

MUERTE SÚBITA NATURAL INEXPLICADA: VALOR DE LA INVESTIGACIÓN GENÉTICA POST MORTEM

Olallo-Efrén Sánchez-Molero Núñez

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:
<http://hdl.handle.net/10803/666973>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL:
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR,
BIOMEDICINA Y SALUD

CENTRO DE GENÉTICA CARDIOVASCULAR

MUERTE SÚBITA NATURAL INEXPLICADA:
VALOR DE LA INVESTIGACIÓN GENÉTICA
POST MORTEM

Olallo-Efrén Sánchez-Molero Núñez

2017



Tesis Doctoral

**Muerte Súbita Natural Inexplicada:
Valor de la Investigación Genética Post Mortem**

Olallo-Efrén Sánchez-Molero Núñez

2017

Biología Molecular, Biomedicina y Salud.
Universitat de Girona

Dirigida por:

Dr. Oscar Campuzano Larrea
Dr. Ramon Brugada Terradellas

Memoria presentada para optar al título de doctor por la
Universidad de Girona

Universitat de Girona

El **Dr. Ramon Brugada Terradellas**, profesor titular de la facultad de medicina de la Universidad de Gerona, jefe del servicio de cardiología del Hospital Trueta y director del Centro de Genética Cardiovascular, UdG-IDIBGI; junto con el **Dr. Oscar Campuzano Larrea**, profesor lector de la Facultad de Medicina e investigador del Centro de Genética Cardiovascular declaran:

Que Olallo-Efrén Sánchez-Molero Núñez ha realizado bajo su dirección y supervisión el trabajo de investigación titulado: “**Muerte súbita natural inexplicada: Valoración genética post mortem**”, para la obtención del título de doctorado. Para que así conste, y tenga los efectos oportunos, firman este documento:



Dr. Ramon Brugada Terradellas



Dr. Oscar Campuzano Larrea



Olallo-Efrén Sánchez-Molero Núñez

Agradecimientos

Agradecimientos

Esta tesis doctoral está realizada gracias al apoyo y dedicación de sus directores Ramon Brugada y Óscar Campuzano. Gracias a la oportunidad que me brindaron, he tenido la posibilidad de realizar la tesis doctoral en el Centro de Genética Cardiovascular.

La tesis ha sido un proyecto largo, que me ha influido a nivel académico, profesional y personal. Ha sido una época complicada, larga y de sensaciones encontradas, pero con estas palabras quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado durante este proceso.

En primer lugar me gustaría agradecer a quienes fueron mis compañeros de departamento y laboratorio, ya que gracias a su ayuda personal y profesional hoy puedo estar presentando esta tesis. Gracias a Helena, por su paciencia durante el año del máster, a Mireia, Cristina, Mónica, Mel-lina, Anna (Petita) y Anna (Superpetita), por su ayuda, consejos y el buen ambiente que crearon en el laboratorio. También me gustaría dar un especial agradecimiento al trío compuesto por los dos bioinformáticos, Txus y Bernat, que junto al especialista en múridos transgénicos, Javi, que tan buenos momentos aportaron tanto dentro como fuera del laboratorio. También me gustaría agradecer al equipo técnico formado por Irene, Alexandra y Ferran, ya que su experiencia y dedicación hace posible que todos los proyectos salgan adelante. En general a todos los compañeros que han pasado o están en el Centro de Genética Cardiovascular, Pedro, Sara, Marcel, Catarina, Anna, Guillermo y Fabiana, ya que son un gran ejemplo para todos.

En segundo lugar me gustaría agradecer a todo el resto de personas que me ha acompañado, aguantado y apoyado durante todo este trayecto. A mis amigos: Rubén, Carla, Adrià, Arnau, y Pau ya que no importa los años que pasen ya que siempre

están y estarán. Por otro lado a Clara por ser mi apoyo en los mejores y los peores momentos, escuchándome días y noches durante años sobre todos los problemas, expectativas e ilusiones, y siendo parte responsable de que continuase este proyecto hasta el final.

Especialmente quiero dar las gracias por todo a mi familia y mis padres, ya que ellos siempre han intentado entender todo lo que he ido realizando, desde realizar la carrera de biología, hasta enzarzarme con el proyecto de una tesis doctoral. Gracias a ellos ya que son los que más se han sacrificado, esforzado e insistido para que realizase y terminase el proyecto. Gracias al apoyo de todos los que han tenido que ver de una manera directa o indirecta hoy estoy en la disposición de presentar esta tesis doctoral.

Índices, Glosario & Resumen

Índice general

I. Introducción	1
1 Genómica.....	3
1.1 Genoma humano.....	4
1.2 Proyecto Genoma Humano	5
1.3 Secuenciación masiva.....	6
1.3.1 Secuenciador 454-Roche	9
1.3.2 Secuenciador SOLID-Applied Biosystem.....	9
1.3.3 Secuenciador Illumina-BioSystems.....	9
1.3.4 Secuenciadores de tercera generación.....	10
1.4 Secuenciación masiva en el diagnóstico genético	11
1.5 Variantes genéticas	12
1.6 Clasificación de las variantes genéticas	15
1.6.1 Evaluación de la patogenicidad de las variantes raras.....	17
1.7 Clasificación de los trastornos genéticos	18
1.7.1 Trastornos cromosómicos.....	19
1.7.2 Trastornos genéticos multifactoriales.....	19
1.7.3 Trastornos monogénicos	20
2 Muerte súbita	22
2.1 Muerte súbita.....	22
2.2 Epidemiología de la muerte súbita cardíaca (MSC).....	26
2.3 Trastornos asociados a MSC en los jóvenes.....	26
2.4 Trastornos eléctricos primarios y el potencial cardíaco.....	29
2.4.1 Síndrome del QT largo (SQTL).....	32
2.4.2 Síndrome del QT corto (SQTC)	33
2.4.3 Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC)	33
2.4.4 Síndrome de Brugada (SBr)	34

2.5	Miocardopatías	37
2.5.1	Miocardopatía hipertrófica (MCH)	37
2.5.2	Miocardopatía dilatada (MCD)	38
2.5.3	Miocardopatía arritmogénica (MA)	40
II.	Hipótesis y objetivos.....	43
1	Planteamiento, hipótesis y objetivos.....	45
III.	Material y Métodos	47
1	Material y métodos	49
1.1	Selección de la cohorte y criterios de inclusión.....	49
1.2	Extracción, cuantificación y calidad del ADN	50
1.3	Secuenciación directa mediante el método Sanger	52
1.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa y purificación	52
1.3.2	Secuenciación	53
1.3.3	Análisis de la secuencias Sanger	54
1.4	Secuenciación masiva	54
1.4.1	Panel genético personalizado	59
1.4.2	Estudio Bioinformático	60
1.5	Interpretación de los resultados.....	61
1.6	Análisis de la patogenicidad	61
IV.	Resultados	63
1	Análisis de la cohorte	65
1.1	Prevalencia de la muerte natural	65
1.2	Contexto en el que tuvieron lugar los casos de muerte natural.....	66
1.2.1	Autopsia macroscópica	68
1.2.2	Autopsia macroscópica positiva.....	68
1.2.3	Autopsia macroscópica negativa. Análisis microscópicos	68
1.2.4	Muerte natural conforme al contexto y la autopsia final	69
1.2.5	Distribución de los casos por rangos de edad.....	71

2	Autopsia molecular: Análisis genéticos.....	74
2.1	Análisis genético del subgrupo de miocardiopatías	74
2.2	Análisis genético del subgrupo de muerte súbita inexplicada	76
V.	Discusión	81
1	Caracterización de la población.....	83
2	Estudio genético.....	86
3	Solapamiento entre genes y autopsia.....	88
4	Limitaciones	89
VI.	Conclusiones.....	91
VII.	Bibliografía	95
VIII.	Anexos	105

Índice de tablas

Tabla 1	8
Tabla 2	53
Tabla 3	57
Tabla 4	59
Tabla 5	60
Tabla 6	107
Tabla 7	115
Tabla 8	118

Índice de figuras

Figura 1	7
Figura 2	27
Figura 3	28
Figura 4	31

Figura 5	36
Figura 6	38
Figura 7	39
Figura 8	41
Figura 9.	42
Figura 10	56
Figura 11	66
Figura 12	67
Figura 13	70
Figura 14	70
Figura 15	73
Figura 16	73
Figura 14	75
Figura 15	75
Figura 16	77
Figura 17	77
Figura 21	90

Glosario de abreviaciones

μl	Microlitro
A	Adenina
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
C	Citosina
Ca²⁺	Iones Calcio
CNV	Copy Number Variants
dbSNP	The Single Nucleotide Polymorphism Database
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
dsDNA	Double Stranded DNA
ECG	Electrocardiograma
ESP	Exome Sequencing Project
EVS	Exome Variant Server
ExAC	The Exome Aggregation Consortium
G	Guanina
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HGMD	Human Genetics Mutation Database
IML	Instituto de Medicina Legal
K⁺	Iones Potasio
Kb	Kilobase
MA	Miocardiopatía Arritmogénica
MAF	Minor Allele Frequency
MCD	Miocardiopatía Dilatada
MCH	Miocardiopatía Hipertrófica

MS	Muerte súbita
MSC	Muerte Súbita Cardíaca
MSI	Muerte Súbita Inexplicada
Na⁺	Iones Sodio
PA	Potencial de Acción
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPH2	Polyphen 2
Rpm	Revoluciones por minuto
SBr	Síndrome de Brugada
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
SQTC	Síndrome del QT Corto
SQTL	Síndrome del QT Largo
SUDEP	Sudden Unexpected Death in Epilepsy
T	Timina
TVPC	Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica
TTN	Titina
VP	Variante Patogénica
VPB	Variante Posiblemente Benigna
VPP	Variante Posiblemente Patogénica
VSI	Variante de Significado Incierto

Resumen

La muerte natural define la muerte principalmente atribuida a una enfermedad o a un malfuncionamiento interno corporal, y que no está influenciada directamente por fuerzas o agentes externos. La mayoría de las causas se pueden identificar directamente con el análisis forense macroscópico. No obstante cuando la causa macroscópica no es evidente, la identificación final de la causa puede llegar a ser laboriosa y complicada. Cuando después de una autopsia completa los hallazgos son inespecíficos, tanto a nivel macroscópico, microscópico como toxicológico, estos casos son clasificados como muertes súbitas inexplicadas (MSI). La MSI puede ser la primera manifestación de una enfermedad cardíaca hereditaria. Actualmente la tecnología genética existente es capaz de revelar la etiología de este tipo de enfermedades así como identificar los familiares en riesgo.

El principal objetivo de este estudio ha sido identificar la incidencia de las diferentes etiologías de muerte natural, en casos menores de 50 años de edad, así como investigar los defectos genéticos que pudieran estar asociados con la muerte súbita cardíaca en los casos inexplicados. Para la realización del estudio se ha utilizado una cohorte de 789 casos (77.2% hombres) menores de 50 años de edad (con una media de 38.6 ± 12.2 años) que murieron de una forma súbita no violenta. Las autopsias fueron realizadas acorde a las guías forenses actuales. La autopsia identificó la causa de la muerte en la mayoría de casos (81.1%), siendo principalmente debida a alteraciones cardíacas (56.9%). Se realizaron estudios genéticos de los principales genes asociados con la muerte súbita cardíaca en dos cohortes diferenciadas. La primera cohorte se analizó por secuenciación masiva y comprendió 32 muestras de miocardiopatías (87.5% hombres) con una media de edad de 37.69 ± 11.26 años. Por otro lado la segunda cohorte comprendió 119 casos inexplicados (68% hombres) con una media de 28.29 ± 17.4 años, 95 analizadas

mediante secuenciación masiva y 24 mediante el método Sanger. Los resultados genéticos de las dos cohortes estudiadas mostraron resultados similares, ya que entre el 47% y el 41% de los casos respectivamente fueron portadores de variantes potencialmente patogénicas.

Estos resultados nos hacen llegar a la conclusión que la principal causa de muerte natural es la debida a causas cardíacas, siendo el síndrome coronario la causa más importante después de los 40 años de edad. También podemos llegar a la conclusión de que un gran porcentaje de los casos que quedan sin una causa de muerte concluyente tras la autopsia completa, ocurren en los menores de 30 años de edad. Por otra parte los estudios genéticos realizados han demostrado que pueden ayudar a esclarecer las causas de la muerte en los aquellos casos inexplicados así como identificar las posibles causas genéticas en los casos con algún tipo de alteración estructural. El estudio demuestra por lo tanto que la identificación de este tipo de alteraciones genéticas puede ayudar a identificar la etiología y por lo tanto la causa subyacente en este tipo de muertes. Finalmente la identificación de variantes genéticas en la autopsia molecular pone en relevancia la importancia del asesoramiento genético y la adopción de medidas preventivas en los familiares en riesgo.

Resum

La mort natural defineix la mort principalment atribuïda a una malaltia o a un mal funcionament corporal intern, i que no està influenciada directament per forces o agents externs. La majoria de les causes es poden identificar directament amb l'anàlisi forense macroscòpic. Tanmateix quan la causa macroscòpica no és evident, la identificació final d'aquesta causa pot arribar a ser laboriosa i complicada. Si les troballes després d'una autòpsia completa són inespecífiques, tant a escala macroscòpica, microscòpic com toxicològic, els casos són classificats com a morts sobtades inexplicades (MSI). La MSI pot ser la primera manifestació d'una malaltia cardíaca heretable sense identificar. Actualment la tecnologia genètica existent és capaç de revelar l'etiologia d'aquest tipus de malalties així com identificar els familiars en risc.

El principal objectiu d'aquest estudi ha estat identificar la incidència de les diferents etiologies de la mort natural, en casos menors de 50 anys, així com investigar els defectes genètics que puguin estar associats amb la mort sobtada cardíaca en els casos inexplicats. Per a la realització de l'estudi s'ha utilitzat una cohort de 789 casos (77.2%) menors de 50 anys (amb una mitjana de 38.6 ± 12.2 anys) que van morir d'una manera sobtada no violenta. Les autòpsies van ser realitzades d'acord amb les guies forenses actuals. L'autòpsia va identificar la causa de la mort en la majoria dels casos, (81.1%), sent principalment deguda a alteracions cardíques (56.9%). Es van realitzar estudis genètics dels principals gens associats amb la mort sobtada cardíaca mitjançant seqüenciació massiva en dues cohorts diferenciades. La primera cohort es va analitzar completament per seqüenciació massiva i va comprendre 32 mostres de miocardiopaties (87.5% homes) amb una mitjana de edat de 37.69 ± 11.26 anys. Per un altre banda la segona cohort va comprendre 119 cassos inexplicats (68% homes) amb una mitjana de edat de 28.29 ± 17.4 anys, 95 analitzades mitjançant seqüenciació

massiva i 24 mitjançant el mètode Sanger. Els resultats genètics de les dues cohorts estudiades van mostrar resultats similars, ja que entre el 47% i el 41% dels casos respectivament van ser portadors de variants potencialment patogèniques.

Aquests resultats ens fan arribar a la conclusió que la principal causa de mort natural és la deguda a causes cardíaques, sent la síndrome coronària la causa més important després dels 40 anys d'edat. També podem arribar a la conclusió que un gran percentatge dels casos que queden sense una causa de mort concloent després d'una autòpsia completa, succeeixen als menors de 30 anys d'edat. D'altra banda els estudis genètics realitzats han demostrat que poden ajudar a aclarir les causes de la mort en aquells casos inexplicats així com identificar les possibles causes genètiques en els casos amb algun tipus d'alteració estructural. L'estudi demostra per tant que la identificació d'aquest tipus d'alteracions genètiques pot ajudar a identificar l'etiologia i per tant la causa subjacent en aquest tipus de morts. Finalment la identificació de variants genètiques a l'autòpsia molecular posa en rellevància la importància de l'assessorament genètic i l'adopció de mesures preventives en els familiars en risc.

Abstract

Natural death defines the death primarily attributed to an illness or an internal malfunction of the body, and not directly influenced by external forces. Most causes can be identified directly with macroscopic forensic analysis. However, when a macroscopic cause is not evident, the final identification of causality can become tedious and complicated. Despite comprehensive macroscopic, microscopic as well as toxicological, the cases are classified as sudden unexplained deaths (SUD). SUD may be the first manifestation of an unknown inherited cardiac disease. Currently the genetic existent technology is able to identify the etiology of such diseases and to identify family members at risk.

The main objective of this study was to identify the incidence and the different natural death etiologies, in cases less than 50 years old, as well to investigate whether genetic defects associated with cardiac death in unexplained cases. For the realization of this study has been used a cohort of 789 cases (77.2%) less than 50 years old (average 38.6 ± 12.2 years old) who died suddenly from non-violent causes. Comprehensive autopsies were performed according to current forensic guidelines. During autopsy a cause of death was identified in most cases (81.1%), mainly due to cardiac alterations (56.9%). Genetic studies of the major genes associated with sudden cardiac death were analyzed in two different cohorts. The first cohort was completely analysed by massive sequencing and comprised 32 cardiomyopathy samples (87.5% males) with an average age of 37.69 ± 11.26 years. On the other hand, the second cohort comprised 119 unexplained cases (68% men) with an average age of 28.29 ± 17.4 years, 95 analyzed by massive sequencing and 24 by Sanger method. The two cohorts genetic studies showed similar results, between 47% and 41% of cases respectively were carriers of potentially pathogenic variants.

These results lead us to the conclusion that cardiac diseases are the most important cause of death, being coronary artery disease the main cause after 40 years of age. Also, we can reach to the conclusion that a great percentage of cases unexplained after a complete autopsy, occur in those under 30 years of age, Moreover, genetic studies have proved that may help to provide an explanation for the cause of death in unexplained cases as well as to identify potential genetic causes in cases with some type of structural alteration. This study therefore demonstrates that identification of such genetic alterations may help to identify the etiology and also the underlying cause in such deaths. Finally identification of genetic variations enables genetic counselling and undertaking of preventive measures in relatives at risk.

I. Introducción

1 Genómica

El avance tecnológico de las diferentes herramientas para el análisis genético ha proporcionado tanto a la investigación básica como a la clínica, poderosas herramientas capaces de proporcionar perfiles genéticos de cualquier organismo, como el de los seres humanos, para poder ser estudiados. El conjunto de estas ciencias y técnicas dedicadas al estudio del funcionamiento, contenido, evolución y origen de los genomas y sus genes, se denomina genómica. La genómica incorpora conocimientos de diversas ciencias como la propia genética, la biología molecular, química, informática, física y estadística entre otras, para realizar el estudio de la información genética y los mecanismos que la regulan. Hasta no hace muchos años con las tecnologías de secuenciación disponibles únicamente se podía estudiar la estructura y función de genes individuales, pero actualmente gracias a las diferentes aproximaciones que ofrecen las nuevas tecnologías de secuenciación se puede estudiar grandes conjuntos de genes de un organismo, así como las interacciones que se establecen entre estos. Desde el 2011 la visión de la genómica se ha organizado en diferentes campos que se extienden desde la investigación básica hasta las aplicaciones en el campo médico. Estos campos se pueden englobar principalmente en tres áreas, la estructural, la funcional y la comparativa. La primera caracteriza la naturaleza física de los genomas, posicionando regiones funcionales como los genes respecto a distancias medidas en número de pares de bases, kilobases (kb) o megabases (mb); realizando de esta manera un mapa genético con la localización. La genómica funcional es la encargada de estudiar la función biológica de los genes, su regulación y sus productos, para establecer las relaciones entre diferentes grupos de genes involucrados en procesos fisiológicos concretos. Finalmente la genómica comparativa, compara secuencias de genes para establecer las relaciones funcionales y evolutivas que puedan tener. El sustancial progreso en este campo ha revelado la enorme complejidad de la biología que envuelve el genoma, pero la continua

adquisición de información que se está llevando a cabo en los diferentes estudios está proporcionando herramientas a los investigadores para la interpretación del genoma.

1.1 Genoma humano

Un genoma es el conjunto de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) que caracterizan a un organismo. Por lo tanto el genoma humano es el conjunto completo de información hereditaria que caracteriza a la especie humana (*Homo sapiens sapiens*). En su nivel más elemental el ADN está formado por dos moléculas con estructura de doble hélice y a su vez éstas por nucleótidos con cuatro tipos de bases nitrogenadas: adenina (A), Timina (T), citosina (C) y guanina (G). Estas moléculas forman 23 secuencias lineales continuas (ADN nuclear) y una secuencia circular (ADN mitocondrial), empaquetadas en forma de cromosomas. El genoma nuclear de un individuo contiene 23 pares de cromosomas, 22 homólogos (autosomas) y el par sexual. Los cromosomas homólogos están heredados uno de cada progenitor y llevan la misma carga de información genética. El tamaño de ambos genomas es muy diferente, mientras que el genoma nuclear tiene un tamaño de 3.200 millones de pares de bases (3.2Gb), el mitocondrial apenas tiene un tamaño aproximado de 16.500 pb.

Por otra parte la información genética está codificada en lo que define como “unidades básicas, físicas y funcionales de herencia” a las que denominamos genes ¹. La definición de gen tiene un cierto grado de ambigüedad ya que puede englobar múltiples significados y debido a esto no es un concepto “estático”, sino que está en continua discusión. Actualmente se estima que existen aproximadamente entre 19000 y 20000 genes codificantes para proteínas ^{2, 3}.

Los genes están localizados en regiones concretas del cromosoma, a estas regiones se las denomina “locus” o “loci” en singular o plural respectivamente. Debido a que somos organismos diploides y por lo tanto tenemos dos juegos de cromosomas,

la secuencia de los genes puede ser idéntica o diferir ligeramente. A estas formas alternativas que puede presentar un gen en un locus determinado, se las denomina “alelos”. Por lo tanto cada uno de los alelos proviene de un progenitor, y se ubican en el mismo locus. Cuando un individuo presenta dos alelos iguales para aquella región, se lo denominará homocigoto; mientras que si difieren en su secuencia se lo denominará heterocigoto. De esta manera se puede resumir que la combinación de las distintas formas alternativas en la secuencia de los diferentes alelos determinan las características de los individuos ^{4,5}.

1.2 Proyecto Genoma Humano

En 1986 el Departamento de Energía y los Institutos Nacionales de salud de los Estados Unidos lideran la “Iniciativa del Genoma Humano”, un consorcio público internacional formado por Estados Unidos, Reino Unido, Japón, Francia, Alemania, China y otros países con el objetivo de conseguir la secuencia del genoma humano para el año 2005. Oficialmente el proyecto comienza en octubre de 1990 con el desarrollo de diferentes herramientas para su secuenciación.

El proyecto se basa en las técnicas de construcción de mapas genéticos de ligamiento y mapas físicos de todo el genoma humano. Los mapas genéticos describen la organización cromosómica de caracteres o de marcadores genéticos, mediante estudios de ligamiento genético. Los mapas físicos en cambio reconstruyen la estructura de un segmento de ADN determinando los tipos y orden relativo de las distintas secuencias que lo componen, sus tamaños y las distancias entre ellas.

En 1998 se obtiene un total de 180 Mb de secuencia de genoma humano (6% del total). También se logra obtener 111Mb de secuencia de otros organismos y se completa la secuencia de *E. coli* y de *S. cerevisiae*, siendo este último el primer organismo eucariota en ser secuenciado completamente. En ese mismo año entra en escena la empresa privada “Celera genomics” proponiendo acabar la secuenciación

del genoma humano en un tiempo record gracias una estrategia de secuenciación alternativa, llamada “shotgun” o secuenciación aleatoria. La técnica se basa en la fragmentación del ADN en tamaños que abarcan entre las 2Kb y las 200Kb, para después secuenciarlos y mediante herramientas informáticas encontrar los fragmentos que se solapan y de esta manera poder reconstruir toda la secuencia del genoma.

