... Horie, M. (2005). High risk for bradyarrhythmic complications in patients with Brugada syndrome caused by SCN5A gene mutations. *Journal of the American College of Cardiology*, *46*(11), 2100–2106. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.08.043>
74. 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*. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
75. Medeiros-Domingo, A., Bhuiyan, Z. A., Tester, D. J., Hofman, N., Bikker, H., van Tintelen, J. P., ... Ackerman, M. J. (2009). The RYR2-Encoded Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel in Patients Diagnosed Previously With Either Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia or Genotype Negative, Exercise-Induced Long QT Syndrome. A Comprehensive Open Reading Frame Muta. *Journal of the American College of Cardiology*, *54*(22), 2065–2074. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.022>
76. Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P., & Ackerman, M. J. (2007). Clínica y genética en el síndrome de QT largo. *Revista Espanola de Cardiologia*, *60*(7), 739–752. <https://doi.org/10.1157/13108280>
77. Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P., Ackerman, M. J., Salvador, N., México, Z., & De Revisión, A. (2007). Clínica y genética en el síndrome de QT largo. *Rev Esp Cardiol*, *60*(7), 739–752.
78. Moe, G. K., Preston, J. B., & Burlington, H. (1956). Physiologic evidence for a dual A-V transmission system. In *Circulation research* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1161/01.RES.4.4.357>
79. Morita, H. (2019). Gender difference in Brugada syndrome: Mirror images of long QT syndrome? *Heart Rhythm*, *16*(2), 268–269. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.09.004>
80. Morris, G. M., & Kalman, J. M. (2014). Fibrosis, electrics and genetics - Perspectives on sinoatrial node disease -. *Circulation Journal*, *78*(6), 1272–1282.

- <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0419>
81. Motoike, H. K., Liu, H., Glaaser, I. W., Yang, A. S., Tateyama, M., & Kass, R. S. (2004). The Na⁺ Channel Inactivation Gate Is a Molecular Complex: A Novel Role of the COOH-terminal Domain. *Journal of General Physiology*, *123*(2), 155–165. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308929>
82. Napolitano, C., & Antzelevitch, C. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circulation Research*, *108*(5), 607–618. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224279>
83. Napolitano, C., & Priori, S. G. (2002). Genetics of ventricular tachycardia. *Current Opinion in Cardiology*, *17*(3), 222–228. <https://doi.org/10.1097/00001573-200205000-00003>
84. Němec, J., Kim, J. J., & Salama, G. (2016). The link between abnormal calcium handling and electrical instability in acquired long QT syndrome – Does calcium precipitate arrhythmic storms? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *120*(1–3), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.11.003>
85. Nieto-Marín, P., Jiménez-Jáimez, J., Tinaquero, D., Alfayate, S., Utrilla, R. G., Rodríguez Vázquez del Rey, M. del M., ... Caballero, R. (2019). Digenic Heterozygosity in SCN5A and CACNA1C Explains the Variable Expressivity of the Long QT Phenotype in a Spanish Family. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, *72*(4), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2018.03.012>
86. Nof, E., Glikson, M., & Antzelevitch, C. (2009). Genetics and Sinus Node Dysfunction. *Journal Of Atrial Fibrillation*, *1*(6), 28–35. <https://doi.org/10.4022/jafib.151>
87. Novotny, T., Kadlecova, J., Janousek, J., Gaillyova, R., Bittnerova, A., Florianova, A., ... Spinar, J. (2006). The homozygous KCNQ1 gene mutation associated with recessive Romano-Ward syndrome. *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*, *29*(9), 1013–1015. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2006.00478.x>
88. Nykamp, K., Anderson, M., Powers, M., Garcia, J., Herrera, B., Ho, Y. Y., ... Topper, S. (2017). Sherlock: A comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genetics in Medicine*, *19*(10), 1105–1117. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.37>
89. Park, D. S., & Fishman, G. I. (2011). The cardiac conduction system. *Circulation*, *123*(8), 904–915. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942284>
90. Patel, C., Yan, G. X., & Antzelevitch, C. (2010). Short QT syndrome: From bench to bedside. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, *3*(4), 401–408.