La competición entre estas dos entidades finaliza en el año 2000 con los dos primeros borradores de la secuencia completa del genoma humano. En el año 2001 ambos mapas son publicados en las revistas *Nature* (el mapa del consorcio internacional) y *Science* (el mapa de Celera Genomics). La versión definitiva de la secuencia completa del genoma humano del Consorcio internacional se publica en el año 2004.

El proyecto permite a los investigadores comenzar a entender como está organizada molecularmente la información hereditaria del ser humano. También abre nuevos frentes de investigación que estudian la función, regulación y productos de expresión del genoma permiten que diferentes campos como la biotecnología o la biomedicina desarrollen nuevas herramientas como las que interpretan los mecanismos de patologías y sus dianas terapéuticas ^{6,7}.

1.3 Secuenciación masiva

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, también llamadas de segunda generación o “*Next Generation Sequencing*” (NGS), se establecen como una alternativa real a un coste asequible en el año 2005. Hasta la fecha la tecnología Sanger había dominado el mercado durante al menos dos décadas, pero la irrupción de estas nuevas tecnologías de secuenciación ha provocado una auténtica revolución en la investigación biológica. La evolución de este tipo de secuenciadores aumenta en precisión y rendimiento año a año, así como el abaratamiento del coste por base

secuenciada **[Figura 1]**. La consecuencia es que se han establecido como una alternativa real a la secuenciación tradicional mediante Sanger.

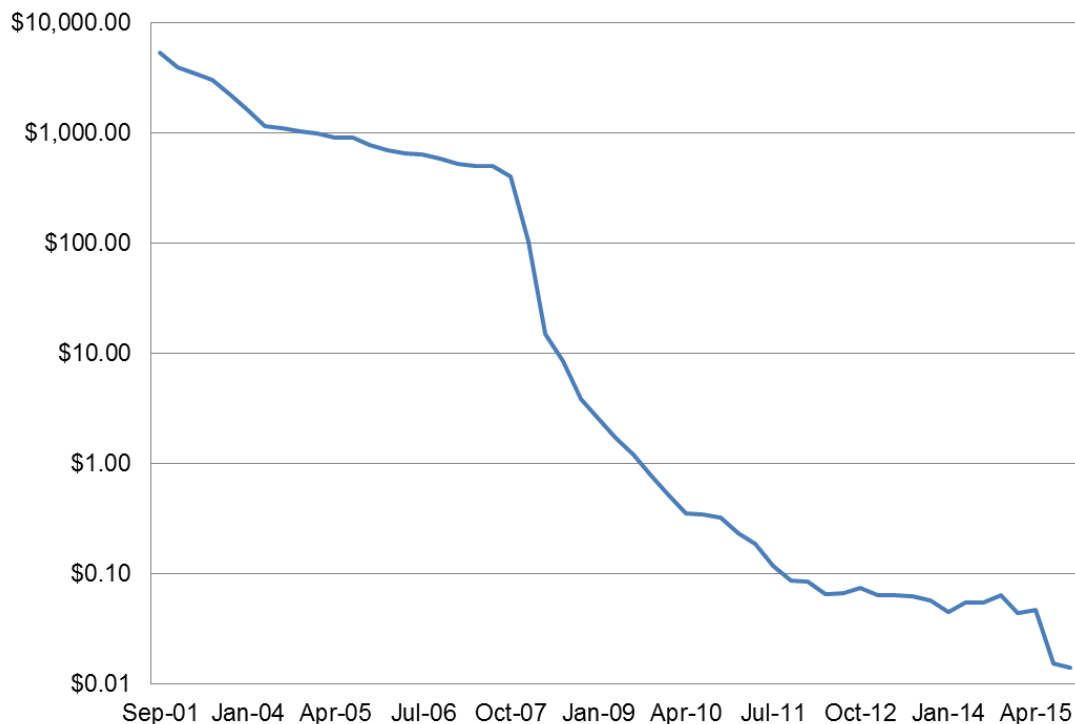


Figura 1. Representación gráfica de la evolución del coste de la secuenciación por cada Megabase de ADN durante la primera quincena del s.XXI. Como se puede observar a partir del año de la finalización del proyecto del genoma humano y con el desarrollo y comercialización de las nuevas tecnologías, se ha producido una depreciación en el coste de la secuenciación. Actualmente el valor de la Mb secuenciada vale aproximadamente un céntimo de dólar. National Human Genome Research Institute, 2015 ⁴.

Actualmente estas tecnologías están proporcionando y desarrollando continuamente diferentes tipos de herramientas para realizar diferentes tipos de estudios como los de genomas completos, la resecuenciación dirigida a zonas concretas del genoma, la secuenciación del transcriptoma completo (RNA-Seq), estudios de interacción proteína-ADN (Chip-seq) o estudios epigenéticos entre otros.

A diferencia de la secuenciación tradicional por Sanger, las plataformas de secuenciación masiva utilizan la fragmentación del ADN como principal característica

para su secuenciación. De esta manera gracias a la obtención de miles o millones de fragmentos en un único proceso se ha hecho posible el desarrollo de proyectos de secuenciación a corto plazo. Las principales plataformas de secuenciación masiva comparten las siguientes características:

- Fragmentación del ADN al azar y unión de adaptadores específicos en sus extremos.
- Amplificación de la librería en una fase sólida que se realiza gracias a la unión de estos adaptadores a las bases complementarias de la placa de secuenciación o microesferas.
- La secuenciación ocurre en paralelo y de forma masiva en todas las moléculas del ADN obteniendo de esta manera mediante fluorescencia lecturas cortas.
- Secuenciación tipo “*paired-end*”, mediante la cual se pueden leer los extremos del mismo fragmento de ADN. Gracias a esto durante el análisis bioinformático se facilita el posicionamiento de aquellas secuencias que pueden mapear en otros lugares del genoma además de que facilita la detección de variantes estructurales ⁸.

Actualmente son tres las tecnologías más utilizadas por la comunidad científica:

Tabla 1 Comparativa entre las plataformas de secuenciación masiva más utilizadas.

Plataforma	Técnica	Lecturas (nt)	Tiempo	Ventajas	Inconvenientes
Roche 454	Pirosecuenciación PCR en emulsión	400-700	10-20h	Gran longitud de lecturas, Secuenciación Rápida	Errores en zonas homopolímeras y hacia el final de la lectura
Illumina	ADN polimerasa Amplificación en fase sólida	100-150	8-12 días	Mantener a 4°C	Errores en zonas ricas en GC y hacia el final de las lecturas
SOLID	ADN ligasa PCR en emulsión	100-200	1-11 días	Mantener a 4°C	Errores en zonas ricas en GC y hacia el final de las lecturas

1.3.1 Secuenciador 454-Roche

Esta plataforma fue la primera en lanzarse al mercado, y está basada en la tecnología de pirosecuenciación. Esta tecnología se basa en la unión de moléculas de ADN a esferas (una molécula por esfera), donde se generarán señales luminosas a partir de grupos pirofosfato liberados tras la polimerización de los nucleótidos nuevos complementarios a la hebra de ADN. Esta luz es captada por una cámara que un programa informático la traducirá en picos de una gráfica llamada “pirograma” que serán proporcionales al número de nucleótidos incorporados. La importancia de este secuenciador radica en que gracias a su tecnología es capaz de secuenciar genomas *de novo*. Pese a que en sus inicios se generaron dudas respecto a la fiabilidad de las bases generadas derivados de la corta longitud de sus secuencias, actualmente llega a alcanzar 2 Gb de información con una longitud de lecturas de entre 200 y 700 nucleótidos ⁹.

1.3.2 Secuenciador SOLID-Applied Biosystem

La tecnología de secuenciación SOLID emplea una tecnología de ligación de nucleótidos marcados capaz de interrogar dos bases al mismo tiempo. Esta técnica se basa en utilizar cuatro tipos de sondas con dos bases marcadas fluorescentemente que compiten por la ligación al primer utilizado para la secuenciación. De esta manera cada nucleótido es leído dos veces dando lugar a un proceso de codificación denominado “doblé-encode” o “código de colores”. Esta tecnología alcanza lecturas de 75 pares de bases y generar hasta 200 Gb de información ¹⁰.

1.3.3 Secuenciador Illumina-BioSystems

La plataforma de Illumina se basa en la amplificación en fase sólida con una secuenciación de terminación reversible cíclica con nucleótidos modificados marcados

con 4 colores. En el primer paso se produce una amplificación en puente durante sucesivos ciclos hasta formar un “cluster” con la amplificación clonal del fragmento. Los nucleótidos marcados se unen de manera complementaria al fragmento de ADN unido a la placa parando la síntesis. A continuación los nucleótidos sobrantes son lavados y se toma la imagen. Se elimina el nucleótido marcado fluorescentemente y se reinicia la síntesis repitiéndose el proceso y recogiendo imágenes cada ciclo. La química permite generar lecturas de hasta 150 nucleótidos llegando a producir 600 Gb de datos ¹¹.

1.3.4 Secuenciadores de tercera generación

Los nuevos secuenciadores denominados de tercera generación centran su desarrollo en la secuenciación de moléculas únicas de ADN evitando de esta manera la amplificación mediante PCR y las desviaciones asociadas al proceso de amplificación. De esta manera se pueden abaratar más los costes de secuenciación y aumentar la fiabilidad de las secuencias leídas. Estos secuenciadores utilizan una combinación de nanotecnología con microscopía electrónica. El primer secuenciador de este tipo ha sido producido por “*Helicos BioSciences*”, que utiliza la secuenciación a tiempo real de pequeñas moléculas únicas de ADN adheridas a una superficie sólida, permitiendo leer moléculas de entre 25 y 45 bases de forma fiable. En una escala inmediatamente superior se encuentra la tecnología desarrollada por “*Pacific Biosciences*”, donde la polimerasa se ancla en nanoporos de una superficie sólida, permitiendo leer hasta 1000 nucleótidos gracias a una corriente de iones que permite distinguir cada nucleótido por sus características eléctricas, solucionando así problemas de los secuenciadores de segunda generación con las regiones homopolímeras, repeticiones en tándem, lecturas cortas, etc. La tecnología desarrollada por ZSGenetics es capaz de leer la secuencia del ADN directamente sobre una imagen electrónica, requiriendo la replicación previa de una hebra molde de

ADN para poder marcarla con bases modificadas con yodo, bromo o triclorometilo antes de ser analizadas. Actualmente ya se están desarrollando nuevas tecnologías como las desarrolladas por “*HeliScope*” y “*PacBio RS-SMRT System*” que son capaces de leer dos moléculas únicas de ADN en paralelo y a tiempo real ^{12,13}.

1.4 Secuenciación masiva en el diagnóstico genético

Hasta hace unos pocos años el diagnóstico molecular de enfermedades monogénicas se realizaba mediante la secuenciación de exones y sus zonas de “splicing” mediante el método Sanger. Actualmente esta tecnología tiene la principal limitación de ser muy cara a diferencia de la secuenciación masiva disponible hoy en día. Igualmente la tecnología Sanger sigue siendo el Gold Standard para confirmar las variantes dudosas surgidas de la secuenciación masiva y secuenciación puntual de variantes. Actualmente existe la posibilidad de diseñar a medida sistemas de captura dirigidos a regiones específicas de interés del genoma. La secuenciación dirigida es una de las mejores alternativas para explorar regiones concretas conocidas cuyas alteraciones están asociadas a enfermedades monogénicas. Esta técnica permite abarcar desde pocas kilobases hasta más de un centenar de genes a la vez, proporcionando grandes cantidades de información genética de calidad.

Otra gran ventaja de esta tecnología es su capacidad de estudiar enfermedades heterogéneas donde hay múltiples genes implicados, así como descubrir nuevos genes que pueden modular fenotípicamente enfermedades hasta ahora consideradas monogénicas. Hasta hace poco se hacía impracticable tanto económicamente como por tiempo invertido el estudiar grandes genes como *TTN* (titina), el cual actualmente se ha asociado a múltiples enfermedades entre las que destacan la miocardiopatía dilatada, de forma minoritaria la miocardiopatía arritmogénica y el HCM ¹⁴. Estos avances tienen una implicación clínica directa ya que por ejemplo se han asociado más de 100 genes a diferentes enfermedades cardíacas heredables. De esta manera

las tecnologías de secuenciación masiva han permitido mejorar la eficacia en cuanto al coste, el tiempo de estudio y abarcando un amplio espectro de genes. En contrapartida esta tecnología únicamente un número de genes determinados que se hayan elegido previamente o grandes cambios estructurales que se encuentren en ciertas regiones del ADN que estén fuera de las regiones estudiadas, mientras que con la secuenciación del genoma completo este tipo de alteraciones pueden ser detectadas. La secuenciación dirigida a zonas concretas del ADN sigue siendo la mejor alternativa para muchas enfermedades que tienen un origen genético, ya que es la opción más efectiva, económica y rápida para genes de interés ¹⁵.

La gran cantidad de información generada hace necesaria tanto la interpretación biológica y clínica como la información del caso y su familia. Toda esta información ha de ser interpretada mediante un equipo interdisciplinar de profesionales que definan y establezcan la correlación genotipo-fenotipo en cada caso, así como el manejo de las familias con estas enfermedades. Finalmente la correcta identificación y caracterización del conjunto de variantes de cada individuo analizado junto a su interpretación es el punto clave necesario para la incorporación de la secuenciación masiva en el diagnóstico genético. Por lo tanto estas nuevas tecnologías de secuenciación genética permitirán avanzar en el conocimiento del genoma humano así como de establecer un diagnóstico precoz y un tratamiento personalizado.

1.5 Variantes genéticas

El 99.5% del ADN humano es igual entre todos los individuos y sólo existen algunas variaciones entre la secuencia del ADN de los individuos. Estas diferencias son llamadas variantes genéticas. Gracias a los diferentes proyectos que estudian y catalogan las variantes genéticas han surgido diferentes bases de datos tanto públicas como privadas entre las que destacan:

- The Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>": es una base de datos pública que cataloga pequeñas variantes genéticas de una amplia gama de organismos. Estas variantes incluyen SNV, pequeñas inserciones y deleciones, repeticiones cortas en tándem (STR's) y microsatelites ¹⁶.
- Proyecto internacional HapMap "<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>": Se encarga de identificar y catalogar las variantes genéticas comunes en los seres humanos. El proyecto describe que son las variantes, en qué región del ADN están y como están distribuidas entre las diferentes poblaciones estudiadas. El proyecto en su tercera versión, "HapMap 3", ha llegado a genotipar 1184 individuos de 11 poblaciones diferentes y secuenciar diez regiones de 100Kb en 692 individuos.
- 1000 Genomes Project "<http://www.1000genomes.org/>": El proyecto ha combinado las tecnologías de secuenciación masiva de genoma completo y exoma para crear un mapa de las variaciones genéticas. El objetivo del proyecto es catalogar la mayoría de variantes genéticas cuya frecuencia en las poblaciones estudiadas sea al menos del 1%, variantes en regiones funcionales del genoma que cuya frecuencia esté entre el 0.1% y el 0.5% y por último descubrir variantes estructurales como los "copy number variants", inserciones y deleciones e inversiones. El objetivo final del proyecto es llegar a secuenciar 2500 genomas de diferentes poblaciones asiáticas, africanas, europeas y americanas ¹⁷.
- Exome Sequencing Project (ESP) "<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>": Proyecto que se basa en descubrir nuevos genes y mecanismos que contribuyen a enfermedades del corazón, pulmones y sangre mediante el uso de tecnologías de secuenciación masiva enfocadas a las regiones codificantes del genoma. Consta de un total de 6,503 muestras analizadas de individuos no

relacionados, 2,203 de población Africana Americana y 4,300 Europea Americana ¹⁸.

- Exome Aggregation Consortium (ExAC) "<http://exac.broadinstitute.org/>": El proyecto es una coalición de investigadores que buscan agregar y homogeneizar la diversa información de la secuenciación de exomas de los diferentes proyectos a gran escala de secuenciación como 1000 Genomes y ESP entre otros. El proyecto actualmente consta de 60,706 individuos de las poblaciones Africana, Latina, Asiática del Este y del Sur, Finesa, europea no Finesa y otras ¹⁹.
- Human gene mutation database (HGMD) "<http://www.biobase-international.com/>": Es una base de datos profesional de variantes genéticas que han estado o están asociadas a enfermedad. La base de datos ofrece una clasificación de la patogenicidad de las variantes y enlaza con los estudios donde han estado descritas ²⁰.
- Publicaciones: La base de datos más utilizada es la red de publicaciones biomédicas PubMed-NCBI "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>". Comprende literatura científica y biomédica de U.S. National Library of Medicine, revistas de ciencias de la vida y libros online ²¹.

Por otra parte se puede considerar una mutación o variante genética como aquella alteración permanente en la secuencia de nucleótidos del ADN que puede ser patogénica o no. Estas alteraciones se pueden producir de manera espontánea o de manera inducida debido a agentes físicos o químicos. Principalmente se clasifican en 2 grandes grupos:

- Mutaciones somáticas: Son mutaciones "*de novo*" y por lo tanto ocurren en algún punto durante la vida de la persona, en células somáticas, no en todas. Este tipo de variantes pueden estar causadas por cambios ambientales o

durante la división celular. Si afectan a la línea germinal estas mutaciones pasarán a ser hereditarias.

- Mutaciones hereditarias: adquiridas de generaciones antecesoras y presentes durante toda la vida de la persona y virtualmente en cada célula del cuerpo. Si la mutación es patogénica el individuo en cuestión no manifestará la enfermedad pero transmitirá a su descendencia el alelo mutado ⁶.

Las variantes genéticas pueden producirse a diferentes niveles del genoma, tanto a nivel molecular como a nivel cromosómico. Existen diferentes criterios de clasificación para las variantes, ya sea según el tipo o según el trastorno genético asociado.

1.6 Clasificación de las variantes genéticas

La mayoría de variantes genéticas suelen ser de un solo nucleótido (“single nucleotide variant”, SNV) y se pueden clasificar según la frecuencia del alelo minoritario (MAF) en la población. Cuando las variantes son mayores al 1% en la población se las denomina variantes comunes, y cuando son menores al 1% en la población se las denomina variantes raras ²². Cuando un SNV está en más de 1% de la población se le denomina variante polimórfica de un solo nucleótido (“single nucleotide polymorphism”, SNP). Las frecuencias de las variantes pueden diferir entre diferentes cohortes de diferentes poblaciones. Por esta razón es importante tener en cuenta el origen del caso ya que una variante que aparece como rara en nuestra población puede ser relativamente común en otra. En este sentido se tiene que remarcar que una variante rara en ningún caso significa patogénica. Las variantes genéticas no se clasifican únicamente en función de su frecuencia, ya que se pueden clasificar acorde a otros criterios:

- Clasificación acorde al cambio nucleotídico:

- Transiciones: Variantes producidas por un cambio entre purinas (A<>G) o entre pirimidinas (C<>T).
- Transversiones: Variantes producidas por un cambio purina – pirimidina o viceversa (A<>C, A<>T, C<>G, G<>T).
- Clasificación acorde al efecto en la proteína:
 - Sinónimas: Variantes que pese a cambiar el codón original no alteran la traducción final de la proteína.
 - No sinónimas: Variantes de una única base que provocan una sustitución de un aminoácido en la proteína resultante (“missense”).
 - Sin Sentido: Variantes que provocan un codón STOP causando el truncamiento de la proteína.
 - Neutral: Variantes que provocan un cambio entre aminoácidos equivalentes.
 - Inserciones y deleciones (indels): Variantes que añaden o delecionan en un rango menor de 50pb una determinada posición del ADN, pudiendo causar un cambio en la pauta de lectura de un gen (“frameshift”), o sin interrumpirla (“in-frame”), pero resultando en un acortamiento o alargamiento de una proteína.
- Clasificación acorde al efecto fenotípico:
 - Patogénicas: variantes con evidencia experimental para ser clasificadas como capaces de causar enfermedad.
 - Posiblemente patogénicas: variantes con evidencia robusta de ser capaces de causar enfermedad.
 - De significado incierto: variantes con efecto de patogenicidad desconocido. Este tipo de alteraciones pueden tener una información limitada o contradictoria acorde a su patogenicidad.
 - Posiblemente benignas: variantes con suficiente evidencia de no ser causantes de enfermedad.

- Neutrales o benignas: variantes con evidencia robusta de no ser causantes de enfermedad ²².

1.6.1 Evaluación de la patogenicidad de las variantes raras

El “Colegio Americano de Medicina Genética y Genómica” (ACMG) propone una guía estándar para la evaluación de la patogenicidad de las variantes genéticas encontradas. Esta guía está especialmente enfocada para describir y evaluar variantes en trastornos mendelianos mediante una combinación de herramientas clínicas/genéticas e informáticas entre las que destacan principalmente:

- Tipo de variante: El tipo de variante genética encontrada es un punto crucial para poder realizar una correcta interpretación. Normalmente los polimorfismos, variantes sinónimas y las que se encuentran en regiones no codificantes y lejos de las zonas de “*splicing*” se suelen considerar como benignas o posiblemente benignas. En cambio las variantes que producen proteínas truncadas, se las suele considerar como patogénicas. Esto no excluye que hayan variantes que produzcan proteínas truncadas que sean benignas o de polimorfismos que en estudios de asociación los relacionan con distintas enfermedades. Por otro lado, ya que la mayor parte de la variabilidad genética ocurre en regiones no codificantes, actualmente se está empezando a estudiar el efecto estas variantes en regiones reguladoras que pueden afectar a los diferentes factores de transcripción según el tipo celular específico.
- Estudios de segregación: Estos estudios se basan en la correlación genotipo-fenotipo, donde el genotipo es el conjunto de variantes sospechosas de patogenicidad y el fenotipo la manifestación clínica o los rasgos de la enfermedad.
- Análisis de la conservación: Las secuencias de ADN altamente conservadas tienen un valor funcional elevado, por lo tanto variantes en estas regiones podrían llegar a

ser perjudiciales. Este parámetro está habitualmente incluido en las diferentes herramientas “in silico” utilizadas.

- Herramientas “in silico”: Este tipo de herramientas usan algoritmos para hacer predicciones sobre el impacto que tiene la variante sobre la proteína. No son sustitutivos de los estudios funcionales. Principalmente se basan en la conservación evolutiva, estructura y función proteica, alineamiento y medición de la similitud entre la secuencia variante y la secuencia homóloga proteica y alineamientos filogenéticos entre otros métodos ^{23, 24, 25}.
- Estudios funcionales: Este tipo de estudios analizan el impacto de la variante en modelos *in vitro* e *in vivo*. Este tipo de estudios no siempre reflejan el comportamiento real tal cual ocurre en humanos y también tienen una limitación del número de variantes factibles de poder ser estudiadas en estos modelos ²².
- Bases de datos: Gracias a los diferentes proyectos que se están realizando existen un gran número de bases de datos de variantes genéticas que continuamente se están actualizando. Principalmente comprenden dos tipos:
 - Poblacionales: Obtienen frecuencias de variantes de un gran número de poblaciones. Incluyen información de población general principalmente y por lo tanto también incluyen variantes patogénicas pero no suelen incluir información extensa sobre el efecto funcional o los posibles fenotipos asociados.
 - Enfermedades: Principalmente contienen variantes encontradas en pacientes con algún tipo de enfermedad así como la valoración de las variantes genéticas asociadas.