- <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.921056>
91. Pieroni, M., Notarstefano, P., Oliva, A., Campuzano, O., Santangeli, P., Coll, M., ... Bolognese, L. (2018). Electroanatomic and Pathologic Right Ventricular Outflow Tract Abnormalities in Patients With Brugada Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(22), 2747–2757. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.037>
 92. Polanco, C., Uversky, V. N., Marquez, M. F., & Buhse, T. (2019). *Bioinformatics characterisation of the (mutated) proteins related to Andersen – Tawil syndrome.* (March). <https://doi.org/10.3934/mbe.2019127>
 93. Poplin, R., Chang, P.-C., Alexander, D., Schwartz, S., Colthurst, T., Ku, A., ... DePristo, M. A. (2018). A universal SNP and small-indel variant caller using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 36(10), 983–987. <https://doi.org/10.1038/nbt.4235>
 94. Postma, A. V., Denjoy, I., Hoorntje, T. M., Lupoglazoff, J. M., Da Costa, A., Sebillon, P., ... Guicheney, P. (2002). Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation Research*, 91(8). <https://doi.org/10.1161/01.res.0000038886.18992.6b>
 95. Postma, A. V., Denjoy, I., Kamblock, J., Alders, M., Lupoglazoff, J. M., Vaxsmann, G., ... Wilde, A. A. M. (2005). Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *Journal of Medical Genetics*, 42(11), 863–870. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028993>
 96. Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., & Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews*, 74(3), 595–636. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.595>
 97. Priori, S. G., Blomstrom-Lundqvist, C., Mazzanti, A., Bloma, N., Borggrefe, M., Camm, J., ... Parkhomenko, A. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death the Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 36(41), 2793–2867. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv316>
 98. Priori, S. G., Napolitano, C., Memmi, M., Colombi, B., Drago, F., Gasparini, M., ... DeLogu, A. (2002). 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>
 99. Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bianchi, L., Dennis, A., De Fusco, M., ... 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>
100. 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*. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.853374>
101. Remme, C. A. (2013). Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: Electrophysiological, molecular and genetic aspects. *Journal of Physiology*, 591(17), 4099–4116. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.256461>
102. Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., Van Ginneken, A. C. G., Van Brunschot, S., 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>
103. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
104. Roden, D. M., Balsler, J. R., George Jr, A. L., & Anderson, M. E. (2002). Cardiac Ion Channels. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 431–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.083101.145105>
105. Ruan, Y., Liu, N., & Priori, S. G. (2009). Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nature Reviews Cardiology*, 6(5), 337–348. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.44>
106. Saprungruang, A., Khongphatthanayothin, A., Mauleekoonphairoj, J., Wandee, P., Kanjanauthai, S., Bhuiyan, Z. A., ... Poovorawan, Y. (2018). Genotype and clinical characteristics of congenital long QT syndrome in Thailand. *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*, 18(5), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.ipej.2018.07.007>
107. Sarquella-Brugada, G., Campuzano, O., Iglesias, A., Grueso, J., Bradley, D. J., Kerst, G., ... Brugada, R. (2015). Short QT and atrial fibrillation: A KCNQ1 mutation-specific disease. Late follow-up in three unrelated children. *HeartRhythm Case Reports*, 1(4), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.hrcr.2015.02.005>
108. Schwartz, P. J., Ackerman, M. J., George, A. L., & Wilde, A. A. M. M. (2013). Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(3), 169–180.

- <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.04.044>
109. 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>
110. Schwartz, P. J., Stramba-Badiale, M., Crotti, L., Pedrazzini, M., Besana, A., Bosi, G., ... Spazzolini, C. (2009). Prevalence of the congenital long-qt syndrome. *Circulation*, *120*(18), 1761–1767.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.863209>
111. Sharif-Kazemi, M. B., Emkanjoo, Z., Tavoosi, A., Kafi, M., Kheirkhah, J., Alizadeh, A., & Sadr-Ameli, M. A. (2011). Electrical storm in Brugada syndrome during pregnancy. *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*, *34*(2).
<https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2010.02740.x>
112. 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>
113. Sicouri, S., & Antzelevitch, C. (2018). Mechanisms underlying the actions of antidepressant and antipsychotic drugs that cause sudden cardiac arrest. *Arrhythmia and Electrophysiology Review*, *7*(3), 199–209. <https://doi.org/10.15420/aer.2018.29.2>
114. Smits, J. P. P., Koopmann, T. T., Wilders, R., Veldkamp, M. W., Opthof, T., Bhuiyan, Z. A., ... Wilde, A. A. M. (2005). A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *38*(6), 969–981. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.02.024>
115. Snyders, D. J. (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*, *42*(2), 377–390. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00071-1)
116. Sonoda, K., Ohno, S., Ozawa, J., Hayano, M., Hattori, T., Kobori, A., ... Horie, M. (2018). Copy number variations of SCN5A in Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, *15*(8), 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.03.033>
117. Stattin, E. L., Boström, I. M., Winbo, A., Cederquist, K., Jonasson, J., Jonsson, B. A., ... Norberg, A. (2012). Founder mutations characterise the mutation panorama in 200 Swedish index cases referred for Long QT syndrome genetic testing. *BMC Cardiovascular Disorders*, *12*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-12-95>
118. Sun, Y., Xiang, J., Liu, Y., Chen, S., Yu, J., Peng, J., ... Peng, Z. (2019). Increased

- diagnostic yield by reanalysis of data from a hearing loss gene panel. *BMC Medical Genomics*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0531-6>
119. Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Valenzuela, C., & Delpón, E. (2004). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*, 62(1), 9–33. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.026>
120. Tan, V. H., Duff, H., Kuriachan, V., & Gerull, B. (2014). Congenital long QT syndrome: Severe Torsades de pointes provoked by epinephrine in a digenic mutation carrier. *Heart and Lung: Journal of Acute and Critical Care*, 43(6), 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2014.07.004>
121. Tanaka, Y., Kawabata, M., Scheinman, M. M., & Hirao, K. (2015). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia with QT Prolongation. *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*, 38(12), 1499–1502. <https://doi.org/10.1111/pace.12735>
122. 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>
123. Tester, D. J., & Ackerman, M. J. (2007). Postmortem Long QT Syndrome Genetic Testing for Sudden Unexplained Death in the Young. *Journal of the American College of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.10.010>
124. Tester, D. J., & Ackerman, M. J. (2018). Genetics of cardiac arrhythmias. In D. Mann, D. Zipes, P. Libby, & R. Bonow (Eds.), *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. (11th ed., pp. 605–618). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0398-6.00009-3>
125. Trantum-Jensen, J., Wilde, A. A., Vermeulen, J. T., & Janse, M. J. (1991). Morphology of electrophysiologically identified junctions between Purkinje fibers and ventricular muscle in rabbit and pig hearts. *Circulation Research*, 69(2), 429. <https://doi.org/10.1161/01.RES.69.2.429>
126. 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>
127. Villafañe, J., Fischbach, P., & Gebauer, R. (2014). Short QT syndrome manifesting with neonatal atrial fibrillation and bradycardia. *Cardiology (Switzerland)*, 128(3), 236–240. <https://doi.org/10.1159/000360758>
128. Volders, P. G. A., Vos, M. A., Szabo, B., Sipido, K. R., De Groot, S. H. M., Gorgels,

- A. P. M., ... Lazzara, R. (2000). Progress in the understanding of cardiac early afterdepolarizations and torsades de pointes: Time to revise current concepts. *Cardiovascular Research*, *46*(3), 376–392. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00022-5)
129. Watanabe, H., Yang, T., Stroud, D. M., Lowe, J. S., Harris, L., Atack, T. C., ... Roden, D. M. (2011). Striking In Vivo Phenotype of a Disease-Associated Human SCN5A Mutation Producing Minimal Changes in Vitro. *Circulation*, *124*(9), 1001–1011. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.987248>
130. 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>
131. Webster, G., & Berul, C. I. (2013). An update on channelopathies: From mechanisms to management. *Circulation*, *127*(1), 126–140. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060343>
132. Wemhöner, K., Friedrich, C., Stallmeyer, B., Coffey, A. J., Grace, A., Zumhagen, S., ... Decher, N. (2015). Gain-of-function mutations in the calcium channel CACNA1C (Cav1.2) cause non-syndromic long-QT but not Timothy syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *80*, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.002>
133. Wenger, A. M., Guturu, H., Bernstein, J. A., & Bejerano, G. (2017). Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: Implications for providers. *Genetics in Medicine*, *19*(2), 209–214. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.88>
134. West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). A cluster of Hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(22), 10910–10914. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10910>
135. Wilde, A. A. M., & Brugada, R. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circulation Research*, *108*(7), 884–897. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238469>
136. Williams, V. S., Cresswell, C. J., Ruspi, G., Yang, T., Atak, T. C., McLoughlin, M., ... Armstrong, M. (2015). Multiplex ligation-dependent probe amplification copy number variant analysis in patients with acquired long QT syndrome. *Europace*, *17*(4), 635–641. <https://doi.org/10.1093/europace/euu288>
137. Yagihara, N., Watanabe, H., Barnett, P., Duboscq-Bidot, L., Thomas, A. C., Yang, P., ... Makita, N. (2016). Variants in the SCN5A Promoter Associated With Various

- Arrhythmia Phenotypes. *Journal of the American Heart Association*, 5(9), 1–10.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003644>
138. Yang, G., Liu, J., Wang, Y., Du, Y., Ma, A., & Wang, T. (2019). Lack of influence of sex hormones on Brugada syndrome-associated mutant Nav1.5 sodium channel. *Journal of Electrocardiology*, 52, 82–87.
<https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2018.11.011>
139. Yang, H., Peng, T., Li, J., Wang, Y., Zhang, W., Zhang, P., ... Liu, B. (2016). Treatment of colon cancer with oncolytic herpes simplex virus in preclinical models. In *Gene therapy* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1038/gt.2016.15>
140. Zafari, Z., Dalili, M., Zeinali, S., Saber, S., Fazeli Far, A. F., & Akbari, M. T. (2017). Identification and characterization of a novel recessive KCNQ1 mutation associated with Romano-Ward Long-QT syndrome in two Iranian families. *Journal of Electrocardiology*, 50(6), 912–918. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2017.07.012>