1.7 Clasificación de los trastornos genéticos

Los trastornos genéticos se pueden clasificar en tres grandes tipos: cromosómicos, multifactoriales y monogénicos.

1.7.1 Trastornos cromosómicos

El estudio de la estructura de los cromosomas se denomina citogenética y para su análisis solo se pueden utilizar unos pocos tipos de células que se analizan principalmente en la metafase de la mitosis.

Los trastornos cromosómicos se refieren a un exceso de cromosomas enteros o defecto en porciones de cromosomas dando lugar a aberraciones estructurales o numéricas:

- **Aberraciones estructurales:** Producidas por un reordenamiento del material genético a escala cromosómica, provocado por una rotura seguida de una reconstitución de una forma anómala. Pueden implicar a uno o dos cromosomas y esta anomalía puede provocar una pérdida de función génica mediante deleciones, inversiones, duplicaciones o translocaciones.
- **Aberraciones numéricas:** Producidas por una alteración en el número de cromosomas. Cuando las alteraciones afectan al número de juegos cromosómicos se pueden producir “Haploidias” (disminución en el número de juegos cromosómicos) o “Poliploidias” (aumento del número de juegos cromosómicos). Por otro lado cuando hay una variación en el número total de cromosomas se da resultado a “Aneuploidias” (pérdidas o ganancias de uno, dos tres o más cromosomas).

1.7.2 Trastornos genéticos multifactoriales

Los trastornos genéticos multifactoriales están causados por una interacción de múltiples genes con múltiples factores genéticos. Por lo tanto su herencia no es debida a un solo gen, sino a la combinación de alteraciones genéticas que predisponen a producir la enfermedad. En las enfermedades más comunes la combinación de los factores genéticos y ambientales influyen su expresión por lo que no se puede

determinar un patrón de herencia claro pese a que tiendan a ser familiares ²⁶. Para explicar esta variabilidad de las enfermedades se han postulado varias teorías:

- La presencia y combinación de variantes comunes en la población general las cuales conferirían un pequeño grado de riesgo cada una. Por lo tanto la enfermedad resultante estaría marcada por la combinación de variantes comunes en muchos alelos. Mediante el estudio de asociación de genomas (“genome-wide association study”, GWAS) se pueden estudiar este tipo de variantes comparando entre casos y controles ²⁷.
- La presencia de variantes de baja frecuencia menores al 5% podrían tener efectos sustanciales en el desarrollo de la enfermedad sin llegar a demostrar una clara herencia Mendeliana. Este tipo de variantes de momento se puede estudiar únicamente mediante secuenciación ya sea de regiones concretas o de genoma completo ²⁸.

1.7.3 Trastornos monogénicos

Los trastornos monogénicos están causados por alteraciones (variantes raras) en genes específicos. Aproximadamente se han identificado sobre unos 10,000 trastornos monogénicos que siguen los patrones de herencia mendelianos. Las alteraciones en la secuencia de los alelos pueden ser benignas o patogénicas. En el caso de las variantes patogénicas pueden provocar cambios fenotípicos, y principalmente pueden tener herencia dominante o recesiva.

La herencia autosómica dominante es la expresión fenotípica causada por un alelo en estado de heterocigosis de un cromosoma autosómico. En este caso hombres y mujeres se encuentran afectados aunque la expresión puede variar según el sexo. Este patrón de herencia tiene varias características asociadas a parte de la definición clásica. Una es la expresión variable que se refiere a los diferentes niveles de

expresión fenotípica que presenta el gen alterado, pudiendo incluir si se trata de una variante patogénica la severidad de los síntomas o su edad de aparición. La otra característica que también puede incluir este patrón de herencia es la penetrancia incompleta que se refiere a la falta de expresión fenotípica que se debería de producir a causa de la alteración. La herencia autosómica recesiva la expresión del fenotipo ocurre cuando ambos alelos están alterados. Cuando se presenta en forma de heterocigosis a estos individuos se los denomina portadores ya que no manifiestan el fenotipo. En este caso también los individuos de ambos sexos están afectados por igual siendo la consanguinidad o el parentesco la mayor causa de la prevalencia de estas enfermedades. Respecto a los trastornos de herencia ligada al cromosoma X pueden ser también tanto dominantes como recesivos. Este tipo de trastornos siempre se expresan en hombres ya que solo poseen un cromosoma X. En cambio como las mujeres presentan doble dotación cromosómica X la expresión depende de que sea dominante o recesiva ²⁶.

2 Muerte súbita

2.1 Muerte súbita

La muerte súbita (MS) se define como aquella muerte natural que acontece de manera rápida e inesperada a una persona aparentemente sana durante la primera hora desde el inicio de los síntomas. La MS es imprevista, y este hecho es lo que la define, le otorga un interés forense y justifica de que históricamente el estudio de la MS se haya vehiculizado al ámbito judicial y, en consecuencia, medicolegal. El desconocimiento de la causa del fallecimiento obliga a la comunicación judicial mediante un Parte Judicial de Defunción (documento que pone en conocimiento al juez la existencia de un fallecimiento de causa potencialmente no natural). La legislación prevé la posibilidad de la práctica de la autopsia judicial cuando existe un informe medicoforense que acredite la causa del fallecimiento. Según la ley de enjuiciamiento criminal, artículo 343, se debe realizar una autopsia forense en toda muerte súbita debido a que este tipo de muertes son sospechosas de criminalidad por no ser esperadas. Todas las MS se estudian mediante el ámbito medicolegal y la correspondiente autopsia judicial en los servicios de patología forense de los Institutos de Medicina Legal (IML) de las diferentes comunidades autónomas. En este proyecto el estudio forense se vehiculizó mediante el servicio de Patología Forense, la Sección de Anatomía Forense y la Dirección del Instituto de Medicina Legal de Cataluña (IMLC). El protocolo de este tipo de autopsias sigue los siguientes exámenes:

- Valoración externa: Talla, perímetro abdominal y peso del cadáver para establecer la relación con el peso cardíaco y el grosor de las paredes.
- Examen interno macroscópico:
 - Inspección del pericardio.

- Inspección de la anatomía de las grandes arterias para descartar la presencia de trombos.
- Examen y sección de las venas pulmonares.
- Apertura de las aurículas para examinar sus cavidades y el septo. Se evalúan las válvulas (mitral y tricúspide) y se determina la integridad de los músculos papilares y las cuerdas tendinosas.
- Examen de las arterias coronarias, tamaño, forma posición, permeabilidad...
- Evaluación de las paredes y las cavidades ventriculares.
- Toma de medidas:
 - Peso total del corazón.
 - Grosor de las paredes ventriculares y septo comparando con las tablas de espesor normal según edad, sexo y peso corporal.
 - Medición de las cavidades ventriculares.
- Examen microscópicos:
 - Estudio histopatológico:
 - Corazón: Se realizan bloques de las regiones anterior, lateral y posterior de pared libre de ventrículo izquierdo, del ventrículo derecho y del septo, todos a dos niveles separados 2cm. Se realizan un bloque por cada aurícula y de las áreas con anomalías macroscópicas significativas. Un bloque de cada una de las tres arterias coronarias. Muestra del nodo sinusal y de corte auriculoventricular con mitral y otro con tricúspide.
 - Otros órganos y tejidos: fragmento de los cinco lóbulos pulmonares, cerebro, tiroides, costilla, lóbulos derecho e izquierdo hepáticos, bazo, riñones, suprarrenales y páncreas. Dependiendo de la historia médica y las circunstancias de la

muerte, se recogerán muestras de otros órganos y tejidos para completar la investigación.

- Estudio toxicológico para la identificación de cocaína, anfetaminas, opioides, alcohol y medicamentos con efecto cardiotóxico:
 - Sangre periférica o cardíaca.
 - Orina por punción.
 - Humor vítreo.
 - Bilis.
 - Torunda nasal y bucal.
 - Contenido gástrico.
 - Fragmentos de cerebro, hígado, riñón y pulmón en fresco.
 - Cabello de la región occipital.
- Estudio bioquímico y quicotoxicológico:
 - Sangre.
 - Orina.
 - Humor vítreo (ionograma).
- Estudio genético:
 - Sangre con EDTA congelada, tras solicitud familiar y autorización judicial, en casos con miocardiopatía hipertrófica (HCM), displasia arritmogénica de ventrículo derecho (ARVC) o corazón estructuralmente normal en sujeto menor de 50 años.

Cabe destacar que la mayoría de estos casos son muertes de origen natural, debidas a una enfermedad o un malfuncionamiento corporal que no está influenciado directamente por fuerzas o agentes externos. Si los hallazgos macroscópicos, histopatológicos o bioquímicos son inespecíficos se trata de MS cuya causa de muerte es no concluyente y a este tipo de autopsias se las denomina negativas o autopsias blancas. Por lo tanto a este tipo de casos se los clasifica como muertes súbitas

inexplicadas (MSI). Estas muertes son sospechosas de ser producidas por trastornos arrítmicos por lo que las guías medicoforenses actuales recomiendan realizar la llamada autopsia molecular que consiste en un estudio genético ²⁹.

2.2 Epidemiología de la muerte súbita cardíaca (MSC)

La MSC representa una carga importante en el todo el mundo ya que en países como Estados Unidos es responsable de entre 200,000 a 300,000 muertes de manera anual ³⁰. A nivel mundial se estima que es responsable de entre 4 y 5 millones de fallecimientos anuales. Es un suceso con una incidencia superior en hombres que en mujeres en prácticamente todos los rangos de edad ³¹. La MSC en la población general se produce en individuos con una edad promedio de 65 años derivada de múltiples patologías adquiridas donde la enfermedad coronaria (EC). Por otro lado este tipo de muertes también afectan a niños y jóvenes adultos, donde las enfermedades estructurales congénitas, las miocardiopatías estructurales heredables y las enfermedades primarias eléctricas heredables tienen una gran relevancia ³². Finalmente se estima que 15% de las MSC presentan un origen genético, ya sean debidas a enfermedades estructurales del corazón o a trastornos eléctricos primarios que afectan directamente al potencial de acción cardíaco ³³.

2.3 Trastornos asociados a MSC en los jóvenes

Los avances en el análisis y diagnóstico genético han logrado identificar grandes grupos de genes asociados a enfermedades cardíacas que pueden desencadenar una MSC. Tradicionalmente estos trastornos genéticos raros que predisponen a individuos jóvenes a padecer una MSC se han categorizado en dos grandes grupos, aquellos cuyo corazón es estructuralmente normal (trastornos eléctricos primarios), y aquellos asociados con una enfermedad estructural (miocardiopatías) ³². En niños y adolescentes se puede dar el caso que la enfermedad estructural no es detectable morfológicamente, por lo que también tendrían un corazón aparentemente normal. A nivel molecular estas enfermedades se deben a alteraciones en dos grandes grupos de proteínas, las implicadas en la estructura y contractibilidad de los cardiomiocitos (proteínas sarcoméricas, demosómicas y citoesqueléticas) y las proteínas que son o

2.4 Trastornos eléctricos primarios y el potencial cardíaco

Los trastornos eléctricos primarios incluyen el síndrome de QT largo (SQTL), el síndrome de QT corto (SQTC), el síndrome de Brugada (SBr) y la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC). Estos trastornos están caracterizados con frecuencia por anomalías específicas en el electrocardiograma (ECG) tanto en un estado basal como bajo unas condiciones específicas, así como el ejercicio. Hasta la fecha la mayoría de genes asociados a estos trastornos codifican para canales iónicos cardíacos, sus subunidades o para proteínas que interactúan y los regulan. La disfunción de los canales iónicos causa anomalías en las propiedades eléctricas del corazón pudiendo provocar arritmias ³². Esta puede tener por lo tanto un origen genético causado por alteraciones en genes codificantes para este tipo de proteínas o adquirido mediante la exposición a fármacos, inmunoglobulinas, o toxinas que modifican las propiedades de estos. También se debe remarcar que hay genes estructurales que interaccionan con canales iónicos, como puede ser el caso de ciertos genes desmosómicos que interaccionan directamente con el canal de sodio cardíaco y por lo tanto sus alteraciones genéticas pueden tener un efecto directo en el potencial de acción.

Los canales iónicos cardíacos son proteínas que regulan el flujo de iones tanto de la membrana plasmática como la de los orgánulos de la célula. En reposo las células del miocardio ventricular son capaces de almacenar un potencial eléctrico de entre -85 a -95mV. Debido a la excitabilidad de estas células son capaces de generar potenciales de acción (PA) y la suma de estos a lo largo de todo el corazón acaba generando el patrón electrocardiográfico típico.

EL PA cardíaco consta de cinco fases:

- Fase 0 o despolarización rápida: Comienza con un cambio brusco y rápido en la permeabilidad de la membrana al sodio. La corriente de sodio (I_{Na}) está

producida por la apertura de los canales de sodio operados por voltaje, que provoca la despolarización de la membrana. En esta fase también se abren canales de corriente de salida de potasio (I_{to}).

- Fase 1 o repolarización precoz: En esta fase se desarrolla una repolarización temprana de la célula llamada “notch”, producida por la inactivación de los canales de sodio operados por voltaje, y por el mantenimiento de la apertura de los canales I_{to} .
- Fase 2 meseta o repolarización lenta: Esta meseta o “plateau” característica del potencial de acción cardíaco se produce por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que producen una corriente (I_{Ca}). En esta fase el potencial comienza a disminuir lentamente por la activación de los canales de salida de K^+ (I_{Ks} , I_{Kr}).
- Fase 3 o repolarización rápida tardía: En esta fase se observa la caída del potencial de acción ya que se inactivan los canales I_{Ca} y quedan abiertos canales de salida de K^+ (I_{Ks} , I_{Kr}), que continúan abiertos hasta que se restablece el potencial de reposo en la fase 4.
- Fase 4 o periodo entre dos potenciales: La célula recupera su potencial de reposo (-85mV) como se muestra en la **figura 2**, pero tiene un exceso de sodio. La bomba sodio potasio bombea iones Na^+ al exterior celular restableciendo el gradiente inicial ^{35,36}.

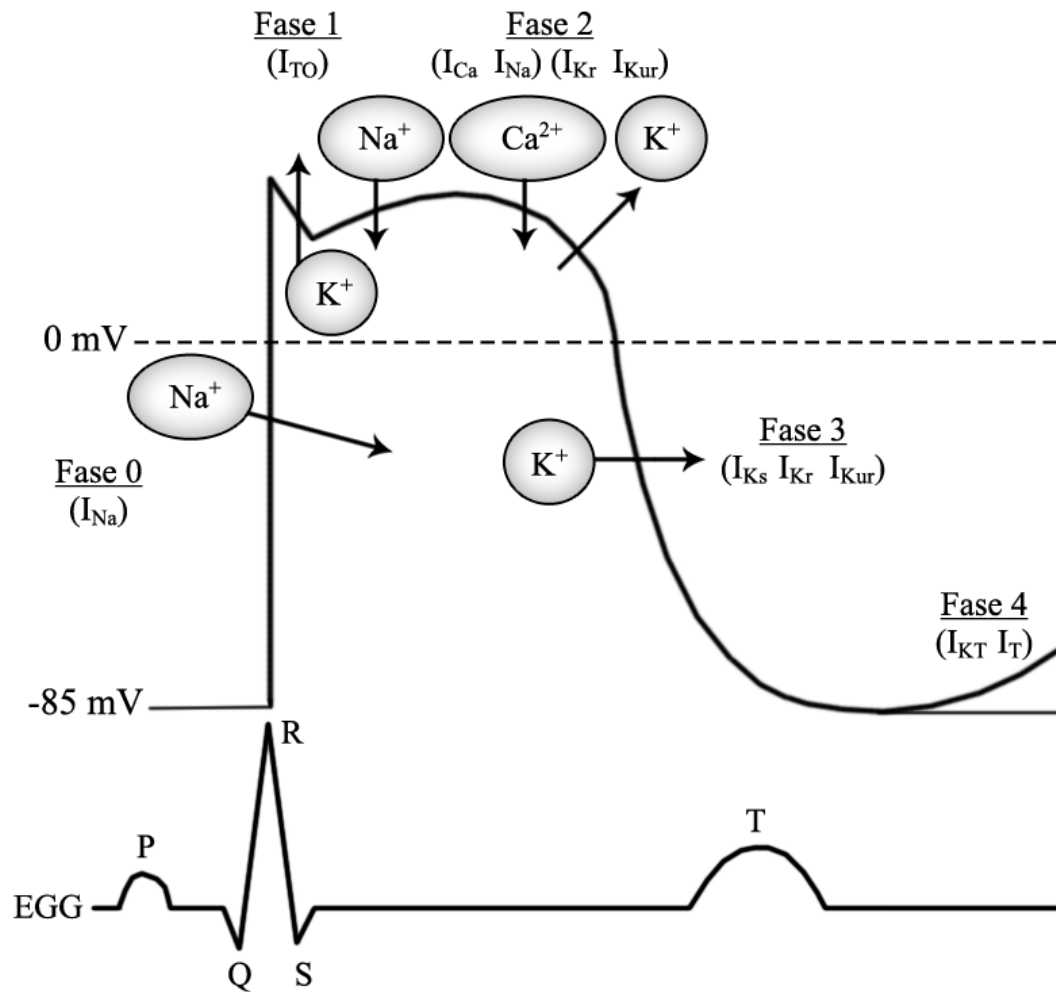


Figura 4. Representación esquemática de las fases principales y las corrientes involucradas en el potencial de acción cardíaco ventricular que suceden durante el ECG.

2.4.1 Síndrome del QT largo (SQTL)

El SQTL es una alteración de la repolarización ventricular que se manifiesta en el ECG en forma de alargamiento del intervalo QT. Este alargamiento de la repolarización del potencial de acción ventricular predispone a arritmias malignas del tipo característico conocido como “torsades de pointes”, un tipo específico de síncope que degenera en fibrilación ventricular y puede conllevar la muerte súbita. Esta enfermedad puede aparecer tanto en situación de estrés o ejercicio físico como en reposo o durmiendo. La incidencia se estima entre 1:2000-1:5000 personas ³⁷ con una penetrancia variable y con diferentes fenotipos clínicos con un intervalo QT en el límite y sin arritmias clínicas hasta la MSC. Esta enfermedad tiene una forma congénita en un 85% de los casos y una esporádica en el 15% restante ³⁸. También hay una forma adquirida de esta enfermedad que está inducida por fármacos como pueden ser medicamentos antiarrítmicos, anestésicos, antibióticos, antihistamínicos, antidepresivos o los que producen descompensaciones iónicas ³⁹. El SQTL principalmente tiene un tipo de herencia dominante llamado tipo congénito de “Romano-Ward” y está provocado por una pérdida de función de las corrientes repolarizantes o bien un aumento de las corrientes despolarizantes del potencial de acción cardíaco. Los genes mayoritarios afectados se pueden clasificar en:

- Codificantes de canales de potasio: *KCNQ1* (SQTL1), *KCNH2* (SQTL2), *KCNE1* (SQTL5), *KCNE2* (SQTL6), *KCNJ2* (SQTL7), y *KCNJ5* (SQTL13).
- Genes codificantes para subunidades del canal de sodio cardíaco: *SCN5A* (SQTL3), y *SCN4B* (SQTL10).
- Genes que codifican para subunidades de canales de calcio: *CACNA1C* (SQTL8), y *RYR2* (SQTL14).

- Genes que codifican para proteínas que interaccionan con canales iónicos cardíacos: *ANK2* (SQTL4), *AKAP9* (SQTL11), *CAV3* (SQTL9), *SNTA1* (SQTL12), *CALM1* (SQTL15) y *CALM2* (SQTL16).

2.4.2 Síndrome del QT corto (SQTC)

Definido como entidad clínica en el año 2000 ⁴⁰, y está caracterizado por un intervalo QT acortado que puede dar lugar a arritmias y por lo tanto a MSC tanto en situación de reposo como en respuesta de un estímulo externo. Es un síndrome que se presenta en forma de herencia familiar asociada en mayor prevalencia a fibrilación auricular aunque también se la asocia con la ventricular. En contrapartida al SQT el SQTC está provocado por una ganancia de la función de los canales de potasio cardíacos, resultando de esta manera en un acortamiento del intervalo QT o una pérdida de función en los canales de corriente de calcio tardía ^{37,41}. De esta manera se puede clasificar el SQTs según los genes mayoritarios afectados:

- Codificantes de canales de potasio: *KCNH2* (SQTC1), *KCNQ1* (SQTC2) y *KCNJ2* (SQTC3).
- Codificantes para subunidades de canales de calcio: *CACNA1C* (SQTC4), *CACNB2* (SQTC5) y *CACNA2D1* (SQTC6).

2.4.3 Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC)

La TVPC está caracterizada como una enfermedad arritmogénica hereditaria caracterizada por arritmias ventriculares polimórficas mediadas adrenérgicamente. La taquicardia se induce durante una situación de emoción o ejercicio intenso pudiendo provocar una muerte súbita. Estos pacientes tienen un corazón estructuralmente normal y muestran un ECG basal normal. Únicamente se puede desenmascarar mediante un test de esfuerzo y un monitoreo continuo del ECG ⁴². Este trastorno

ocurre principalmente en niños y adolescentes, y su prevalencia está estimada en 1:10000 en Europa. Esta enfermedad principalmente tiene un patrón de herencia autosómica dominante con una elevada penetrancia ⁴³. Los dos principales tipos de este trastorno tienen alteraciones en genes que afectan a las corrientes de calcio, provocando despolarizaciones tardías y arritmias ventriculares bajo unas condiciones adrenérgicas particulares ^{43 44}. Las principales alteraciones genéticas se han asociado en dos genes, pero también existen otros genes asociados a esta enfermedad. Los genes mayoritarios asociados se pueden clasificar en:

- Codificante para el receptor de rianodina (*RYR2*) que permite el flujo de iones de calcio desde el retículo sarcoplasmático.
- Codificante para la isoforma de la calsequestrina cardíaca (*CASQ2*) que interacciona con *RYR2* y regula la corriente sarcoplasmática de calcio.
- Otros genes asociados a corrientes de calcio: *CALM1*, *TRDN* y *KCNJ2*

2.4.4 Síndrome de Brugada (SBr)

El SBr fue descrito por primera vez en 1992 por los hermanos Brugada ⁴⁵. Está caracterizada por una elevación del segmento ST en las derivaciones precordiales derechas (V_1 - V_3) del ECG seguido de una onda T negativa. Está asociado a taquicardia ventricular polimórfica y a la fibrilación ventricular, y por lo tanto a muerte súbita. Estas arritmias se pueden producir tanto en situación de reposo o bajo estrés ^{46,47}. La distribución de este síndrome es difícil de precisar, se estima que en Europa es de 1 a 5:10000 habitantes, siendo más común en hombres (80% de los casos) y una edad de diagnóstico que oscila entre los 40 y 45 años. Se estima que un 4% de la MSC puede ser debido a SBr y este porcentaje aumenta hasta un 20% de las MSC sin defectos estructurales en el corazón ⁴⁸. Principalmente tiene un patrón de herencia autosómico dominante de penetrancia incompleta aunque tiene alguna forma recesiva también. El primer gen descrito fue el que codifica para el canal de sodio cardíaco,

SCN5A, y hasta la fecha se han descrito más de 350 mutaciones. Hay un alto porcentaje de casos, aproximadamente un 75% que no se ha detectado causa genética. Entre un 11 y un 24% de los casos corresponden a mutaciones en este gen ^{49 50}, pero también se han asociado otros genes. Los genes mayoritarios asociados se pueden clasificar en:

- Relacionados con alteraciones en la corriente de sodio (*SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN10A*, *GPD1L*, *MOG1*, *RANGRF*, *SLMAP*, *FGF12* y *PKP2*).
- Relacionados con alteraciones en la corriente de calcio (*CACNA1C*, *CACNB2B*, *CACNA2D1* y *TRPM4*).
- Relacionados con alteraciones en la corriente de potasio (*KCND3*, *KCNE1*, *KCNE3*, *KCNE5*, *KCNJ8*, *HCN4* y *ABCC9*).
- Otros genes que han sido asociados: *HEY2*, *SEMA3A*, *PXDNL*, *IRX5*, *DPPX*.