XII. Anexos

Anexo 1 – Consentimiento informado con aprobación del comité de ética

APROBADO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez

Protocolo 18-1053
Estatus Aprobado
Fecha 22-Mayo-2018

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Invitación a participar y descripción del proyecto

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

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

Objetivos del estudio

El propósito es identificar las mutaciones en los genes descritos como causales de Cardiomiopatías y Canalopatías de tipo Genético, mediante secuenciación de segunda generación, en pacientes mexicanos diagnosticados con Cardiomiopatía Dilatada, Hipertrofica o Canalopatías de origen familiar o idiopática 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 coleccionará 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 el Dr. Enrique López Mora, médico asistente del Instituto Nacional de Cardiología y participante del proyecto tendrá la información que permita asociar este código con su nombre y sus datos personales.

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

México, Distrito Federal, a _____

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

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

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

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

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

APROBADO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez

Protocolo 18-1053
Estatus Aprobado
Fecha 22-Mayo-2018

Nombre _____ Fecha _____

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

Nombre y firma del padre o tutor _____

Nombre y firma de la madre o tutora _____

Nombre y firma investigador _____

Anexo 2 – Hoja de recolección de datos.

ESTUDIO GENÉTICO DE CANADORITIAS ARRITMOSICAS
HOJA DE DATOS

Fecha de entrevista (año, mes, día) _____
 Fecha de toma de muestra (año, mes, día) _____

DATOS GENERALES

1. Nombre Completo (Apellido paterno, apellido materno, nombres) _____

2. Clave BMGGEN _____

3. Clave familia _____

4. Institución de Proveniencia _____
 1. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
 2. ISSSTE
 3. IMSS
 4. Otra Institución (especificar) _____
 5. Consulta privada

5. Médico que refiere al paciente _____

6. Teléfono contacto paciente, email _____

7. Teléfono del médico que refiere al paciente
 Celular: _____
 Consultorio: _____
 Otro: _____

8. Registro _____

9. Sexo _____
 1. Mujer _____
 2. Hombre _____

10. Edad (años) _____

11. Fecha de nacimiento (año, mes, día) _____

12. Nacionalidad _____

13. Origen Etnico _____
 1. Mestizo Mexicano
 2. Mestizo Latinoamericano (especificar) _____
 3. Indígena (especificar) _____
 4. Caucásico (especificar) _____
 5. Asiático (especificar) _____
 6. Otro (especificar) _____

14. Lugar de Nacimiento (Ciudad o localidad, Estado, País en caso de no ser México) _____

15. Lugar de Nacimiento del Padre (Ciudad o localidad, Estado, País en caso de no ser México) _____

AFILIACIONES HEREDIFAMILIARES

23. Historia familiar de Canadurias Arritmicas
 0. No
 1. Madre
 2. Padre
 3. Hermano(s) (especificar número) _____
 4. Hija(s) (especificar número) _____
 5. Abuelo(s)
 6. Tío(s) (especificar número) _____
 7. Hermano(s) hermano(s) (especificar número) _____
 8. Primos(a) (especificar número) _____
 9. Otro (especificar) _____

24. Historia familiar de MS sin ser grado
 0. No
 1. Madre
 2. Padre
 3. Hermano(s) (especificar número) _____
 4. Hija(s) (especificar número) _____
 5. Abuelo(s)
 6. Tío(s) (especificar número) _____
 7. Primos(a) (especificar número) _____
 8. Primos(a) segundo(s) (especificar número) _____
 9. Otro (especificar) _____

25. Historia de muerte fetal sin explicación
 0. No
 1. Sí

SINTOMATOLOGÍA

26. Palpitaciones _____
 0. No
 1. Sí

27. Síncopa _____
 0. No
 1. Sí

28. Fecha de último síncope (año, mes, día) _____

29. Ingesta salina recuperada _____
 0. No
 1. Sí

30. Fecha en la que sintoma volvió recuperada (año, mes, día) _____

31. Condiciones en las que ocurrió síncope o MSA _____
 1. Durante el ejercicio
 2. Durante el reposo
 3. Durante el baño
 4. Sin respuesta a estímulo auditivo intenso y repetitivo
 5. Otro (especificar) _____

32. Síndrome Congénito _____
 0. No
 1. Sí

33. Convulsiones febriles _____
 0. No
 1. Sí

16. Lugar de Nacimiento de la madre (Ciudad o localidad, Estado, País en caso de no ser México) _____

17. Necesidad actual (Dieta o localización, Estado, País en caso de no ser México) _____

18. Caso _____
 0. Índice
 1. Madre
 2. Padre
 3. Hermano(s)
 4. Hija(s)
 5. Abuelo(s)
 6. Tío(s)
 7. Primos(a) hermano(s)
 8. Primos(a) segundo(s)
 9. Otro (especificar) _____

19. Diagnóstico Definitivo _____
 1. Síndrome de QT largo
 2. Difusión del resto sinusal
 3. Síndrome de Brugada
 4. Trastorno de conducción Postura Catecolárgica
 5. Síndrome de QT corto
 6. Displasia Arritmogénica del Ventriculo Derecho
 7. Otro (especificar) _____
 8. Sin diagnóstico definitivo

20. Sospecha Diagnóstica _____
 1. Síndrome de QT largo
 2. Difusión del resto sinusal
 3. Síndrome de Brugada
 4. Trastorno de conducción Postura Catecolárgica
 5. Síndrome de QT corto
 6. Displasia Arritmogénica del Ventriculo Derecho
 7. Otro (especificar) _____

21. Edad de inicio de sintomatología (años) _____

22. Edad al diagnóstico (años) _____

34. Fecha de convulsiones (año, mes, día) _____

35. Alucinaciones epilépticas _____
 0. No
 1. Sí

36. Epilepsia de Focal _____
 0. No
 1. Sí

37. Convulsión de Débil _____
 0. No
 1. Sí

38. Episodios de taponamiento _____
 0. No
 1. Sí

39. Fibrilación de Ombilicación _____
 0. No
 1. Sí

40. Otros datos clínicos relevantes _____

ELECTROCARDIOGRAMA EN REPOSO

41. Ritmo Sinusal _____
 0. No
 1. Sí

42. Frecuencia Cardíaca (bpm) _____

43. Intervalo P-R mayor (ms) _____

44. Intervalo P-R menor (ms) _____

45. Intervalo Q-T mayor (ms) _____

46. Intervalo Q-T menor (ms) _____

47. Intervalo QT mayor (ms) _____

48. Intervalo QT menor (ms) _____

49. Intervalo QT corregido (ms) _____

50. Intervalo QT corregido mayor (ms) _____

51. Alteraciones morfología de T en más de 3 derivaciones _____
 0. No
 1. Sí (especificar cuáles y en qué derivaciones) _____

52. Alteraciones morfología complejo QRS _____
 0. No
 1. Sí (especificar cuáles y en qué derivaciones) _____

53. Ritmo de rama derecha del Haz de His _____
 0. No
 1. Grado I
 2. Grado II
 3. Grado III

54. Ritmo de rama izquierda del Haz de His _____
 0. No

- 1. Grado I
 - 2. Grado II
 - 3. Grado III
35. Alteraciones inespecíficas de la repolarización
- 0. No
 - 1. Sí (especificar e indicar derivaciones)
-
36. Errores del punto J
- 0. No
 - 1. Sí (especificar derivaciones)
-
37. Errores del segmento ST
- 0. No
 - 1. STsm, STzm
 - 2. STsp (especificar derivaciones)
-
38. Presencia de onda U
- 0. No
 - 1. Sí (especificar derivaciones)
-
39. Fibras Brugada tipo I
- 0. No
 - 1. Sí (especificar derivaciones)
-
40. Fibras Brugada tipo II
- 0. No
 - 1. Sí (especificar derivaciones)
-
41. Fibras Brugada tipo III
- 0. No
 - 1. Sí (especificar derivaciones)
-
42. Bloques AV
- 0. No
 - 1. Grado I
 - 2. Grado II
 - 3. Grado III
-
43. Localización anatómica del bloqueo AV
- 0. En Ray bloque
 - 1. Supraventricular
 - 2. Intraventricular
 - 3. Intraventricular
-
44. Tipología del Bloqueo AV
- 0. No hay bloqueo
 - 1. Transitorio
 - 2. Permanente

85. Faltas de onda
- 0. No
 - 1. Sí
-
86. Edad de fibrilación
-
87. Fecha de diagnóstico
-
- HOLTER**
88. Frecuencia sinusal
- 0. No
 - 1. Sí
-
89. Arresto sinusal
- 0. No
 - 1. Sí
-
90. Duración
-
91. Frecuencia sinusal
- 0. No
 - 1. Sí
-
92. Fibrilación atrial con respuesta ventricular lenta
- 0. No
 - 1. Sí
-
93. Fibrilación atrial
- 0. No
 - 1. Sí
-
94. Flutter atrial
- 0. No
 - 1. Sí
-
95. Taquicardia atrial
- 0. No
 - 1. Sí
-
96. Taquicardia paroxística supraventricular
- 0. No
 - 1. Sí
-
97. Taquicardia ventricular
- 0. No
 - 1. Sí
-
98. Síndrome Taquicardia-Bloqueo documentado
- 0. No
 - 1. Sí
-
99. Ecocardiograma
- 0. No
 - 1. Sí
-
100. Normal
- 0. No
 - 1-20
-
- Acortado
-
101. Características
- 0. No
 - 1. Sí
-
102. Normal
- 0. No
 - 1. Sí