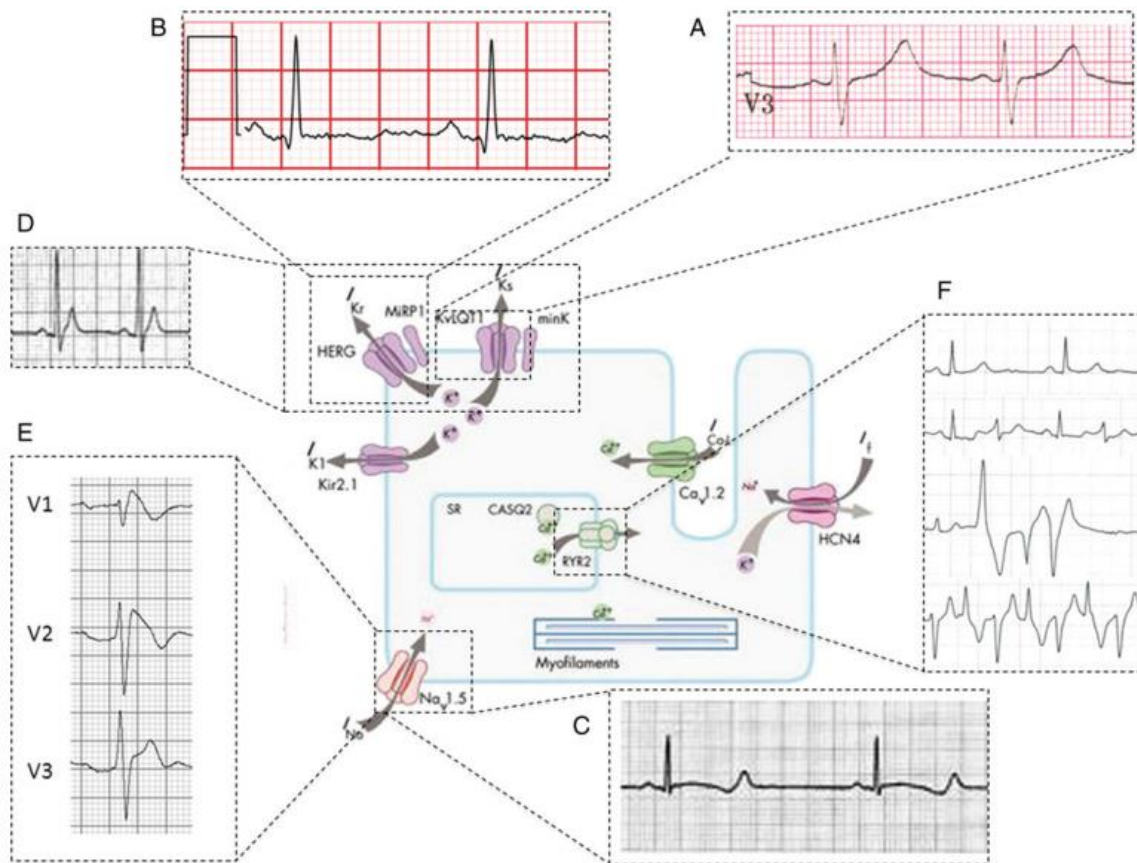


Figura 5. Figura representativa de los principales canales iónicos y las canalopatías a las que están asociados. ECG representativos de diferentes canalopatías. Alteraciones en *KCNQ1* y *KCNH2* están asociadas a LQTS1 (A) y LQTS2 (B), respectivamente. La ganancia de función debido a alteraciones en *KCNQ1* y *KCNH2* está asociada a SQTC (D). La ganancia de función en *SCN5A* está asociada a LQTS3 (C), y la pérdida de función a SBr (E). Finalmente la pérdida de función en *RYR2* está asociada a TVCP (F). Adaptado de K.V. Lieve et al. (2015)

2.5 Miocardiópatías

Las miocardiopatías son un grupo heterogéneo de enfermedades estructurales del miocardio que causan disfunciones cardíacas pudiendo llegar a provocar la muerte súbita. La clasificación de estas enfermedades está basada en su fenotipo definido por la evaluación clínica de los afectados incorporando su genotipo cuando es posible. Esta clasificación se divide según sus categorías fenotípicas mayores donde principalmente destacan la miocardiopatía hipertrófica (MCH), dilatada (MCD) y miocardiopatía arritmogénica (MA). Desde la primera alteración genética detectada en 1990 en una familia con en la cadena pesada de la β -miosina, se han detectado más de 600 variantes genéticas raras asociadas a estas enfermedades. Estas enfermedades principalmente tienen una forma autosómica dominante con una pero habitualmente presentan también penetrancia incompleta y expresividad variable. La clasificación de estas enfermedades es compleja ya que alteraciones en el mismo gen pueden dar lugar a fenotipos diferentes así como diferentes alteraciones en diferentes genes pueden estar asociadas a un mismo fenotipo.

2.5.1 Miocardiopatía hipertrófica (MCH)

La MCH es un trastorno que está caracterizado por una asimetría inexplicada en el ventrículo izquierdo debida a un engrosamiento anómalo en el miocardio llamado hipertrofia. Su diagnosis recalca en un electrocardiograma y una ecocardiografía o una imagen de resonancia magnética. Fenotípicamente está caracterizada como un trastorno heterogéneo, penetrancia dependiente de la edad, y de expresión variable. En una misma familia se pueden observar casos desde hipertrofia inapreciable hasta una extrema, con diferentes grados de fibrosis y obstrucción del tracto de salida. La prevalencia de la enfermedad está estimada en 1:500 pero puede estar subestimada ya que no tiene en cuenta la prevalencia genética ⁵². Genéticamente se define como una enfermedad monogénica causada principalmente por alteraciones en genes que

codifican para proteínas sarcoméricas^{53 54}. Hasta el momento se han identificado alrededor de 1400 alteraciones genéticas principalmente en:

- Genes codificantes para proteínas sarcoméricas citoesqueléticas (*CSRP3*, *TCAP*, *MOYZ2*, *VLC*, *TTN*).
- Genes codificantes para proteínas sarcoméricas contráctiles (*ACTC1*, *ACTN2*, *MYH6*, *MYH7*, *MYBPC3*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *NEXN*).
- Genes codificantes para proteínas no sarcoméricas (*CASQ2*, *JPH2*, *PLN*, *PRKAG2*, *GLA*, *LAMP2*, *FHL1*, *TTR*, *GAA*, *PTPN11*, *PDLIM3*, *FXN*, *CAV3*, *MYLK2*, *TAZ*, *CRYAB*).

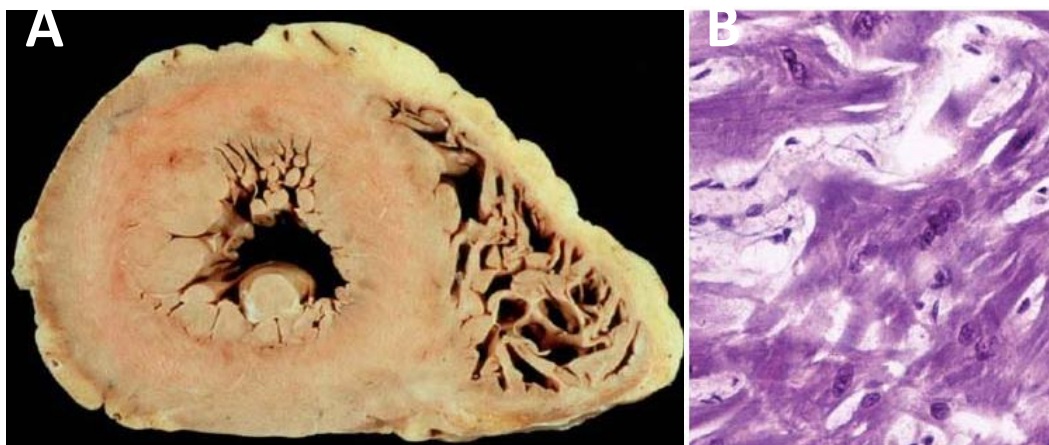


Figura 6. Figura representativa de un corazón con miocardiopatía hipertrófica. A: Sección transversal de un corazón de 530g de peso con hipertrofia ventricular izquierda. B: Figuras miocárdicas anormalmente ramificadas y desordenadas debido a la hipertrofia. Tinción Tricrómica de Masson. Adaptado de M.P Suárez (2001)⁵⁵.

2.5.2 Miocardiopatía dilatada (MCD)

La MCD es un trastorno caracterizado por un alargamiento y una disfunción sistólica del ventrículo izquierdo que puede provocar la muerte súbita. Cuando esta enfermedad ocurre en ausencia de una causa identificable (ej. Isquemia, enfermedad

valvular, hipertensión, enfermedades inflamatorias, entre otras) se la denomina como idiopática. Afecta principalmente a niños, adolescentes y jóvenes adultos. Es diagnosticada mediante un ECG y un ecocardiograma. Es una enfermedad insidiosa de progresión lenta e inflamatoria, asociada tanto a arritmias auriculares como ventriculares, y su incidencia afecta a 1:2500 individuos ¹⁴. Genéticamente es una enfermedad autosómica dominante, aunque también existen patrones subclínicos de herencia autosómica recesiva, ligada al cromosoma X y al genoma mitocondrial ^{56 57}. Las alteraciones en genéticas en esta enfermedad se pueden dividir en:

- Codificantes para proteínas nucleares (*LMNA, EMD*)
- Codificantes para proteínas sarcoméricas citoesqueléticas (*TTN, ACTN2, LDB3, DES, DMD, CSRP3, VCL*)
- Codificantes para proteínas desmosómicas (*DSC2, DSG2, DSP*).
- Codificantes para proteínas sarcoméricas contráctiles (*MYH6, MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, TNNC1, TPM1, ACTC1, MYOZ1*).
- Codificantes para otras proteínas (*SCN5A, PLN, TAZ, ANKRD1, ABCC9, BAG3, LAMP2, EYA4, TMPO, PSEN1, PSEN2, SGCD, CAV3, CRYAB, RMB20*).

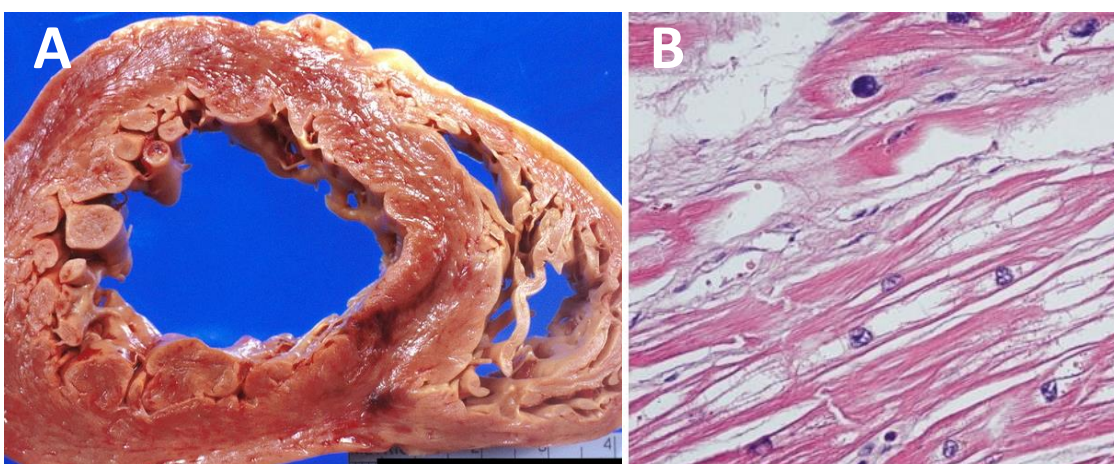


Figura 7.. Figura representativa de un corazón con miocardiopatía dilatada. A: Corazón con una marcada dilatación el ventrículo izquierdo. B: Cardiomiocitos con una marcada reducción de miofibrillas. Tinción Hematoxilina Eosina. Adaptado de R. I. Radu et al. (2012) ⁵⁸.

2.5.3 Miocardopatía arritmogénica (MA)

La MA es un trastorno caracterizado por una progresiva infiltración de tejido fibroadiposo en el miocardio, principalmente en el ventrículo derecho, pero en más de un 50% de los casos afecta también al ventrículo izquierdo⁵⁹. Esta alteración del miocardio interrumpe la propagación eléctrica provocando arritmias, síncope e incluso pudiendo provocar muerte súbita, llegando a provocar el 15% de este tipo de muerte en jóvenes atletas. La prevalencia de esta enfermedad varía entre un rango de 1:2500 a 1:5000, siendo tres veces más prevalente en hombres^{60 61}. Principalmente el patrón de herencia de esta enfermedad es autosómico dominante de expresividad y penetrancia variable^{62 63}. Se han identificado principalmente alteraciones en genes que codifican para proteínas del desmosoma y otras relacionadas:

- Codificantes para proteínas desmosómicas armadillo (*PKP2, JUP*).
- Codificantes para proteínas desmosómicas de unión transmembrana, anclaje y relacionadas (*DSG2, DSC2, DSP*).
- Codificantes para otras proteínas (*SCN5A, DES, RYR2, TGFβ3, TMEM43, PLN, LMNA, CTNNA3 y TTN*).

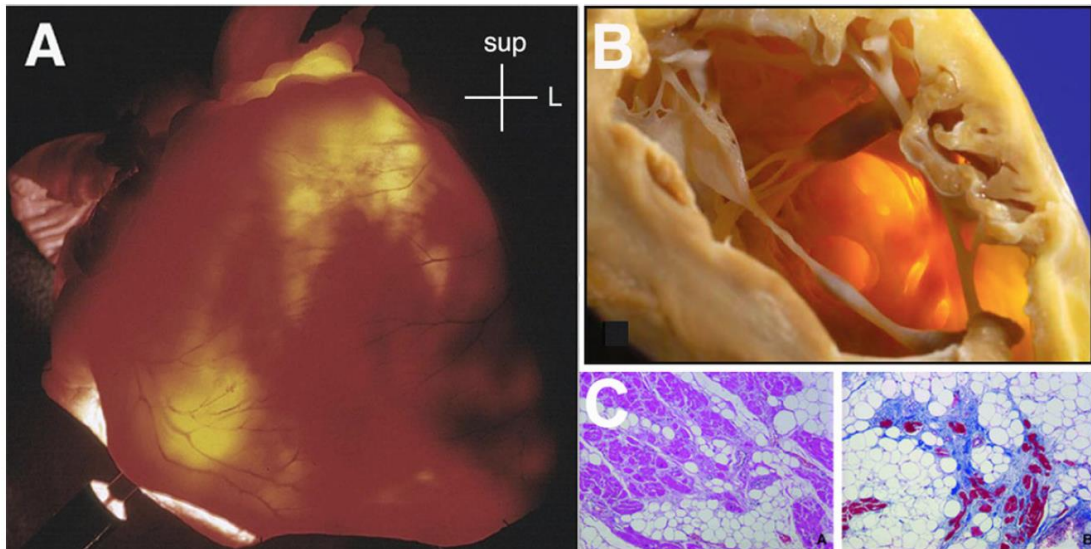


Figura 8. Figura representativa de un corazón con MAVD. A: Visión frontal del corazón, mostrando la envoltura del ventrículo derecho. Se puede observar como las paredes del ventrículo del corazón y su tracto de salida son translúcidas; L = Izquierdo; Sup = superior; B: visión derecha lateral. C: Degeneración de los cardiomiocitos y su sustitución fibroadiposa en la pared ventricular derecha. Tinción Hematoxilina/eosina. Adaptado de V.R. Iyer et al. (2013)⁶¹.

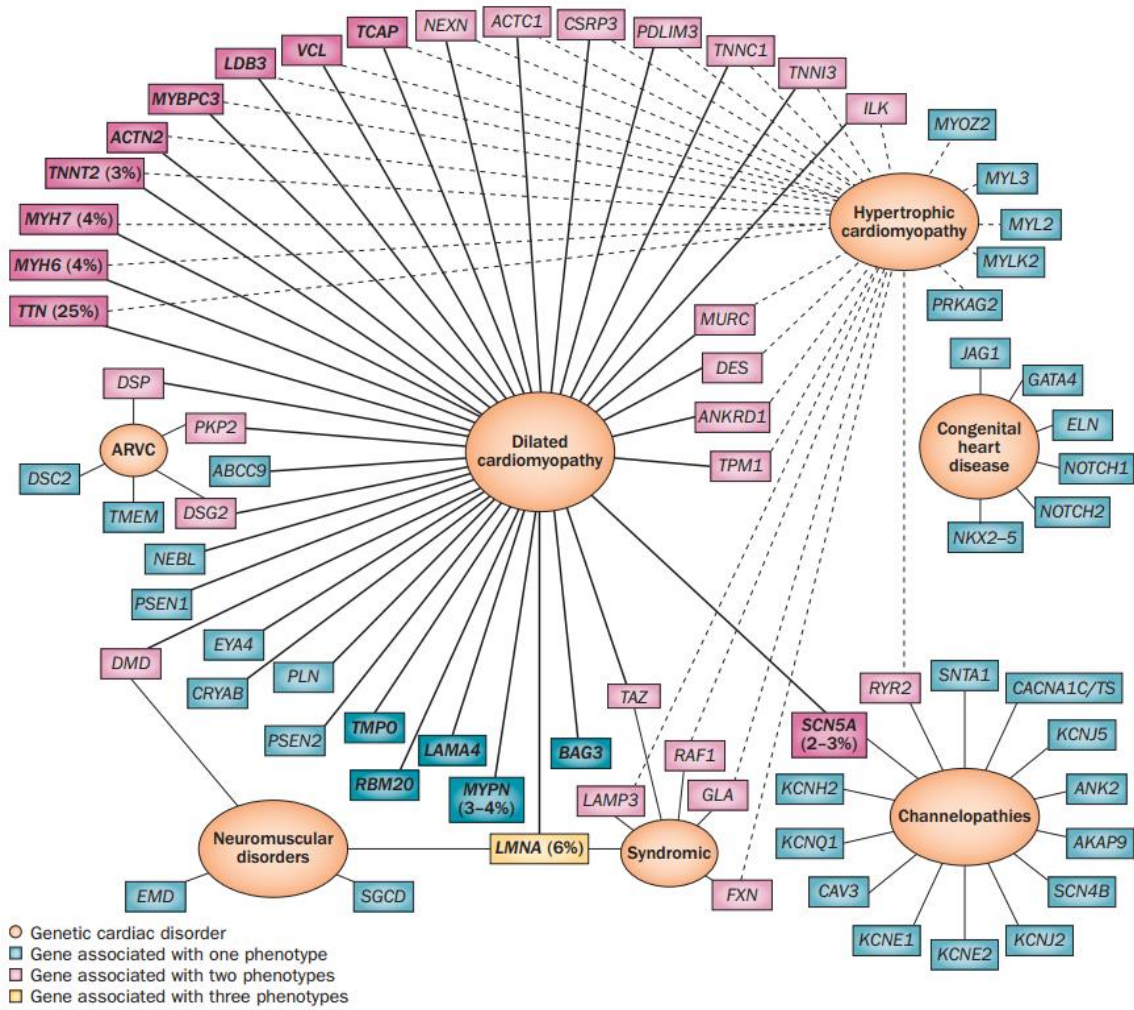


Figura 9. Figura representativa con los principales genes asociados a canalopatías, miocardiopatías, desórdenes neuromusculares entre otras. En esta figura se representa de manera esquemática la interrelación entre genes y las diferentes enfermedades cardíacas heredables. En el esquema representado se observa como hay una gran parte de genes comunes que se comparten entre las diferentes enfermedades. Adaptado de R.E Hersberger et al. (2013) ⁶⁴.

II. Hipótesis y objetivos

1 Planteamiento, hipótesis y objetivos

Planteamiento:

La muerte natural define la muerte principalmente atribuida a una enfermedad o a un malfuncionamiento interno corporal, y que no está influenciada directamente por fuerzas o agentes externos. En el desarrollo de este tipo de muertes están implicadas un gran número de patologías caracterizadas por presentar una gran heterogeneidad fenotípica. Las principales causas de este tipo de muertes en individuos jóvenes y adultos son las debidas a patologías asociadas a la MSC. Aun así existe un número elevado de autopsias que aún después de los exhaustivos estudios macroscópicos, microscópicos y toxicológicos, quedan sin explicar. Este tipo de muertes se las clasifica como MSI, son sospechosas de ser debidas a arritmias cardíacas y en individuos jóvenes pueden llegar a ser el 50% de los casos. Debido a la naturaleza genética de estas patologías se hace necesario el estudio de las bases moleculares y los factores genéticos implicados en el desarrollo de la MSC y la MSI.

En consecuencia el uso de herramientas de secuenciación masiva (“Next Generation Sequencing”, NGS), permitirá estudiar un número mayor de genes candidatos y la posterior identificación de variantes potencialmente patogénicas para patologías asociadas con la MSC. Por lo tanto el estudio genético combinado con el seguimiento clínico de los familiares permitirá establecer las correlaciones genotipo-fenotipo y hará posible una mayor precisión en la terapia más adecuada para estos. En la presente tesis que se plantea identificar la etiología de la muerte en los casos menores de 50 años e identificar los defectos genéticos asociados a la MSC que puedan contribuir a este evento.

Hipótesis:

La principal causa de muerte natural en individuos menores de 50 años está debida a patologías cardíacas, prevaleciendo la enfermedad coronaria en los casos de mayor edad y los casos inexplicados en individuos jóvenes. Un número importante de muertes inexplicadas así como de miocardiopatías se deben a defectos genéticos.

Objetivo 1:

- Descripción y clasificación de los casos de muerte súbita natural incluidos dentro del estudio. Definir la etiología de las principales causas de muerte súbita natural y estratificar los casos en función de la edad, el género y la situación de muerte.

Objetivo 2:

- Realización de estudios genéticos mediante secuenciación masiva en dos cohortes diferentes definidas: Miocardiopatías e inexplicadas. Analizar los principales genes asociados a la MSC. Clasificar y evaluar las variantes encontradas en función de su patogenicidad.

Objetivo 3:

- Establecer una recomendación forense a modo de diagrama para la optimización en la decisión de cuando realizar estudios genéticos en los casos de muerte súbita.