55. Poro aórtal
- 0. No
 - 1. Sí
-
56. Duración del paro sinusal (min)
-
- ARRITMIAS DOCUMENTADAS**
61. Taquicardia supraventricular (TSV) documentada
- 0. No
 - 1. Sí
-
62. FEP a TSV (año, mes, día)
-
63. Taquicardia ventricular documentada
- 0. No
 - 1. Sí
-
64. Fecha episodio ventricular (año, mes, día)
-
65. Flutter ventricular documentado
- 0. No
 - 1. Sí
-
66. Fecha flutter ventricular documentado (año, mes, día)
-
67. Fibrilación ventricular documentada
- 0. No
 - 1. Sí
-
68. Fecha fibrilación ventricular documentada (año, mes, día)
-
69. Taquicardia ventricular monofásica (TVM) documentada
- 0. No
 - 1. Sí
-
70. FEP a TVM (año, mes, día)
-
71. Taquicardia ventricular polifásica (TVF) documentada
- 0. No
 - 1. Sí
-
72. Fecha TVF (año, mes, día)
-
73. Taquicardia helicoidal documentada
- 0. No
 - 1. Sí
-
74. Fecha episodio helicoidal (año, mes, día)
-
75. Fibrilación ventricular documentada
- 0. No
 - 1. Sí
-
76. Fecha fibrilación ventricular (año, mes, día)
-
77. Síndrome Taquicardia-Bloqueo documentado
- 0. No
 - 1. Sí
-
78. Puntaje de Schram
-

103. Prueba de esfuerzo
- 0-10 minutos
 - 1-15 minutos
 - 2-20 minutos
-
104. Prueba Electrofisiológica
- 0- No realizada
 - 1- Positiva
 - 2- Negativa
-
- Fármaco utilizado
-
- Comentarios
-

Nombre	Categoría	Modelo de predicción	Datos para entrenamiento	Información usada	Niveles cualitativos	Umbral cualitativo	Descripción	Información extra
SIFT	B	Matriz de puntaje de posición específica	SWISS-PROT/TrEMBL, nsSNVs de E. coli gen Lacl, 750 deletéreos y 2,254 tolerantes	Homología de secuencia basada en PSI-BLAST	D(eleterious) T(olerated)	rankscore > 0.395	Calcula probabilidades bayesianas: p (mutación enfermedad)	Al usar PSI-BLAST, se puede hacer una predicción sobre el efecto de una mutación no anónima dentro de una proteína.
LRT	B	Prueba de razón de probabilidad de neutralidad de codones	Secuencias de codificación de 32 especies de vertebrados de Ensembl	Homología de secuencia	B(enign) D(amaging probably) P(ossibly damaging)	rankscore > 0.3528/0.4583 3 (binary, HDIV/HVAR)	Calcula las probabilidades como razón entre p (subst) en cada sitio para cada amino y p (must_freq_subst)	Predice el impacto potencial de una variante no anónima utilizando características físicas y comparativas.
MutationAssessor	B	Formalismo de entropía combinatoria	Secuencias homólogas de Uniprot identificadas por BLAST; SNV de la base de datos COSMIC	Homología de secuencias de familias de proteínas y subfamilias dentro y entre especies	-	-	Utiliza un bosque aleatorio para identificar posibles mutaciones sin sentido funcionales	Para determinar la probabilidad de que una mutación sin sentido perjudique la funcionalidad de una proteína.
FATHMM	B	Modelos ocultos de Markov	Secuencias homólogas de UniRef90, SUPERFAMILY y Pfam; SNV de HGMD y UniProt	Homología de secuencia	D(amaging) [T(olerated)]	rankscore > 0.82268	Nuestro puntaje de predicción de conjunto basado en máquina de vectores de soporte (SVM), que incorporó 10 puntajes (SIFT, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, GERP ++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy, PhyloP) y la frecuencia máxima observada en Las 1000 poblaciones de genomas.	Integrar nuevas puntuaciones de predicción perjudiciales de mutaciones sin sentido.
PROVEAN	B	Puntuación de alineación de datos	SNVs de UniProt/HUMSAVAR	Homología de secuencia	D(eleterious N(eutral) [U(nknown)]	No es posible, porque la predicción no está determinada únicamente por el puntaje	?	?
VEST3	Meta	Algoritmo de Forrest aleatorio	SNV de HGMD y el proyecto de secuenciación del exoma	86 características de secuencia	A(disease_causin g_automatic) D(disease_causin g) N(polymorphism)	rankscore > 0.31709 (D to N)	?	?
MetaSVM	Meta	Máquina de vector de soporte de núcleo radial	36,192 SNVs de Uniprot	Nueve puntajes de predicción y frecuencias alélicas en 1000G	{predicted functional} H(igh) M(edium) {predicted non-func} N(eutral) L(ow)	rankscore>0.9 41 H rankscore> 0.61456 M rankscore>0.2 6284 L else N	El protocolo computacional realiza el análisis de la siguiente manera: dado un nombre de proteína mutada y una posición de residuo mutado, busca homólogos de secuencia, construye una alineación de secuencia múltiple, agrupa secuencias en subfamilias y puntúa una mutación por patrones de conservación específicos globales y subfamiliares. Es probable que las mutaciones que afectan a cualquier tipo	Estime el impacto de la mutación usando la diferencia de la entropía causada por la mutación.