III. Material y Métodos

1 Material y métodos

1.1 Selección de la cohorte y criterios de inclusión

El presente proyecto se inició en 2012 en colaboración con el Instituto de Medicina Legal de Cataluña (IMLC). El IMLC gestiona y concentra todos los casos de Muerte súbita de Cataluña que requieren investigación forense. Éste estudio se ha realizado sobre los casos de muerte natural del área metropolitana de Barcelona recopilados entre 2012 y 2015. En total se seleccionaron 789 casos menores de 50 años de edad cuyo informe forense determinó que la causa de la muerte se debía a causas naturales. Los casos fueron divididos entre los que se determinaron la causa de la muerte mediante la autopsia macroscópica y los que se acabaron de determinar después del informe microscópico. La autopsia fue realizada siguiendo las regulaciones internacionales actuales^{65, 66}. Para el análisis genético se utilizaron las muestras cuya calidad y cantidad de ADN era suficiente para realizar el estudio. En total se analizaron 151 muestras de casos cuya autopsia macroscópica no acabó de determinar completamente la causa de la muerte, las cuales se dividieron en dos cohortes. La primera cohorte correspondió a las miocardiopatías que necesitaron del informe histológico para ser diagnosticadas ya que los cambios estructurales no eran lo suficientemente evidentes. El análisis genético de esta cohorte se realizó mediante secuenciación masiva de las 32 muestras que cumplieron con los criterios de calidad. Por otro lado se estudió la cohorte de muerte súbita inexplicada. En total se pudieron obtener 119 muestras para el estudio, divididas en 95 muestras secuenciadas mediante secuenciación masiva y 24 muestras que debido a la baja calidad se optó por realizar el método Sanger.

1.2 Extracción, cuantificación y calidad del ADN

Mediante el kit “*Chemagic Magnetic Separation Module I*” se extrajo el ADN a partir de la sangre de los casos post mortem. La pureza del ADN se midió mediante el espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop 1000*. La pureza se obtiene a partir de los cocientes obtenidos mediante la relación entre las absorbancias 260/280 y 260/230. El cociente resultante de la primera relación debe tener un valor aproximado a 1.8, cuando los valores son menores se puede tratar de fenoles o proteínas contaminantes ya que absorben cerca de los 280 nm. El cociente resultante de la segunda relación debe oscilar entre 1.8 y 2.2, si los valores son menores puede ser por la presencia de contaminantes copurificados. Si los valores son un poco más elevados no son necesariamente indicativos de contaminación o algún otro tipo de problema.

Para la cuantificación se usó el método mediante el método fluorométrico en *Life Technologies Qubit™*. Éste método permite una medida altamente sensitiva para el ADN de doble cadena (dsDNA) para muestras cuya concentración estén entre los 100 pg/μl y los 1000 ng/μl. La preparación se realizó de la siguiente forma:

- Se preparó el número de tubos de 0.5ml necesarios para cada una de las muestras y los dos estándares requeridos.
- Se preparó las soluciones de trabajo diluyendo el reactivo “Qubit™ dsDNA BR 1:200” en la solución “Qubit™ dsDNA BR buffer”. Para la preparación de los estándares se añadió 190 μl de la solución de trabajo y 10 μl de la solución estándar a cada tubo. Para la preparación de las muestras se añadió 198 μl de la solución de trabajo más 2 μl de ADN de la muestra. El volumen final de cada tubo debe de ser 200 μl.
- Una vez hecha las mezclas, los tubos se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente.

- Finalmente se insertaron los tubos en el fluorómetro Qubit® 2.0 para tomar las lecturas.

El control de integridad del ADN se realizó en un gel de agarosa al 0.8%. Se cargó 100 ng por cada muestra de ADN para asegurarse una banda única de alto peso molecular (>20-25Kb). Cuando el ADN se encuentra degradado aparece un corrimiento de banda y/o bandas de menor peso molecular.

1.3 Secuenciación directa mediante el método Sanger

1.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa y purificación

Antes de la reacción de secuenciación se debe amplificar la región de interés. La amplificación se realiza mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la realización de la PCR se necesita ADN de la muestra, Taq polimerasa, dNTPs, una pareja de “*primers*” complementarios a la región de interés de cada una de las cadenas del ADN y una solución tampón que proporciona un ambiente químico óptimo. La reacción de PCR se realiza en 3 pasos:

- Desnaturalización (94-98°C): la alta temperatura es capaz de romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las hebras del ADN, permitiendo de esta manera que se separen para obtener una secuencia lineal de ADN.
- Hibridación (50-70°C): la pareja de *primers* se hibridan a sus secuencias complementarias en la ADN molde. La temperatura de este paso varía en función de la longitud y la homología con la región de interés de los *primers*.
- Elongación (72°C): Es la temperatura ideal para la actividad de la ADN polimerasa. Ésta añade dNTPs en el extremo 3' del primer hibridado formando así una cadena complementaria.
- Estos tres pasos se repiten de 20 a 35 veces aproximadamente obteniendo una amplificación exponencial.

Para las reacciones se utilizaron los kits “*GoTaq G2 Hot Start Master Mix*” de *Promega* y el kit “*KAPA2G Robust Hot Star*” de *Kapa Biosystem*. La amplificación se realizó en los termocicladores “*Verities PCR*” de *Applied Biosystems*. Por cada reacción se utilizaron 6.25 µl del reactivo de *Promega* “*GoTaq G2 Hot Start*” (contiene polimerasa, dNTPs y la solución tampón), 4.25 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de ADN diluido a 20 ng/µl. Para la amplificación de las regiones más difíciles por su alto

contenido en “AT” o “GC” se utilizó el kit “KAPA2G” que por cada reacción contiene, 0.5 µl de polimerasa, 1.5 µl de dNTPs, 2 µl de buffer y 1 µl de ADN diluido a 20 ng/µl [Tabla 2].

Tabla 2. Se utilizaron 3 perfiles distintos según el tipo de PCR necesario para cada amplificación. *X°C se refiere a una temperatura específica para regiones con alto contenido GC.

Perfil PCR	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Final
Perfil usual	3 minutos a 95°C	40 ciclos: 30 segundos a 94°C 30 segundos a 60°C 45 segundos a 72°C	5 minutos a 72°C	Mantener a 4°C
Perfil alternativo	3 minutos a 95°C	40 ciclos: 30 segundos a 94°C 30 segundos a X°C* 45 segundos a 72°C	5 minutos a 72°C	Mantener a 4°C
Perfil “Touchdown” para KAPA2G	4 minutos a 95°C		5 minutos a 72°C	Mantener a 4°C

Para la purificación del producto de PCR se utilizó el reactivo “Exo-SAP-IT” de *Affymetrix* que contiene dos enzimas hidrolíticas. Este reactivo purifica fragmentos que abarcan menos de 100 pb hasta 20kb. Esta reacción se lleva a cabo en dos pasos, uno a 37°C durante 15 minutos y otro a 80°C durante 15 minutos.

1.3.2 Secuenciación

El producto purificado de PCR se secuenció mediante la metodología Sanger en ambas direcciones. La metodología sanger se basa en secuenciar linealmente mediante el empleo de *primers* para la región de interés en uno de los sentidos de la cadena y de dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados fluorescentemente que carecen de un grupo hidroxilo, de manera que cuando uno de estos se incorpora a la cadena esta no continúa elongándose, obteniendo fragmentos de todos los tamaños. Para la reacción se utilizó el kit “BigDye Terminator v3.1” de *Applied Biosystems*. Para la reacción de secuenciación se utilizó el termociclador el siguiente perfil de 25 ciclos:

- 96°C durante 10 segundos
- 50°C durante 5 segundos
- 60°C durante 4 minutos

El precipitado se realizó en 3 pasos:

- A cada pocillo se añadió 80 µl acetato de sodio a 4°C , después se centrifugó durante 45 minutos a 12000 rpm
- Después de descartar la solución anterior se realizó un lavado con 150 µl etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm.
- Una vez se descartó el etanol, a cada pocillo añadió 10 µl de formamida. Las muestras se incubaron durante 7 minutos a 95°C.

1.3.3 Análisis de la secuencias Sanger

Cada placa se secuenció mediante electroforesis capilar en el secuenciador “3130 Genetic Analyzer” de *Applied Biosystems*. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa “SeqScape v2.5” de *Life Technologies*. Este programa permite introducir las secuencias de referencia de los genes estudiados para después realizar un alineamiento automático de las secuencias obtenidas.

1.4 Secuenciación masiva

Se utilizó la tecnología “*SureSelect^{xt} Target Enrichment Custom 0.5-2.9Mb*” para secuenciación de librerías “*Illumina Paired-End*” de *Agilent Technologies*. Esta tecnología de procesamiento de muestras permite la captura de las regiones de interés a secuenciar. Para la fragmentación del ADN antes del procesamiento de las librerías se utilizó el “*Bioruptor[®] NGS*” de *Diagnode*, con la finalidad de obtener fragmentos de entre 150 y 200 pb. La purificación de los fragmentos se realizó mediante el kit de bolas magnéticas “*Agencourt AMPure XP*” de *Beckerman Coulter*. Para el análisis de

los fragmentos mediante electroforesis de alta resolución se utilizó el *Bioanalyzer2100* de *Agilent Technologies*. Las librerías corrieron en la plataforma de secuenciación “*Miseq System*” de *Illumina*.

Para la correcta realización de librerías se necesita una buena pureza e integridad del ADN tal y como se explica en el anterior apartado de extracción y cuantificación (p.50), así como de disponer de la cantidad y concentración de ADN suficientes para la realización de las librerías como se detalla a continuación.

El que el proceso de preparación de muestras de ADN para secuenciación masiva consiste en un conjunto de pasos que empieza con la fragmentación del ADN y acaba con la obtención de las regiones genómicas de interés para su posterior secuenciado. Los principales pasos de preparación son:

- **Fragmentación:** El primer paso para la creación de las librerías consiste en fragmentar el ADN mediante ondas ultrasónicas con la finalidad de obtener fragmentos de entre 150 y 200 pb. Para este paso se utilizó “*Biorruptor® NGS*” de *Diagnode*, y se cargaron muestras de 100µl con un rango de concentraciones que variaban entre 30 y 55 ng/µl. Tras este paso se realizó uno de purificación con el kit de bolas magnéticas. Finalmente se realizaron dos lavados con etanol y se recuperó el ADN efluyéndolo en 50 µl de agua libre de nucleasas.
- **Valoración:** Mediante la electroforesis de alta resolución se comprueban los fragmentos para comprobar que tengan la medida necesaria. Este paso se realizó con el “*Bioanalyzer*” y con el chip de carga “*DNA 1000*” que tiene capacidad para 12 muestras. A continuación se procedió a cargar los reactivos necesarios (matriz, marcadores y el “ladder” o marcador de peso molecular. Se siguió el proceso de carga detallado en la **figura 7**.

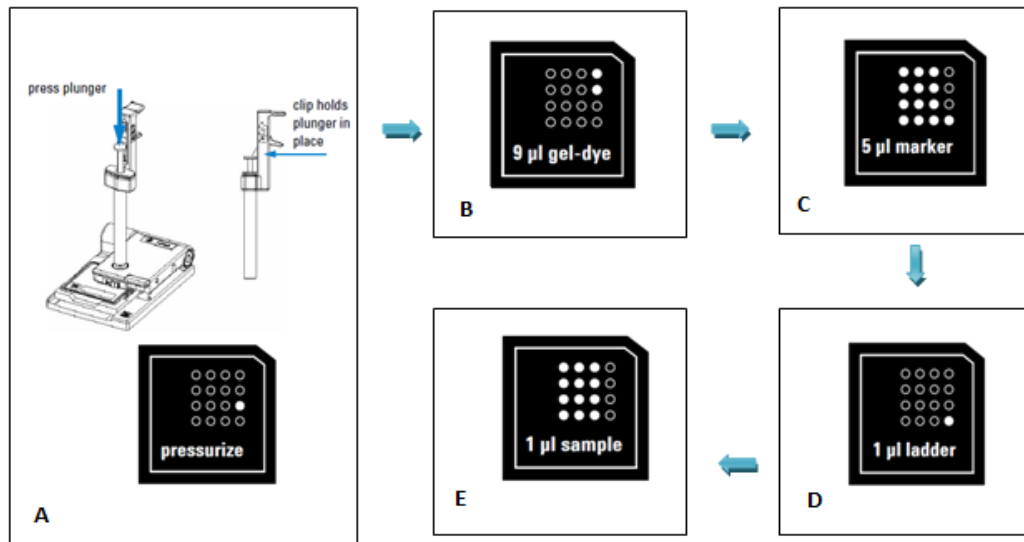


Figura 10. Esquema de los pasos de carga del chip “DNA 1000” para el *Bioanalyzer*. De los pasos A al E se detalla el orden y volúmenes de los reactivos a cargar.

- Reparación de los extremos: A continuación se deben reparar los extremos del ADN fragmentado. Para este paso se utilizan dos tipos de ADN polimerasas con actividad endonucleasa 5'→3' y exonucleasa 3'→5', junto con la enzima *polinucleótido quinasa T4 (T4 PNK)*. Primero se preparó una mix que contenía por cada muestra 35.2 µl de agua libre de nucleasas, 1.6µl de dNTPs, 1 µl de *polimerasa T4*, 2 µl de *polimerasa Klenow*, 2.2 µl de T4 PNK y 10 µl de buffer. A continuación se transfirieron 52 µl de la mix por cada muestra a una placa de 96 pocillos. Finalmente se incubó a 20°C durante 30 minutos y acto seguido se realizó una purificación.
- Adenilación: Antes de realizar la ligación de los adaptadores se necesita adenilar los extremos 3' de los fragmentos. Para esto se necesitan dATPs y la *polimerasa Exo(-) Klenow*, que únicamente tiene actividad *polimerasa 5'→3'*. Para este paso se preparó una mix por muestra que contenía 11µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de dATPs y 3 µl de *polimerasa Exo(-) Klenow*. En una placa de 96 pocillos se transfirieron 20 µl por muestra a cada pocillo y se incubó a

37°C durante 30 minutos. Finalmente se realizó un paso de purificación y una elución en 15 µl de agua por muestra.

- Ligación de adaptadores: A los extremos 3' de los fragmentos se añade una serie de adaptadores mediante la *ADN ligasa T4*. Estos adaptadores presentan complementariedad de bases con las secuencias de cadena simple que se encuentra en la placa o "flowcell" donde transcurre la reacción de secuenciación. En este punto se preparó una mix formada por 15.5 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de adaptadores comerciales, 1.5 µl de *ligasa T4* y 10 µl de Buffer. En una placa de 96 pocillos se repartieron 37 µl de la mix y se le añadieron 13 µl de la muestra. A continuación se incubó la placa 15 minutos a 20°C. Finalmente se realizó un paso de purificación y cada muestra se resuspendió en 32 µl de agua libre de nucleasas.
- Amplificación: Una vez están unidos los adaptadores se realiza una PCR. Para esta reacción se utilizan los *primers* comerciales junto a la enzima *Herculasa II* que tiene actividad endonucleasa 5'→3' y exonucleasa 3'→5'. Se realizó una mix formada por 21 µl de agua libre de nucleasas, 1.25 µl de *primer forward Sure Select*, 1.25 µl de *primer reverse Sure Select Indexing pre-capture PCR*, 1 µl de *Herculasa II*, 0.5 µl de dNTPs y 10 µl de buffer. Se transfirieron 35 µl de la mix a cada pocillo de una placa de 96 más 15 µl de cada muestra [Tabla 3].

Tabla 3. Perfil de temperaturas y tiempo utilizado para el paso de amplificación de los fragmentos con los adaptadores.

Perfil PCR	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Final
Perfil PCR SS	2 minutos segundos a 98°C	5 ciclos: 30 segundos a 98°C 30 segundos a 65°C 60 segundos a 72°C	10 minutos a 72°C	Mantener a 4°C

- Valoración de las muestras: En este paso se realizó una valoración de la concentración con "Qubit" y un análisis de la longitud de los fragmentos con el

“Bioanalyzer”. La concentración final de cada muestra tuvo que ser superior a 30 ng/μl y fragmentos entre 250 y 275 pares de bases.

- Concentración de las muestras: Se centrifugaron las muestras durante 50 minutos a 60°C al vacío en el concentrador. Posteriormente se hidrataron con 3.4 μl de agua libre de nucleasas.
- Hibridación de las librerías: Para realizar la captura con las sondas se realizan 3 mixes diferentes, “*Mix Hybridization buffer*” que optimiza la reacción, “*Mix de librería de captura Sure Select*” incluye fragmentos de ARN marcados con biotina que son complementarios a las regiones de interés, y “*Mix Block Sure Select*”, que contiene reactivos para aumentar la especificidad de la reacción. La mix “*Hybridization buffer*” se preparó por cada muestra con 12,5 μl de “*SureSelect Hyb#1*”, 0,5 μl de “*SureSelect Hyb#2*”, 5 μl de “*Sure Select Hyb#3*” y 6,5 μl de “*Sure Select Hyb#4*”. La mix de librería de captura se preparó por cada muestra con 4.5 μl de agua libre de nucleasas, 2 μL de librería de captura y 0.5 μL de “*RNAse Block*”. La tercera mix “*Block Sure Select*” se preparó con 2.5 μl de “*Sure Select Indexing Block#1*”, 2.5 μl de “*Sure Select Indexing Block#2*” y 0.6 μl de “*Sure Select Indexing Block#3*”. En primer lugar se puso 5.6 μl de “*Mix Block*” por muestra en cada uno de los pocillos de una la fila B de una placa de 96, se añadieron 3.4 μl de la librería con los adaptadores y se incubó 5 minutos a 95°C. Después en la fila A se añadieron 20 μl de la mix “*Hibirdization buffer*” y se realizó una incubación de 5 minutos a 65°C. En la fila C se añadió 7 μl de la mix de la librería de captura y se incubó 2 minutos a 65°C. Después de la incubación se añadieron 13 μl de la fila A y 9 μl de la fila B en la fila C. Finalmente se incubó la mezcla entre 16 y 24h a 65°C. Finalmente se realizó un paso de purificación utilizando un kit de bolas magnéticas con estreptavidina.
- Amplificación de la captura: En este paso se realiza una PCR cuyos *primers* tienen una secuencia índice diferente para cada muestra. La mix se preparó

por cada muestra con 22.5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de Herculasa II, 0.5 µl de dNTPs, 10 µl de buffer, y 1 µl de “*Indexing Post Capture Forward PCR primer*”. A continuación se repartieron 35 µl en una placa de 96 pocillos y finalmente se añadieron 1 µl del primer reverse que contiene la secuencia índice y 14 µl de muestra [Tabla 4].

Tabla 4. Perfil de PCR de la amplificación de la captura.

Perfil PCR	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Final
Perfil PCR SS	2 minutos segundos a 98°C	5 ciclos: 30 segundos a 98°C 30 segundos a 65°C 60 segundos a 72°C	10 minutos a 72°C	Mantener a 4°C

Finalmente se realizó un paso purificación y las muestras se resuspendieron en 30 µl de agua libre de nucleasas.

- Valoración: Se realizó un paso de valoración de la concentración de las muestras para comprobar que fuera superior a 1 ng/µl. También se realizó un análisis de los fragmentos, para comprobar que estuvieran entre 300 y 400 pb.
- Preparación del pool para secuenciación: Se prepararon grupos de librerías a 10nM y se realiza un banco de diluciones para llegar la concentración de carga a 9pM. En este paso se carga junto al grupo de librerías una librería comercial al 1% “*PhiX*” como control de carga.

1.4.1 Panel genético personalizado

Para el análisis genético se seleccionaron 55 genes previamente asociados a MSC “*Sudd InCode*” de *Ferrer InCode* [Tabla 5]. El panel incluye tanto genes codificantes para proteínas estructurales como genes codificantes para canales iónicos y proteínas relacionadas con éstos⁶⁷. Las coordenadas se diseñaron mediante el programa “*eArray*” de *Agilent Technologies*. Todas las isoformas descritas en el

UCSC browser fueron incluidas en el diseño. El tamaño final fue 432,512 kb de regiones codificantes y extremos UTR.

Tabla 5. Lista de los 55 genes distribuidos en función a la enfermedad con la que están relacionados. Algunos genes están asociados con más de una enfermedad.

Enfermedad	Genes
Síndrome de Brugada	<i>KCNE3, CACNA1C, CACNB2, GPD1L, HCN4, SCN5A</i>
Síndrome del QT Largo	<i>ANK2, CACNA1C, CAV3, KCNE1, KCNE2, KCNH2, KCNJ2, KCNQ1, RYR2, SCN4B, SCN5A</i>
Síndrome del QT Corto	<i>CACNA1C, CACNB2, KCNH2, KCNJ2, KCNQ1</i>
Taquicardia Ventricular Catecolaminérgica Polimórfica	<i>CASQ2, KCNJ2, RYR2</i>
Miocardiopatía Hipertrófica	<i>ACTC1, ACTN2, CAV3, CSRP3, GLA, JPH2, LAMP2, LDB3, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYOZ2, PDLIM3, PLN, PRKAG2, RYR2, TCAP, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN, VCL</i>
Miocardiopatía Dilatada	<i>ACTC1, ACTN2, CAV3, CRYAB, CSRP3, DES, DMD, DSC2, DSG2, DSP, EMD, LAMP2, LDB3, LMNA, MYBPC3, MYH6, MYH7, PKP2, PLN, SCN5A, SGCD, TAZ, TCAP, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN, VCL</i>
Miocardiopatía Arritmogénica de Ventrículo Derecho	<i>DES, DSC2, DSG2, DSP, JUP, LMNA, PKP2, PLN, TGFB3, TTN</i>

En los casos cuyas muestras eran de muerte inexplicada y no cumplieron los criterios para el análisis por secuenciación masiva, el estudio genético se limitó, a la secuenciación por la metodología Sanger de los genes que mayoritariamente están asociados a las canalopatías anteriormente descritas como recomiendan diferentes estudios y guías (*SCN5A* -NM_198056-, *KCNQ1* -NM_000218-, *KCNH2* -NM_000238-, *KCNE1* -NM_000219-, *KCNE2* -NM_172201-, *KCNE3* -NM_005472- and *RyR2* -NM_001035-) ^{64, 68}.

1.4.2 Estudio Bioinformático

Las lecturas obtenidas mediante la secuenciación masiva se mapearon para en un las secuencias de referencia para determinar posibles variantes encontradas. Este análisis se lo denomina análisis secundario, donde se recogen los archivos FASTQ que contienen las lecturas de la secuenciación y su calidad, para a continuación ser

analizados mediante programas informáticos determinados. El análisis y mapeo de las lecturas obtenidas se realizó en GEM II. Finalmente con los programas *SAMtools v.1.18*, *GATK v2.4* y otro método propio desarrollado se generaron los archivos VCF para posteriormente anotar y clasificar las variantes secuenciadas.

1.5 Interpretación de los resultados

Las variantes detectadas tanto por secuenciación masiva como por el método Sanger, se compararon en las bases de datos genéticas internacionales *Ensembl Genome Browser*³, *1000 Genomes Browser*¹⁷, *EVS*¹⁸, *ExAc Browser*¹⁹, *HGMD*⁶⁹ y *dbSNP (NCBI)*¹⁶ así como una base de datos propia. Los análisis “in-silico” se realizaron mediante los programas *Mutation Taster*²³, *Provean*²⁴ y *PolyPhen2*²⁵. El alineamiento de las secuencias para aquellas variantes novedades se realizó utilizando la base de datos *UniProt*⁷⁰. También se evaluó el ratio del log2 de la información obtenida entre las muestras. La detección de pérdidas y ganancias se basó en aquellas coordenadas genómicas cuyos ratios indicaron duplicaciones o deleciones (menores que 21.0 o mayores que 0.6, respectivamente). Se tuvieron en cuenta para el análisis las regiones exónicas y las flanqueantes que estaban en un rango de 10 pb. Por la susceptibilidad de ser potencialmente patogénicas, se reportaron las variantes cuya frecuencia alélica (MAF) era menor al 1% en la población general⁷¹.

1.6 Análisis de la patogenicidad

Para la clasificación de las variantes y su análisis de patogenicidad se estableció un criterio propio basado en recomendaciones como la del *Colegio Americano para la Medicina Genética y Genómica* en consorcio con la *Asociación de Patologías Moleculares*⁷². El criterio se estableció de la siguiente manera:

- Variantes posiblemente benignas (VPB): Fueron variantes descritas previamente cualquiera de las bases de datos de población general, cuyos análisis “in-silico” predijeron neutralidad.
- Variantes de significado incierto (VSI): Fueron variantes noveles cuyos análisis “in-silico” predecían neutralidad o diferían entre predicciones. También se clasificaron en este grupo las variantes descritas en población general cuyos “in-silico” diferían entre ellos.
- Variantes posiblemente patogénicas (VPP): Se clasificaron en este grupo variantes asociadas a una enfermedad en las cuales existía cierto grado de duda o cuya evidencia científica no era lo suficientemente fuerte, variantes radicales (inserciones, deleciones o codones stop prematuros), variantes en regiones de splicing a ± 5 nucleótidos del exón, y variantes noveles cuyos análisis “in-silico” predecían patogenicidad.
- Variantes patogénicas (VP): Variantes previamente asociadas y reportadas de ser causante de enfermedad.

IV. Resultados

1 Análisis de la cohorte

El presente estudio iniciado en febrero de 2012 presenta un análisis de 789 casos de muerte natural recogidos durante 3 años. En total se analizaron 609 hombres (77.2%) y 180 mujeres (22.8%). El rango de edad de los casos estudiados oscila entre los 0 y los 50 años con una media de edad global de 38.6 ± 12.2 años. En hombres la media de edad es de 39.3 ± 11.2 años, mientras que en mujeres la media de edad es de 36.2 ± 14.9 . Para un mejor análisis los casos se dividieron en cinco grupos de edad (0-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 años).

1.1 Prevalencia de la muerte natural

La mayor parte de los casos estudiados pertenecieron al rango de mayor edad, que comprende entre los 41 y 50 años, 467 casos (59.2%). También se clasificaron un total de 190 casos (24.1%) en el rango de edad comprendido entre los 31 y los 40 años. Por último los 132 casos restantes (16.7%) fueron menores de 30 años. En cuanto al género, el número de hombres fue mayor en todas las cohortes, rondando entre el 60% y el 70% en los casos menores de 30 años, y llegando casi al 80% en los rangos de edad superiores **[Figura 11]**.

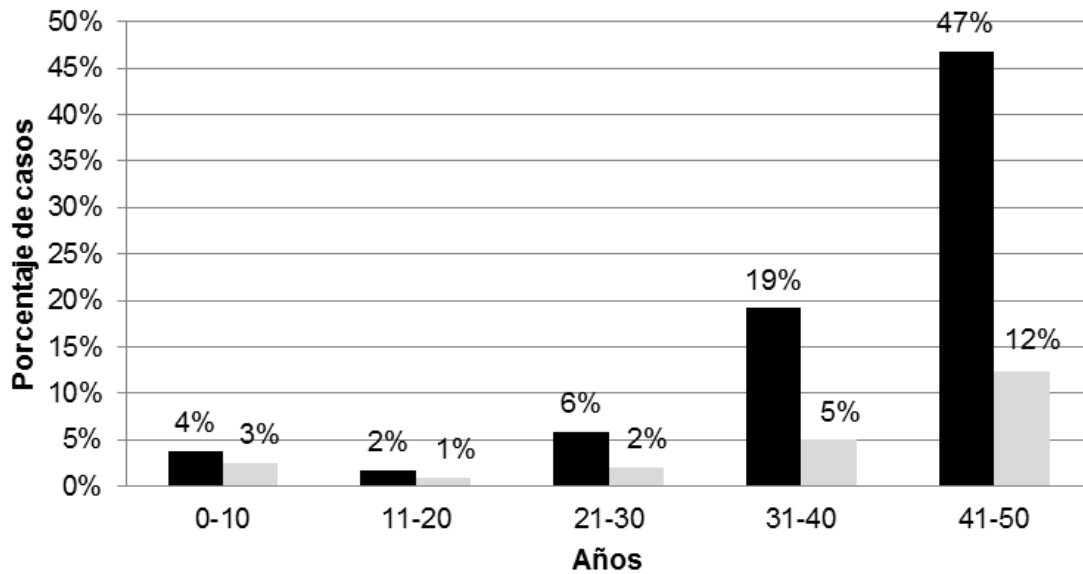


Figura 11. Porcentaje de casos de muerte natural conforme a la edad y el género. El mayor porcentaje de muertes ocurren en los últimos rangos de edad. También en cuanto al género, hay una mayor prevalencia de hombres en todos los rangos de edad. Los hombres están representados en negro y las mujeres en blanco.

1.2 Contexto en el que tuvieron lugar los casos de muerte natural

Los casos se clasificaron en tres grupos, dependiendo del contexto en el cual se encontraban cuando sucedió su muerte: Actividades rutinarias, estrés o ejercicio y durante el sueño. La distribución mostró que la situación de muerte más común fue la actividad diaria (376 casos, 70.6%), seguida de la situación donde los casos se encontraban durmiendo (98 casos, 18.4%) y en menor medida por la situación de muerte sucedida bajo estrés o ejercicio (58 casos, 11%). La distribución de los casos divididos en rangos de edades y distribuidos de manera relativa a cada contexto de la muerte, mostró que la actividad diaria tuvo una mayor prevalencia en los mayores de 40 años, en cambio en los menores hubo una prevalencia ligeramente mayor de los contextos de estrés/ejercicio y durante el sueño **[Figura 12]**.

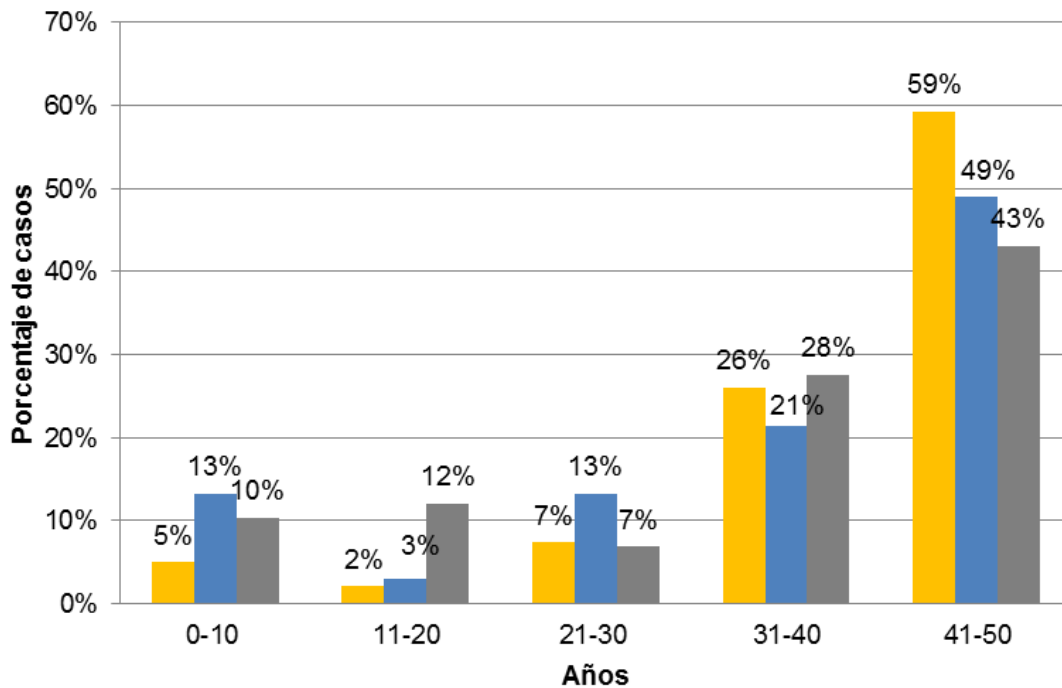


Figura 12. Contexto de la muerte. Las actividades diarias tuvieron una mayor prevalencia en los casos mayores de 30 años. Las actividades diarias están indicadas en color amarillo, en azul los casos que estaban durmiendo y por último en gris oscuro estrés y ejercicio.

La distribución de los casos de manera relativa a cada situación de la muerte mostró una mayor prevalencia de las causas cardíacas en la situación de estrés y ejercicio (51.7%), mientras que las patologías vasculares tuvieron una mayor prevalencia en el contexto de actividad diaria (20.2%) y las causas inexplicadas tuvieron una mayor prevalencia en el contexto de muerte durante el sueño (37%) y estrés/ejercicio (34%); finalmente el resto de causas no mostraron grandes diferencias en entre los diferentes grupos.

1.2.1 Autopsia macroscópica

Después de una primera valoración forense macroscópica, se pudo determinar la causa de la muerte (autopsia macroscópica positiva) en 506 casos (64%), mientras que los 283 casos restantes (36%) quedaron inconclusos (autopsia macroscópica negativa).

1.2.2 Autopsia macroscópica positiva

De los 506 casos descritos anteriormente, la investigación forense los clasificó según las siguientes causas de muerte: cardíacas en 230 casos (45%), siendo la enfermedad coronaria la causa más común (127 casos, 25% del total); vasculares (embolismos o hemorragias) en 137 casos (27%); pulmonares/respiratorias en 91 casos (18%), siendo los procesos infecciosos responsables de 47 casos (9% del total); y digestivos en 21 casos (4%). Finalmente en los 27 casos restantes (5.3%), se detectaron otras causas menores entre las que estaban incluidos 8 casos neurológicos no vasculares, 7 carcinogénicos, 6 endocrinológicos, 2 obstétricos y 3 fallos multisistémicos. La mayor parte de estos casos macroscópicos positivos fueron hombres (383 casos, 75.7%).

1.2.3 Autopsia macroscópica negativa. Análisis microscópicos

La autopsia macroscópica no fue completamente capaz de determinar la causa de la muerte en 283 casos (35%). Estos casos se los denominó macroscópicos negativos, y requirieron de análisis histológicos para acabar de determinar la causa de la muerte. La causa de la muerte se finalmente se dividió en los siguientes subgrupos:

- Cardíacos, en los cuales se incluyen 98 síndromes coronarios (presencia de trombo, infarto miocárdico o estenosis severa >75%), 36 casos cardíacos potencialmente heredables cuya histología demostró una miocardiopatía.

- Casos inexplicados, que incluyeron 149 (52.6%) cuyos análisis histológicos no pudieron identificar ninguna alteración en el corazón. Dentro de este grupo se identificaron 23 casos (12.6%) cuya muerte ocurrió antes del primer año de edad (SIDS).

1.2.4 Muerte natural conforme al contexto y la autopsia final

Con la inclusión de los análisis histológicos se pudo determinar que de los 789 casos totales, 364 (46%) lo fueron debido a causas cardíacas, mientras que 149 (18.8%) casos siguieron sin poderse determinar (inexplicados). Por otra parte las causas cardíacas fueron las más comunes globalmente en todos los contextos de muerte, seguida de las inexplicadas. Pero la distribución de manera relativa a cada uno de los contextos de muerte mostró que las causas cardíacas fueron más prevalentes en el contexto de estrés y ejercicio (51.7%), las patologías vasculares tuvieron una mayor prevalencia en el contexto de actividad diaria (20.2%), mientras que en las causas inexplicadas hubo una mayor prevalencia del contexto de muerte durante el sueño (37%) y estrés/ejercicio (34%); finalmente en el resto de causas no se mostraron grandes diferencias entre los diferentes grupos **[Figuras 13, 14]**.

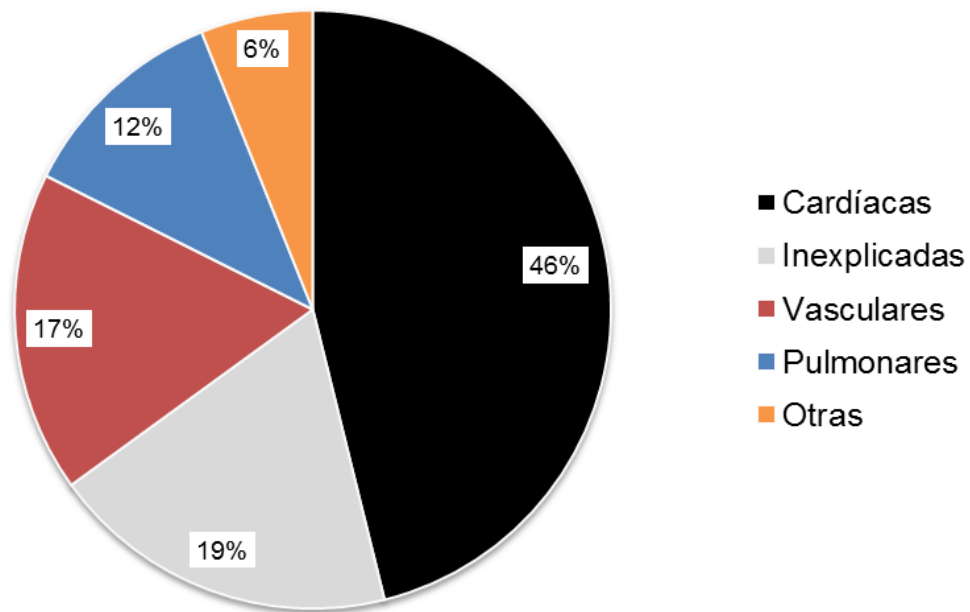


Figura 13. Gráfica de sectores de los porcentajes de distribución de las diferentes causas de muerte natural. En el total de casos la muerte debida a causas cardíacas fue la mayoritaria, seguida de las causas inexplicadas y las vasculares.

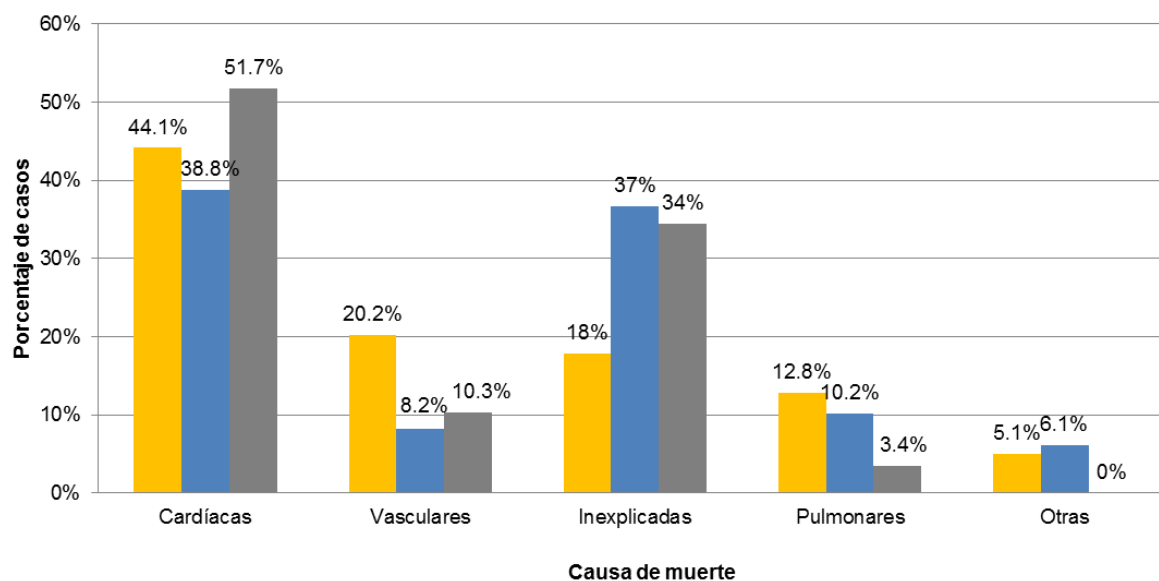


Figura 14. Causa de la muerte acorde al contexto de la muerte. La distribución de manera relativa muestra que las causas cardíacas fueron prevalentes en el contexto de estrés/ejercicio, mientras que las vasculares lo fueron durante las actividades diarias. En las causas inexplicadas hay una mayor prevalencia de los contextos de muerte durante el sueño y en situación de estrés y ejercicio. Las actividades diarias corresponden al color amarillo, durante el sueño corresponde al color azul, y en situación de estrés/ejercicio al color gris.

1.2.5 Distribución de los casos por rangos de edad

Finalmente todos los casos de muerte natural se distribuyeron en cinco rangos de edad [Figura 15]:

- **Cohorte de 0 a 10 años:** Este subgrupo incluyó un total de 50 casos (6.33%). Estos se distribuyeron en, 7 casos (14%) que murieron debido a causas cardíacas (2 DCM, 2 miocarditis, 1 LQTS, 1 causa cardíaca no especificada), 1 caso (2%) debido a accidente vascular cerebral, 5 casos (10%) a afecciones respiratorias (2 infecciosas, 1 aspiración, 1 asmática y 1 obstructiva), 3 casos (6%) a causas cerebrales/neurológicas (2 infecciosos y 1 malformación), y 1 caso (7.1%) fue nonato. Finalmente en 33 casos (66%) permanecieron como inexplicados (23 SIDS).
- **Cohorte de 11 a 20 años:** Este subgrupo incluyó un total de 20 casos (2.5%). Estos se distribuyeron en, 4 (20%) casos que murieron debido a causas cardíacas (1 HCM, 1 DCM, 1 congénito y 1 miocarditis), 4 (20%) a accidentes vasculares (3 pulmonares y 1 digestiva). Finalmente 7 casos (35%) permanecieron como inexplicados.
- **Cohorte de 21 a 30 años:** Este subgrupo incluyó 62 casos (7.8%). De estos un total de 19 casos (31%) murieron debido a causas cardíacas (6 coronarios, 5 HCM, 1 DCM, 2 ARVC, 1 miocarditis, 1 congénito, 1 trasplante, 1 valvular y 1 causa cardíaca no especificada), 9 (15%) a accidentes vasculares (5 pulmonares, 1 aórtico, 2 neurológicos y 1 digestivo), 10 (16.1%) a afectaciones respiratorias (4 infecciones, 3 edemas, 2 aspiraciones y 1 asmático), 1 (1.6%) a causas cerebrales/neurológicas, 1 (1.6%) a otras causas (carcinogénicas). Finalmente 22 casos (35.5%) resultaron inexplicados.
- **Cohorte de 31 a 40 años:** El subgrupo incluyó 190 casos (24.1%). De estos, 82 (43.2%) murieron debido a causas cardíacas (49 coronarias, 11 no

especificadas, 6 DCM, 8 HCM, 1 ARVC, 3 miocarditis, 2 congénitas y 2 Miocardiopatías no clasificables), 38 (29.9%) a accidentes vasculares (15 pulmonares, 9 neurológicas, 8 aorticas y 6 digestivas), 28 (14.9%) a afectaciones respiratorias (12 infecciosas, 7 edemas, 3 aspiraciones, 2 asmáticas y 4 obstructivas), 3 (1.6%) a cerebrales/neurológicas (2 infecciosas y 1 edema), y 8 (4.2%) a otras causas (3 digestivas, 4 carcinogénicas y 1 fallo multiorgánico). Finalmente 31 (16%) casos resultaron inexplicados.

- **Cohorte de 41 a 50 años:** Finalmente esta cohorte incluyó 467 casos (59.2%). De estos, 252 (54%) murieron debido a causas cardíacas (169 coronarias, 24 no especificadas, 18 DCM, 34 HCM, 2 ARVC, 2 valvulares y 1 pericarditis), 85 (18.2%) a accidentes vasculares (31 pulmonares, 28 digestivas, 19 neurológicas y 7 aorticas), 46 (10%) a afectaciones respiratorias (27 infecciosas, 10 edemas, 6 obstructivas, 1 asmática, 1 aspiración y 1 hemorrágica), y 27 (7.7%) debido a otras causas (17 digestivas, 6 carcinogénicas, 1 endocrina, 1 fallo multiorgánico, 1 obstétrico y 1 infecciosa renal). Finalmente 56 (12%) casos resultaron inexplicados.

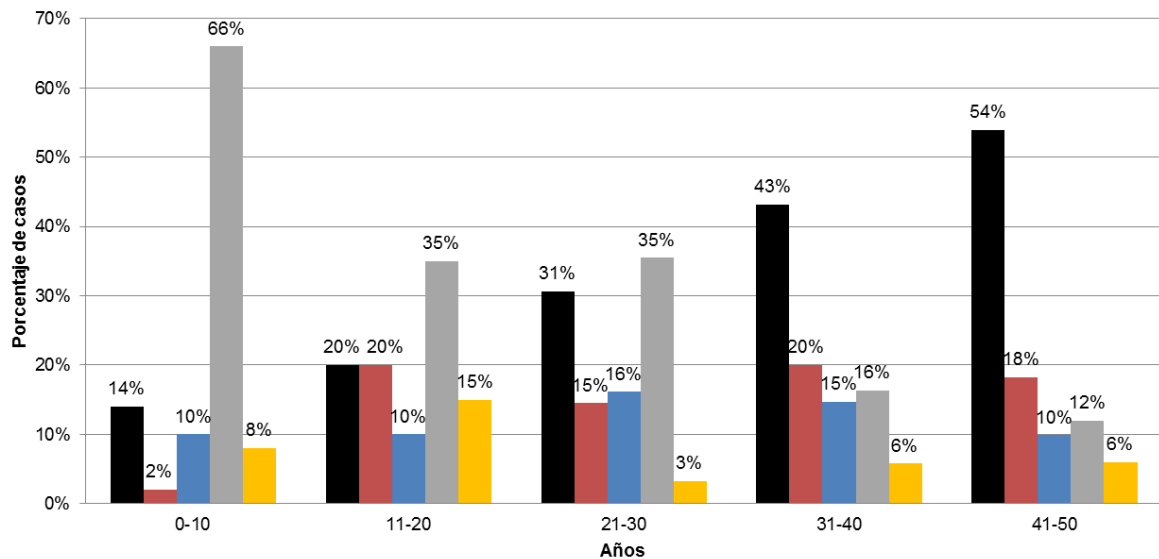


Figura 15. Porcentajes de distribución de los casos de muerte natural en relación a cada rango de edad. Se observa que hay un incremento de las causas cardíacas con la edad, alcanzando el 54% en el grupo de edad mayor. Por otro lado las causas inexplicadas fueron mucho más prevalentes en los menores de 30 años, alcanzando el 66% de los casos en la cohorte más joven. Las causas inexplicadas están representadas con el color gris, mientras que las causas cardíacas en color negro. Las causas vasculares están representadas rojo, las pulmonares en azul y el resto de causas en amarillo.

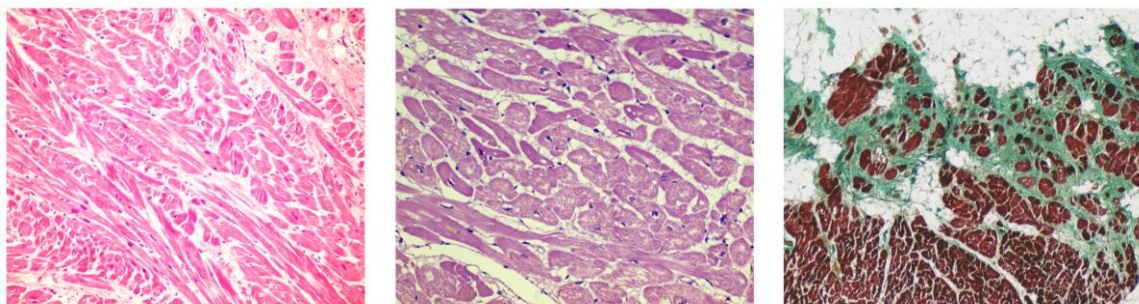


Figura 16. Figuras representativas de imágenes microscópicas de casos con miocardiopatías. Izquierda, miocardiopatía hipertrófica (Hematoxilina-Eosina, 20X); Centro, miocardiopatía dilatada (Hematoxilina-Eosina, 20X); Derecha, miocardiopatía arritmogénica (Tricrómica de Masson, 10X).