							de residuo conservado sean funcionales.	
MetaLR	Meta	Regresión logística	36,192 SNVs de UnPprot	Nueve puntajes de predicción y frecuencias alélicas en 1000G	D(amaging) T(olerated)	rankscore>0.8 1332	NA	Para predecir las consecuencias funcionales de los SNV en las variantes de codificación y no codificación a través de un servidor web.
M.CAP	Meta	Clasificador de árbol de aumento de gradiente	63,418 variantes patogénicas de HGMD y 3,268,665 variantes predominantemente benignas de ExAC	Anotaciones	D(amaging) N(eutral)	rankscore>0.5 43	Búsqueda de secuencias homólogas y con una relación distante, agruparlas, seleccionar conglomerados más relacionados, calcular una puntuación basada en el delta BLOSUM62, y hacer un promedio no sesgada de la misma.	?
POLYPHEN2	ML	Clasificador bayesiano ingenuo (ambos)	UniProtKB / UniRef100, PDB / DSSP, alineaciones UCSC de 45 genomas de vertebrados; 5,564 mutaciones de la enfermedad de Mendeliana y 7.539 SNV de divergencia de proteínas homólogas de mamíferos cercanos (HDIV), 22.196 SNV asociados a la enfermedad y 21.119 SNV comunes (HVAR)	Ocho características predictivas basadas en secuencia y tres basadas en estructura (ambas)	D(amaging) T(olerated)	rankscore>0.8 1113	Nuestro puntaje de predicción de conjunto basado en regresión logística (LR), que incorporó 10 puntajes (SIFT, PolyPhen-2 HDIV, PolyPhen-2 HVAR, GERP ++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy, PhyloP) y la frecuencia máxima observada en el 1000 poblaciones de genomas.	Integrar nueve puntuaciones de predicción perjudiciales de mutaciones sin sentido.
MutationTaster	ML	Clasificador bayesiano ingenuo	UniProt, genes homólogos en humanos y otras 10 especies, dbSNP, HapMap; SNV de 1000 G (1000 Genomes Project), HGMD	Conservación de la secuencia de ADN, predicción del sitio de empalme, predicción de estabilidad de ARNm, características de proteínas; características regulatorias	D(amaging) T(olerated)	SCORE>0.02 5	?	?
CADD	ML	Máquina de vectores de soporte de núcleo lineal	16.627.775 variantes "observadas" (Ensembl) y 49.407.057 variantes "simuladas"	63 anotaciones (949 características)	-	-	?	Para calificar todos los posibles 8,6 millones de sustituciones en el genoma de referencia humano de 1 a 99 en función de variantes funcionales conocidas y simuladas.
DANN	ML	Red neuronal	16.627.775 variantes "observadas" (Ensembl) y 49.407.057	63 anotaciones (949 características)	-	-	DANN es un puntaje de predicción funcional reentrenado basado en los datos de entrenamiento de	DANN es un puntaje de predicción funcional reentrenado basado en los datos de entrenamiento de CADD usando

			variantes "simuladas"				CADD usando una red neuronal profunda.	
fathmm-MKL coding	ML	Aprendizaje de Kernel múltiple	SNVs de HGMD y 1000G	Conservación, epigenética, señales	D(amaging) N(eutral)	-	?	?
GenoCanyon	ML	Aprendizaje estadístico no supervisado	Colección de las puntuaciones comparativas de conservación genómica y señales bioquímicas obtenidas del proyecto ENCODE	Conservación, anotaciones bioquímicas.	-	rankscore>0.2 8317	?	?
GERP++	Cons	Estimación de tasa evolutiva de máxima verosimilitud	Alineaciones de TBA de hg18 a otras 43 especies de vertebrados del explorador del genoma UCSC	Alineamientos múltiples y árbol filogenético.	-	-	?	?
phyloP7way vertebrate	Cons	Distribuciones del número de sustituciones basadas en el modelo filogenético oculto de Markov	Genomas de 33 mamíferos placentarios (unidos con 20p hasta 3.0); Genomas de siete vertebrados (3.0 y posteriores)	Alineamientos múltiples y árbol filogenético.	-	-	?	?
phyloP20way mammalian	Cons	Distribuciones del número de sustituciones basadas en el modelo filogenético oculto de Markov	Genomas de 33 mamíferos placentarios (unidos con 20p hasta 3.0); Genomas de siete vertebrados (3.0 y posteriores)	Alineamientos múltiples y árbol filogenético.	-	-	?	?
phastCons7way vertebrate	Cons	Modelo de Markov oculto filogenético de dos estados	Genoma de siete vertebrados	Alineamientos múltiples y árbol filogenético.	-	-	?	Un tipo de modelo estadístico que considera que tanto el proceso cambia de un sitio a otro
phastCons 20 way mammalian	Cons	Modelo de Markov oculto filogenético de dos estados	Genoma de 20 mamíferos	Alineamientos múltiples y árbol filogenético.	-	-	?	Un tipo de modelo estadístico que considera que tanto el proceso cambia de un sitio a otro
SiPhy 29way logOdds	Cons	Inferencia del patrón de sustitución de nucleótidos por sitio	Genoma de 29 mamíferos	Alineamientos múltiples	-	-	?	?

Anexo 3.- Programas de predicción *in silico* utilizados. Para las herramientas de predicción, la etiqueta "Categoría" es B para "método de predicción basado en biología", ML para "Método de predicción basado en aprendizaje automático", Meta para "Método de predicción meta" y Contras para "Herramienta de puntuación de conservación"

Anexo 4

Gel de agarosa 1.0%

Agarosa 0.30 g

TAE (Materiales de tampón de electroforesis TAE 10X 48.4 g de Tris base [tris (hidroximetil) aminometano], 11.4 mL de ácido acético glacial (17.4 M), 3.7 g de EDTA, sal disódica, agua desionizada) 30 ml

Se colocan en un matraz de 250ml la agarosa con el TAE sin mezclar, esto se pasa al microondas donde se calienta la mezcla por 60 segundos, se retira del microondas y se mezcla con movimientos circulares. Luego de que la mezcla este temperada se coloca el contenido del matraz en la cámara de electroforesis, se eliminan las burbujas y se deja secar por 20 minutos. Al estar ya solidificado el gel, se cubre con solución TAE totalmente.

Para realizar gel al 1.5% se utiliza el mismo proceso con 0.45g de agarosa.

Anexo 5.- Estrategias de diagnóstico molecular utilizado en los casos índice.

PACIENTE	ION TORRENT	HALOPLEX	TruSight	EXOMA	MLPA
SQTL-1		1			
SQTL-2	1			1	
SQTL-3				1	1
SQTL-4		1	1	1	
SQTL-5	1	1			
SQTL-6	1				
SQTL-7		1	1		
SQTL-8			1		
SQTL-9		1	1		
SQTL-10			1		
SQTL-11		1	1		
SQTL-12		1			1
SQTL-13	1	1			
SQTL-14		1			
SQTL-15		1	1		
SQTL-16		1	1		1
SQTL-17			1		
SQTL-18		1	1		
SQTL-19		1	1		
SQTL-20			1		1
SQTL-21		1	1		1
SQTL-22			1		
SQTL-23			1		
SQTL-24	1	1	1		1
SQTL-25			1		
SQTL-26			1		
SQTL-27		1			
SQTL-28			1		
SQTL-29	1	1	1		
SQTL-30			1		
SQTL-31			1		
SQTL-32			1		
SQTL-33			1		1
SQTL-34			1		
SBr-1		1	1		1
SBr-2			1		
SBr-3	1	1			
SBr-4	1	1			
SBr-5			1		1
SBr-6		1			1
SBr-7	1	1	1		1
SBr-8		1			
SBr-9		1			
SBr-10			1		1
SBr-11			1		1
SBr-12			1		
SBr-13			1		
SBr-14			1		
DNS-1		1	1		1
DNS-2		1	1		1
DNS-3			1		
DNS-4			1		
DNS-5		1	1		
DNS-6			1		
DNS-7	1	1			
DNS-8		1	1		
DNS-9	1	1	1		1
DNS-10		1			
DNS-11		1			
DNS-12			1		
DNS-13			1		
TVPC-1		1	1		
TVPC-2		1	1		
TVPC-3	1	1			
TVPC-4	1		1		
TVPC-5		1			
PRKAG2-1	1		1		1
TVM-1			1		1
TVM-2			1		
SQTC-1		1			
FA-1	1		1		1
FA-2			1		