2 Autopsia molecular: Análisis genéticos

Para definir mejor la etiología de la muerte natural en nuestra cohorte, y de esta manera mejorar el diagnóstico para poder definir qué miembros familiares deberían realizarse una evaluación clínica, se decidió realizar análisis genéticos a aquellos casos que potencialmente pudieran tener una miocardiopatía heredable, de autopsia inexplicada y en los casos con isquemias microscópicas.

2.1 Análisis genético del subgrupo de miocardiopatías

La cohorte de miocardiopatías comprendió un total de 32 muestras (10 DCM, 19 HCM, 1 ARVC y 2 Miocardiopatías no clasificables), 28 hombres (87.5%) con una media de edad de 37.69 ± 11.26 años. Esta cohorte se consideró macroscópica negativa, ya que fueron necesarios los análisis histológicos para acabar de determinar las diferentes patologías. Todos los casos fueron analizados mediante secuenciación masiva para el panel de 55 genes. Los análisis genéticos detectaron un total de 62 variantes raras, siendo doce de estas (19.4%) noveles. Del total de variantes 12 (19.4%) fueron encontradas en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas y 50 (80.6%) en genes estructurales [Tabla 8]. De acuerdo al criterio establecido para la clasificación de las variantes 2 (3.2%) fueron consideradas VPB, 39 (62.9%) VSI, 13 (20.1%) VPP, y 8 (12.9%) VP [Figura 17].

En total se detectaron 25 casos (78.1%) portadores de al menos una variante rara. También se encontró en todos estos casos variantes raras en genes codificantes para proteínas estructurales. Sin embargo 11 casos fueron portadores de variantes en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas, 10 de estos casos con variantes en ambos tipos de genes. En total acorde a la clasificación de las variantes se identificaron 15 casos (46.8%) portadores de VPP y/o VP (12 en HCM, 2 DCM y 1 Miocardiopatía no clasificable) [Figura 18].

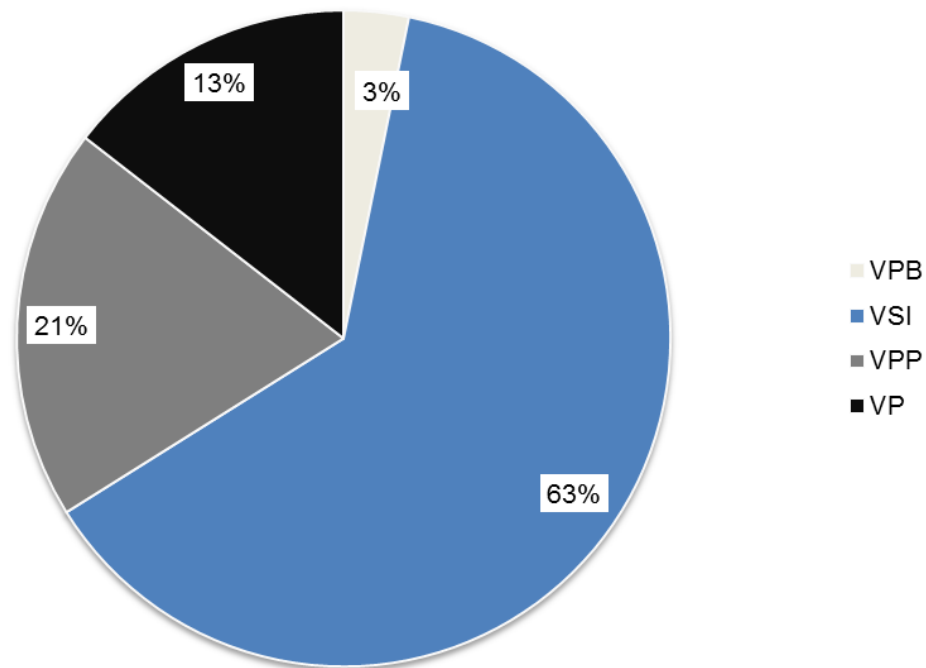


Figura 17. Gráfica de los porcentajes de distribución de las variantes encontradas en los casos de miocardiopatías analizadas por secuenciación masiva.

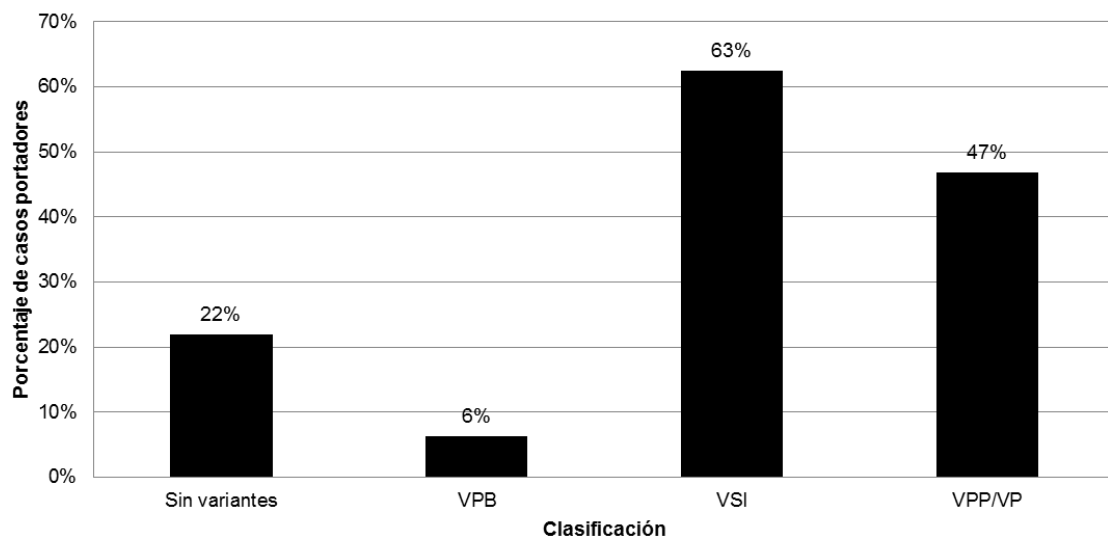


Figura 18. Distribución de los casos portadores de variantes según su tipo. Como se observa en el gráfico un 47% de casos fueron identificados con VPP o VP, mientras que a un 22% no se les encontró variantes. Un 63% de los casos fueron portadores de VSI y un 6% de VPB.

2.2 Análisis genético del subgrupo de muerte súbita inexplicada

Se realizaron análisis genéticos a 119 muestras, 81 hombres (68%), con una media de 28.29±17.4 años y cuyo informe forense fue negativo tanto a nivel macroscópico como a nivel histológico. Se realizaron análisis genéticos de secuenciación masiva a 95 muestras que cumplían los criterios de calidad necesarios, mientras que las 24 muestras que no cumplían los estándares de calidad y/o integridad se analizaron, mediante el método Sanger, 7 genes asociados principalmente a canalopatías.

La secuenciación mediante el método Sanger identificó 5 (21%) casos positivos con al menos una variante rara entre las 24 muestras analizadas. En cambio, el análisis mediante secuenciación masiva identificó 76 (80%) casos portadores de al menos una variante rara entre las 95 muestras analizadas; 41 (43.2%) con variantes en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas, y 64 (67.3%) con variantes en genes codificantes para proteínas estructurales **[Tabla 8]**. En total se identificaron 49 muestras (41.2%) portadoras de variantes VPP y/o VP **[figura 19]**. El análisis genético identificó un total de 197 variantes raras, 6 detectadas por el método Sanger y 191 por secuenciación masiva. Treinta y seis (18.3%) fueron noveles. De las detectadas por secuenciación masiva 51 (26.7%) fueron en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas y 140 (73.3%) en genes codificantes para proteínas estructurales. Acorde a nuestro criterio el total de variantes secuenciadas por las dos técnicas se clasificaron en 16 (8.1%) como VPB, 105 (53.3%) VSI, 60 (30.5%) VPP y 21 (10.7%) VP **[figura 20]**.

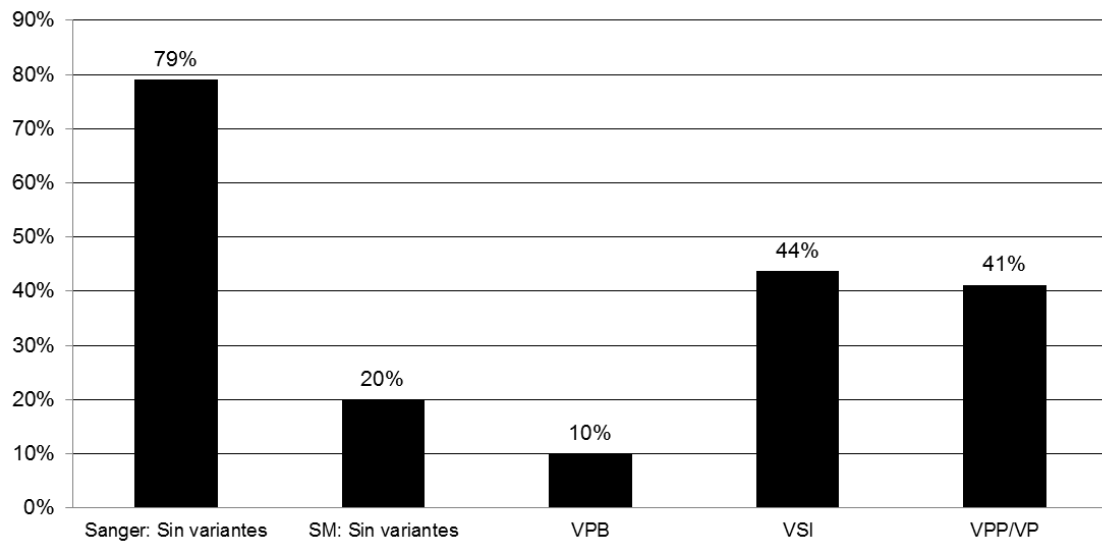


Figura 19 Distribución de los casos portadores de variantes según su tipo. Como se observa en el gráfico la secuenciación masiva (SM) identifica un mayor número de portadores (SM) para variantes raras. En total se identificaron un 41% de casos tuvieron VPP o VP. Un 44% de los casos tuvieron variantes de significado incierto mientras que un 10% únicamente presentaron variantes VPB.

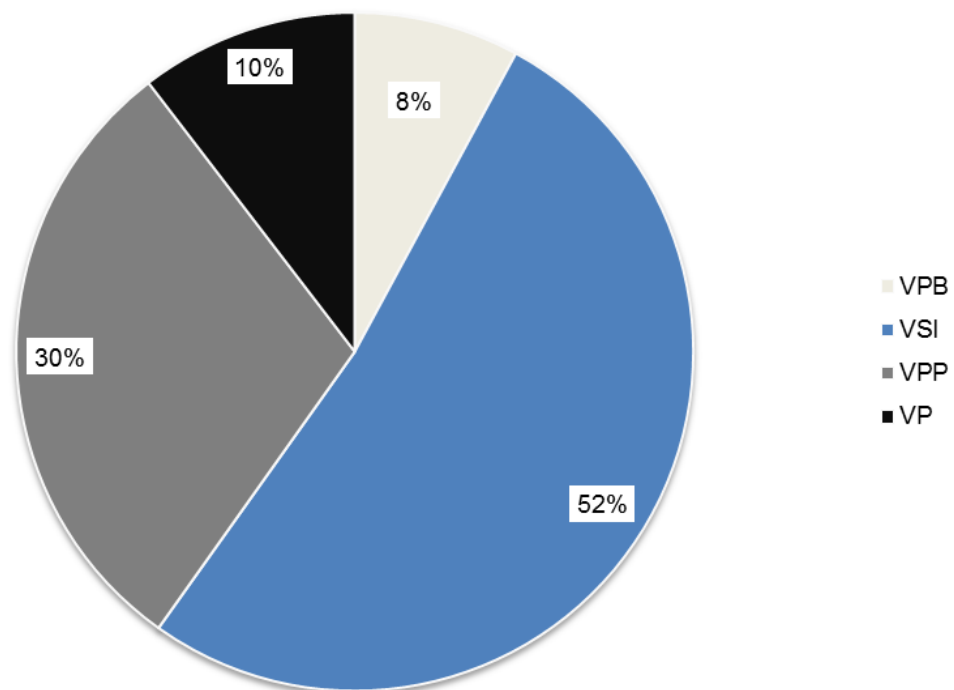


Figura 20. Gráfica de los porcentajes de distribución de las variantes encontradas en los casos de muerte súbita inexplicada analizadas por secuenciación masiva y Sanger.

Para un mejor análisis de los resultados, estos se distribuyeron casos en 5 rangos de edad:

- **Cohorte de 0 a 1 años (SIDS):** El menor grupo de edad incluyó un total de 18 muestras (6 hombres, 33.3%, y 12 mujeres, 66.7%). Se analizaron 8 muestras por Sanger y 10 mediante secuenciación masiva. En total se detectaron 9 muestras portadoras de al menos una variante genética rara (50%). De estas, 4 (22.2%) fueron portadoras de variantes raras en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas y 6 (33.3%) en genes codificantes para proteínas estructurales. En total se identificaron 5 muestras (17.9%) portadoras de VPP. Los análisis de secuenciación genética mediante ambas tecnologías detectaron un total de 21 variantes raras, 2 mediante Sanger y 19 mediante secuenciación masiva. Del total de variantes 3 (14.3%) fueron noveles. Finalmente el criterio de clasificación para las variantes identificó 6 (28.6%) VPB, 8 (38.1%) VSI y 7 (33.3%) VPP.
- **Cohorte de 1 a 10 años:** Este grupo de edad incluyó 10 muestras (8 hombres, 80%, y 2 mujeres, 20%). Se analizaron 3 muestras mediante el método Sanger y 7 mediante secuenciación masiva. En total se detectaron 7 muestras portadoras de al menos una variante genética rara (70%). De estas, 4 (40%) fueron portadoras de variantes raras en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas y 6 (60%) en genes codificantes para proteínas estructurales. En total se identificaron 5 muestras (50%) que eran portadoras de VPP y/o VP. Los análisis de secuenciación genética mediante ambas tecnologías detectaron un total de 16 variantes raras, 1 mediante Sanger y 15 mediante secuenciación masiva. Del total de variantes 3 (18.8%) fueron noveles. Finalmente el criterio de clasificación para las variantes identificó, 6 (37.5%) VSI, 9 (56.3%) VPP y 1 (6.25%) VP.

- **Cohorte de 11 a 20 años:** Este grupo de edad incluyó 7 muestras (5 hombres, 71% y 2 mujeres 28.6%). Dos muestras se secuenciaron mediante Sanger y 5 mediante secuenciación masiva. Mediante Sanger no se pudo identificar ninguna variante. El análisis mediante secuenciación masiva identificó 4 muestras (80%) portadoras de al menos una variante rara, 3 (52.7%) fueron portadoras de variantes en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas, y 4 (57.1%) en genes codificantes para proteínas estructurales. El criterio de clasificación identificó 2 muestras (28.6%) portadoras de variantes VPP y/o VP. En total se identificaron 20 variantes raras, todas mediante secuenciación masiva. De estas, 2 (20%) fueron noveles. Finalmente la clasificación para las 10 variantes genéticas identificó 4 (40%) como VSI, 4 (40%) VPP y 2 (20%) PV.
- **Cohorte de 21 a 30 años:** Este grupo incluyó 19 muestras (14 hombres, 73.7% y 5 mujeres, 26.3%). Todas fueron analizadas mediante secuenciación masiva. El análisis genético detectó 16 muestras (84.2%) portadoras de variantes raras, 12 (63.2%) en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas, y 15 (79%) en genes codificantes para proteínas estructurales. El criterio de clasificación identificó 9 muestras (47.4%) portadoras de VPP y/o VP. En total se identificaron 42 variantes raras, 2 detectadas por Sanger y 40 por secuenciación masiva. De estas, 10 (23.8%) fueron noveles. Finalmente la clasificación de las variantes identificó 29 (69.1%) como VSI, 10 (23.8%) VPP, y 3 (7.1%) VP.
- **Cohorte de 31 a 40 años:** Este grupo incluyó un total de 29 muestras (20 hombres, 69% y 9 mujeres, 31%). Se secuenciaron 3 muestras mediante Sanger y 26 mediante secuenciación masiva. Mediante Sanger se identificó 2 (66.7%) de muestras portadoras de variantes raras. Mediante secuenciación masiva se identificaron 18 muestras (62.1%) portadoras de variantes raras, 6 (33.3%) en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas, y 16

(55.2%) en genes codificantes para proteínas estructurales. El criterio de clasificación identificó un total de 13 (44.8%) de muestras portadoras de VPP y/o VP. El análisis genético por ambos métodos identificó un total de 44 variantes raras, 2 (4.5%) detectadas por Sanger y 42 por secuenciación masiva. De estas, 7 (16%) fueron noveles. Finalmente el criterio de clasificación identificó 5 (11.4%) VPB, 22 (50%) VSI, 11 (25%) VPP y 6 (13.6%) VP.

- **Cohorte de 41 a 50 años:** El último grupo de edad incluyó 36 muestras (28 hombres, 77.8% y 8 mujeres 22.2%). Un total de 8 muestras se analizaron mediante Sanger mientras que 28 pudieron ser analizadas mediante secuenciación masiva. El análisis mediante Sanger identificó 1 (12.5%) portadora de una variante rara. El análisis mediante secuenciación masiva identificó 24 (85.7%) portadoras de variantes raras, 14 (50%) en genes codificantes para canales iónicos o proteínas asociadas, y 20 (71.4%) en genes codificantes para proteínas estructurales. El análisis genético realizado con ambas tecnologías identificó un total de 64 variantes raras, 1 (1.6%) detectada por Sanger y 63 (98.4%) por secuenciación masiva. De estas, 13 (20.3%) fueron noveles. Finalmente el criterio de clasificación identificó 5 (7.8) VPB, 33 (51.6%) VSI, 17 (26.6%) VPP, y 9 (14.1%) VP.

V. Discusión

1 Caracterización de la población

En el presente estudio se ha analizado de manera prospectiva una gran cohorte de muerte natural evaluando su etiología, así como el valor de la genética para la identificación de la causa de la muerte. Gracias a la colaboración del Instituto de Medicina Legal de Cataluña junto al Centro de Genética Cardiovascular de Girona perteneciente al Institut d'investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI) y Universitat de Girona (UdG) se ha logrado recopilar y analizar la información de una gran cohorte de casos de muerte súbita de la región de Barcelona entre los años 2012 y 2015. En total este estudio se ha analizado un total de 789 casos menores de 50 años que murieron de manera súbita. La media de edad respecto a las víctimas (39.3 años) y el género (77.2% hombres), con un incremento progresivo de la prevalencia de la muerte con la edad, y una predominancia del género masculino en todos los rangos de edad ^{73, 66}.

La principal causa de muerte fue la debida a la enfermedad cardíaca (81.1%), similar a otras cohortes. En un 56.9% de los casos la causa de la muerte fue identificada como enfermedad coronaria, incluyendo en este grupo tanto infartos evidentes de miocardio hasta casos con estenosis coronaria severa, debido a que inducen arritmias producidas por isquemias ⁷⁴. Estos porcentajes no son mucho más diferentes de los encontrados en otros estudios, los cuales atribuyen un 40% de las muertes totales a enfermedades isquémicas del corazón ⁷⁵. También en otros estudios relacionados con la MSC se ha reportado que hasta un 80% de estas muertes son debidas a la enfermedad coronaria. Las diferencias entre porcentajes pueden ser debidas a la inclusión únicamente de casos menores a 50 años de edad en nuestra cohorte. La prevalencia de la enfermedad coronaria es proporcional a la edad, siendo una de las principales causas de muerte en personas mayores de 40 años. En 2015, *Vassalini et al*, encontraron presencia de alteraciones isquémicas en el 18.5% de casos cardíacos estudiados de una cohorte de pacientes menor a 40 años de edad,

mientras que otros estudios relacionados con la incidencia de la enfermedad coronaria asociada a la MSC presentan porcentajes que con un rango entre el 48 y el 73% ^{76,77}. Estas discrepancias pueden ser explicadas tanto por los criterios diagnósticos como por el rango de edad incluido en estos estudios.

En cuanto a la situación de la muerte, la mayoría de casos de muerte súbita ocurrieron en población mayor a 40 años de edad, durante la actividad diaria y situaciones de estrés y ejercicio. En la población joven en cambio hay más casos de muerte súbita debida a miocardiopatía durante una situación de estrés o ejercicio. Estos resultados están en concordancia con otras cohortes publicadas y datos conocidos que demuestran que el ejercicio es un factor de riesgo para la muerte súbita cardíaca.

La autopsia macroscópica fue capaz de definir la causa de la muerte en la mayor parte de los casos mayores a 30 años. En cambio, en los casos menores de 30, hubo una mayor presencia de casos con autopsia macroscópica negativa. Después del análisis histológico de estos casos, se encontró que adicionalmente un 17% de estos casos eran debidos a causas cardíacas, tanto miocardiopatías como causas coronarias, incrementando a un 46% el total de casos cuya muerte fue debida a causas cardíacas, con un porcentaje total de enfermedad coronaria del 28.5%. En la población joven la principal causa de muerte fue debida a miocardiopatías, y en la menor de 10 años de edad fueron las causas congénitas, siendo estos datos similares a publicaciones previas ^{75,77}. Por otro lado finalmente cerca del 19% de los casos permanecieron inexplicados, resultado también en concordancia con el estudio realizado por *Vassalini et al. 2015* ⁷⁸. Otros estudios señalan porcentajes con rangos que abarcan del 5% al 40% de los casos. Estas diferencias entre los porcentajes pueden ser debidas tanto a la cohorte seleccionada como a las diferencias entre los protocolos forenses utilizados.

En 2015, la Sociedad de Medicina Legal Suiza creó un grupo de trabajo formado por clínicos, genetistas moleculares y cardiólogos, con la esperanza de homogeneizar los aproximamientos relacionados con las investigaciones en el área de la MSC. Los principales puntos de recomendación fueron (1.) establecer un procedimiento forense para todos los casos de víctimas de MSC (una autopsia molecular o test genético post mortem), (2.) la recolección y el almacenamiento de muestras adecuadas para el análisis genético, (3.) la comunicación con las familias y (4.) un aproximamiento multidisciplinar que incluya el consejo genético ⁷⁹. Sin embargo, a pesar de estas recomendaciones y la disponibilidad actual de la tecnología de secuenciación genética masiva, estos análisis todavía no se realizan de manera rutinaria como parte de la autopsia. Está bien establecido que estos test genéticos pueden ayudar a identificar la causa de la muerte en un gran número de casos inconclusos, además de ayudar a los clínicos a identificar los defectos genéticos que pueden estar también presentes en los familiares en riesgo. De manera similar, de acuerdo con las actuales guías clínicas cardiológicas ⁶⁵, el uso de una autopsia molecular debería al menos ser considerada en eventos de muerte súbita cardíaca inexplicada con sospecha de una enfermedad hereditaria. Aún no está claro cuando sospechar de una enfermedad cardíaca hereditaria, ya que a menudo en la mayoría de los casos la muerte es la primera manifestación clínica en las familias. Así mismo, según las mismas guías clínicas la identificación de una variante patogénica asociada a SQTL o a TVCP es criterio diagnóstico de la enfermedad. Teniendo en cuenta estos datos, el uso de la autopsia molecular debería ser obligatorio con el fin de intentar proporcionar un diagnóstico que beneficiaría a la identificación de los familiares en riesgo. Por lo tanto, el principal objetivo de este estudio ha sido evaluar si gracias a la autopsia molecular se pueden incrementar el número de identificaciones de las potenciales etiologías de muerte.

2 Estudio genético

Se ha realizado una investigación genética en todos los casos clasificados como miocardiopatías microscópicas así como en los casos cuya autopsia macroscópica y microscópica fueron negativas y que por lo tanto se clasificaron como casos inexplicados. Todas las muestras que cumplían los criterios de calidad e integridad del ADN se analizaron por nuestro panel de secuenciación masiva, mientras que aquellas con peor calidad se analizaron mediante Sanger para un número limitado de genes. Treinta y dos muestras reclasificadas como miocardiopatías después de los análisis histológicos fueron analizadas por secuenciación masiva, donde 19 de estas mostraron alteraciones debidas a MCH. Estos resultados están en concordancia con otros estudios que señalan que la MCH es la miocardiopatía que tiene una mayor prevalencia en contexto de la muerte súbita cardíaca. Los análisis genéticos para el total de muestras analizadas mostraron que prácticamente un 40% de los casos eran portadores de al menos una variante clasificada como VPP o VP, siendo la mayor parte de las variantes restantes clasificadas como VSI.

También se analizaron 119 clasificadas como inexplicadas. Los análisis genéticos identificaron un total de 41.2% de casos portadores de al menos una variante clasificada como VPP o VP, mientras que gran parte del resto de variantes encontradas fueron clasificadas como VSI. Sin embargo estos porcentajes difieren según el tipo de estudio y el número de genes que se analizan. Entre diferentes estudios post mortem donde únicamente se analizan los principales genes asociados a la muerte súbita, las frecuencias difieren entre el 11 y el 26%^{80, 74, 81, 82}. En la presente cohorte de 119 casos inexplicados se ha identificado que alrededor de un 40% eran portadores de alguna variante potencialmente patogénica. Concretamente en el conjunto de los casos menores de 31 años, el porcentaje alcanza el 40.4%. La literatura científica actual ha establecido que entre un 10% y un 25% de los casos de

MSI adultos, y hasta un tercio de los casos infantiles y juveniles, pueden ser debidos a canalopatías cardíacas^{83, 84, 67}. Estos estudios principalmente se centran en analizar los principales genes asociados a canalopatías. Por otra parte nuestro estudio genético presenta un porcentaje más elevado ya que es debido a la inclusión de genes asociados tanto a canalopatías como a miocardiopatías, ya que recientemente se han empezado a asociar alteraciones en este tipo de genes a patologías arrítmicas en corazones sin ninguna alteración estructural remarcable^{85, 86}. En concordancia con nuestros resultados, estudios post mortem recientes han identificado porcentajes que varían entre el 30% y el 40% de muestras portadoras de variantes potencialmente patogénicas^{87, 88, 89, 90}. De las 119 muestras analizadas, se identificaron 21 variantes en 16 casos (13.4%). De estas, 5 variantes estaban asociadas a SQTl, y 2 a SBr. Las guías clínicas recientes recomiendan el uso de los test genéticos post mortem en casos cuya evidencia clínica sugiere que pueden ser debidas a SQTl o TVPC^{64, 65}. Por lo tanto en concordancia con las directrices marcadas por las guías, en estos casos se pudo llegar a encontrar la posible causa de la muerte. Adicionalmente, también se encontraron 51 VPP en un total de 38 casos (31.9%). Mientras que la patogenicidad de estas variantes no se puede determinar completamente, no las exime de su potencial patogénico que pueda estar asociado a una enfermedad hereditaria, por lo tanto es esencial estudiar a los miembros familiares de estos casos para investigar la segregación de estas variantes. En una publicación reciente de *Bagnall et al*, se realizó análisis de secuenciación masiva en una cohorte post mortem de 490 muestras de muerte súbita con una edad comprendida entre los 1 y los 35 años de edad⁷⁴. Identificaron aproximadamente un 35% de variantes clasificadas como VSI, de las cuales gracias a la segregación familiar pudieron clarificar su rol en un 15% de los casos, concluyendo de esta manera que la autopsia combinada con los análisis genéticos en los familiares es la mejor manera de identificar la causa de la muerte en aquellos que murieron de manera súbita.

3 Solapamiento entre genes y autopsia

En nuestro estudio hemos identificado muestras tanto de miocardiopatías que son portadoras de variantes raras genes codificantes para canales iónicos y otras proteínas asociadas. También, de una misma manera se encontraron variantes raras en genes codificantes para proteínas estructurales en muestras cuya autopsia fue negativa. Debido a que la tecnología de secuenciación masiva permite que se puedan secuenciar un gran número de genes a bajo coste por una parte se puede mejorar el diagnóstico, pero por otra parte se aumenta el número de variantes raras que se pueden encontrar. En este estudio se analizaron 40 genes principalmente asociados a miocardiopatías, que corresponden a más del doble de genes que los asociados principalmente a canalopatías dentro de nuestro panel. Otro aspecto que aumenta la probabilidad de encontrar variantes raras es el gran tamaño de algunos genes estructurales, como llega a ser el caso de la *TTN*. Algunos estudios han reportado posibles mecanismos fisiopatológicos que engloban ambos tipos de genes. Por ejemplo, el gen *PKP2* (codificante de la plakophilin-2), está asociado mayoritariamente a MAV y se ha reportado su carácter potencialmente patogénico en el SBr^{86,90}. Pero pese a esto aún hay pocos estudios que determinen este tipo de implicaciones y por lo tanto aún se requiere estudiar cohortes mayores para poder llegar a clarificar su interacción e implicación entre las diferentes enfermedades⁹¹. Por otro lado también se han detectado alteraciones en el gen *SCN5A* (codificante para el canal de sodio cardíaco y principalmente asociado a SBr) entre el 1% y el 2% de los casos de MCD⁹², e así como en algunos casos de MAV⁹³. Por lo tanto de acuerdo con estos estudios y otros similares recientes, se puede sugerir que las arritmias malignas pueden aparecer en un estado previo al desarrollo de una alteración estructural. Sin embargo, se requieren más estudios en cohortes mayores para poder probar o refutar esta hipótesis.

4 Limitaciones

Debido a la presencia de la gran cantidad de variantes raras identificadas, más de una en casi el 50% de los casos, se hace difícil interpretar su significado y por lo tanto gran parte de estas variantes se las considera de significado incierto. Actualmente las guías genéticas tienen establecido en un MAF de un 1% el límite entre una variante rara y una común, pero aún está en discusión si este umbral se debería de bajar a un 0.5% en enfermedades mendelianas. Para poder aclarar la patogenicidad de gran parte de estas variantes se necesitan estudios familiares que permitan realizar una segregación genética y clínica. Este tipo de estudios son cruciales para poder clarificar el papel de este tipo de variantes identificadas para cada caso y familia. También, los estudios funcionales pueden ayudar a elucidar el rol patogénico de algunas variantes como las que provocan disfunciones en los diferentes canales iónicos, pero por otra parte las evidencias *in vitro* no siempre se trasladan al fenotipo clínico, ya que este sucede en un ambiente biológico complejo como es el sistema cardiovascular humano. Finalmente tanto el tamaño de la cohorte como el del panel de genes utilizado es una limitación, tanto a la hora de establecer unos mejores porcentajes como el que exista la posibilidad de estudiar otros genes que no han sido incluidos en nuestro panel en los diferentes casos que han resultado negativos. También creemos que es importante la rapidez con la que se pueda disponer de los informes genéticos, por lo que en los casos menores de 30 años creemos que tanto los estudios genéticos como los histológicos pueden resolverse de manera paralela, para así poder disponer de un informe final completo con la mayor brevedad posible. En base a los resultados de este estudio se propone una simple guía en forma de diagrama de flujo como protocolo forense para el estudio genético de la muerte súbita cardíaca.

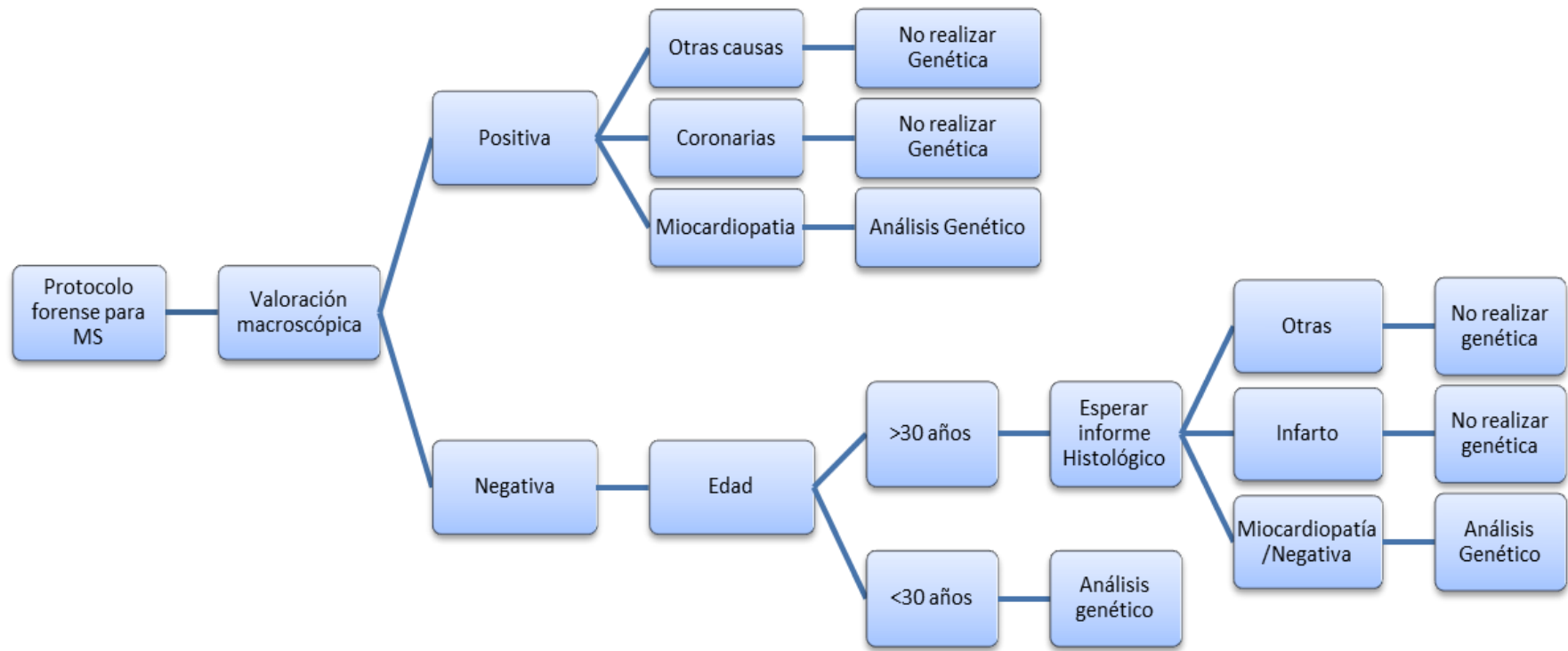


Figura 21. Diagrama de flujo propuesto para protocolos forenses sobre el estudio genético de la muerte súbita cardíaca. El diagrama se propone en base al estudio analizado y los resultados obtenidos. En casos menores de 30 años si se sospecha de una muerte súbita inexplicada o de una miocardiopatía se deberían realizar estudios genéticos mientras se espera el informe histológico. En casos mayores de 30 años, siempre se ha de esperar el informe histológico debido a la alta incidencia de casos coronarios a partir de ese rango de edad.

VI. Conclusiones

Conclusiones

1. Los resultados de este estudio de muerte natural en menores de 50 años mostraron que las causas cardíacas son la principal causa de muerte súbita. La causa más importante en los individuos mayores de 40 años es la debida a la enfermedad coronaria, en cambio en los menores de 30 años las causas cardíacas corresponden a miocardiopatías u otras alteraciones estructurales del corazón. La autopsia forense completa puede determinar las causas de la muerte de una gran parte de los casos, pero aun así un 20% de los casos quedan sin resolver.
2. La autopsia molecular mediante el uso de secuenciación masiva puede ayudar a identificar la causa de la muerte en los casos con una autopsia no conclusiva. En este estudio se ha identificado un 35% de variantes posiblemente patogénicas y cerca de un 15% de variantes patogénicas que podrían explicar la causa de la muerte. Los análisis genéticos deben ser realizados también cuando exista sospecha de una enfermedad cardíaca hereditaria después de los análisis macroscópicos o histológicos correspondientes.
3. En este estudio demostramos que es importante excluir la causa coronaria en los individuos mayores de 30 años mediante histología, antes de proceder a la autopsia molecular, ya que en estos rangos de edad es la causa más común de muerte. Sin embargo los datos sugieren que en los menores de 30 años pese a que deba realizarse también el análisis histológico para identificar posibles alteraciones cardíacas, se puede proceder directamente al análisis genético, ya que incluso cuando la histología encuentra alteraciones la genética puede ser un buen complemento para identificar la causa de estas. Por lo que se ha propuesto una simple recomendación a modo de guía forense para el estudio de estos de los casos de muerte súbita.

VII. Bibliografía

1. Wain, H. M. *et al.* Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Online* **79**, 464–470 (2002).
2. Ezkurdia, I. *et al.* Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5866–5878 (2014).
3. Ensembl genome browser 87. at <<http://www.ensembl.org/index.html>>
4. National Human Genome Research Institute (NHGRI) - Homepage. at <<http://www.genome.gov/>>
5. yourgenome.org | Helping you discover more about DNA, genes and genomes, and the implications for our health and society. at <<http://www.yourgenome.org/>>
6. Genetics Home Reference. (2015). at <<http://ghr.nlm.nih.gov/>>
7. Universidad de Navarra. (2012). at <<http://www.unav.es/ocw/genetica/tema-1-1.html>>
8. Homepage - National Human Genome Research Institute (NHGRI). at <<https://www.genome.gov/>>
9. ROCHE 454. at <<http://454.com/products/technology.asp>>
10. SOLiD Next Generation Sequencing.
11. Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research. at <<https://www.illumina.com/?redirect=false>>
12. Home - Pacific Biosciences. at <<http://www.pacb.com/>>
13. Oxford Nanopore Technologies. at <<https://nanoporetech.com/>>
14. Hirtle-Lewis, M. *et al.* The genetics of dilated cardiomyopathy: A prioritized candidate gene study of LMNA, TNNT2, TCAP, and PLN. *Clin. Cardiol.* **36**, 628–633 (2013).
15. Handel, A. E., Disanto, G. & Ramagopalan, S. V. Next-generation sequencing in understanding complex neurological disease. *Expert Rev. Neurother.* **13**, 215–27 (2013).
16. Sherry, S. T. *et al.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 308–311 (2001).
17. Home | 1000 Genomes. at <<http://www.1000genomes.org/>>
18. Exome Variant Server. at <<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>>
19. ExAC Browser. at <<http://exac.broadinstitute.org/>>

20. Stenson, P. D. *et al.* The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum. Genet.* **133**, 1–9 (2014).
21. Home - PubMed - NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>
22. Facolt, M. L. Istituto di Sanità Pubblica. Sezione di Medicina Legale Facoltà di medicina e chirurgia A. Gemelli. (2015).
23. MutationTaster. at <<http://www.mutationtaster.org/>>
24. PROVEAN Human Protein Batch. at <<http://provean.jcvi.org/>>
25. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs. at <<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>>
26. Jean-Ha Baek, T. M. and M. E. Genetic Disorders. 1–5 (2013). doi:10.5772/46039
27. Marian, A. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl. Res.* **159**, 64–79 (2012).
28. Teri A. Manolio, Francis S. Collins, Nancy J. Cox, David B. Goldstein, L. A. *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**, 747–753 (2009).
29. Castellá García, J., Medallo Muñoz, J. & Marrón Moya, T. Aspectos medicolegales de la muerte súbita cardiaca. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.* **13**, 30–37 (2013).
30. Vatta, M. & Spoonamore, K. G. Use of genetic testing to identify sudden cardiac death syndromes. *Trends Cardiovasc. Med.* 1–11 (2015). doi:10.1016/j.tcm.2015.03.007
31. Chugh, S. S. *et al.* Epidemiology of Sudden Cardiac Death: Clinical and Research Implications. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **51**, 213–228 (2008).
32. Marsman, R. F., Tan, H. L. & Bezzina, C. R. Genetics of sudden cardiac death caused by ventricular arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 96–111 (2013).
33. Chugh, S. S., Kelly, K. L. & Titus, J. L. Sudden Cardiac Death With Apparently Normal Heart. *Circulation* **102**, (2000).
34. Bezzina, C. R., Lahrouchi, N. & Priori, S. G. Genetics of Sudden Cardiac Death. *Circ. Res.* **116**, 1919–1936 (2015).
35. Keating, M. T. & Sanguinetti, M. C. Molecular and cellular mechanisms review of cardiac

- arrhythmias. *Cell* **104**, 569–580 (2001).
36. Amin, A. S., Tan, H. L. & Wilde, A. a M. Cardiac ion channels in health and disease. *Hear. Rhythm* **7**, 117–126 (2010).
37. Hedley, P. L. *et al.* The genetic basis of long QT and short QT syndromes: A mutation update. *Hum. Mutat.* **30**, 1486–1511 (2009).
38. Goldenberg, I. & Moss, A. J. Long QT Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 2291–2300 (2008).
39. Fuster, V., O'Rourke, R. A. & Walsh, R. A. *Hurt's the heart* 12th edition. *McGraw Hill* (2008).
40. Gussak, I. *et al.* Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* **94**, 99–102 (2000).
41. Brugada, J., Gussak, I. & Brugada, P. Short QT syndrome: A predictable story. *Cardiol.* **128**, 231–233 (2014).
42. Sumitomo, N. *et al.* Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: electrocardiographic characteristics and optimal therapeutic strategies to prevent sudden death. *Heart* **89**, 66–70 (2003).
43. Leenhardt, A., Denjoy, I. & Guicheney, P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* **5**, 1044–1052 (2012).
44. Ter Keurs, H. E. D. J. & Boyden, P. a. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol. Rev.* **87**, 457–506 (2007).
45. Brugada, P. & Brugada, J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J. Am. Coll. Cardiol.* **20**, 1391–1396 (1992).
46. Brugada, P., Benito, B., Brugada, R. & Brugada, J. Brugada syndrome: update 2009. *Hellenic J. Cardiol.* **50**, 352–72 (2009).
47. Berne, P. & Brugada, J. Brugada Syndrome 2012. *Circ. J.* **76**, (2012).
48. Antzelevitch, C. *et al.* Brugada Syndrome: Report of the second consensus conference. *Circulation* **111**, 659–670 (2005).
49. Chen, Q. *et al.* Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular

- fibrillation. *Nature* **392**, 293–296 (1998).
50. Nielsen, M. W., Holst, A. G., Olesen, S. P. & Olesen, M. S. The genetic component of brugada syndrome. *Front. Physiol.* **4 JUL**, 1–11 (2013).
 51. Lieve, K. V. V. & Wilde, A. A. M. Inherited ion channel diseases: a brief review. *Europace* **17**, ii1-ii6 (2015).
 52. Tian, T., Liu, Y., Zhou, X. & Song, L. Progress in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A mini-review. *Gerontology* **59**, 199–205 (2013).
 53. Santos, S. *et al.* High Resolution Melting: improvements in the genetic diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy in a Portuguese cohort. *BMC Med. Genet.* **13**, 17 (2012).
 54. Michels, M. *et al.* Disease penetrance and risk stratification for sudden cardiac death in asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers. *Eur. Heart J.* **30**, 2593–2598 (2009).
 55. Suarez, M. P. Anabolizantes. Complicaciones cardio- vasculares. Muerte súbita e inesperada. *Cuad. Med. Forense* 29–39 (2001).
 56. McNally, E. M., Golbus, J. R. & Puckelwartz, M. J. Review series Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **123**, (2013).
 57. Elliott, P. *et al.* Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **3**, 314–322 (2010).
 58. Radu, R. I. *et al.* Histological and immunohistochemical changes of the myocardium in dilated cardiomyopathy. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **53**, 269–275 (2012).
 59. Alcalde, M. *et al.* Stop-gain mutations in PKP2 are associated with a later age of onset of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *PLoS One* **9**, (2014).
 60. Lopez-Ayala, J. M., Oliva-Sandoval, M. J., Sanchez-Muñoz, J. J. & Ramon Gimeno, J. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet* **385**, (2015).
 61. Iyer, V. R. & Chin, A. J. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D). *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **163**, 185–197 (2013).
 62. Marcus, F. I., Edson, S. & Towbin, J. a. Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: A practical guide for physicians. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61**, 1945–1948 (2013).

63. Andreassen, C. *et al.* New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 918–28 (2013).
64. Ackerman, M. J. *et al.* HRS/EHRA EXPERT CONSENSUS STATEMENT HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies. *Europace* **13**, 1077–1109 (2011).
65. Priori, S. G., Giuliana Priori, S. & Blomström-Lundqvist, C. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *Nikolaos Nikolaou (Greece), Tone M. Norekvål (Norway), Christ. Spaulding Eur. Hear. Rhythm Assoc. Cardiovasc. Pharmacother. Cardiovasc. Surg.* doi:10.1093/europace/euv319
66. Basso, C. *et al.* Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Arch.* **452**, 11–18 (2008).
67. Campuzano, O. *et al.* Negative autopsy and sudden cardiac death. *Int. J. Legal Med.* **128**, 599–606 (2014).
68. Priori, S. G. *et al.* HRS/EHRA/APHS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Hear. Rhythm* **10**, 1932–1963 (2013).
69. HGMD - Human Gene Mutation Database for Human Genetics Research - BIOBASE Biological Databases. at <<http://www.biobase-international.com/product/hgmd>>
70. UniProt. at <<http://www.uniprot.org/>>
71. Hallam, S. *et al.* Validation for Clinical Use of, and Initial Clinical Experience with, a Novel Approach to Population-Based Carrier Screening using High-Throughput, Next-Generation DNA Sequencing. *J. Mol. Diagnostics* **16**, 180–189 (2014).
72. Amendola, L. M. *et al.* Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* **98**, 1067–1076 (2016).
73. Sinard, J. H. Accounting for the Professional Work of Pathologists Performing Autopsies.

- Arch. Pathol. Lab. Med.* **137**, 228–232 (2013).
74. Bagnall, R. D. *et al.* A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2441–2452 (2016).
75. Langlois, N. E. I. Sudden adult death. *Forensic Sci. Med. Pathol.* **5**, 210–232 (2009).
76. Shen, W. K. *et al.* Sudden unexpected nontraumatic death in 54 young adults: a 30-year population-based study. *Am. J. Cardiol.* **76**, 148–52 (1995).
77. Davies, M. J. The investigation of sudden cardiac death. *Histopathology* **34**, 93–8 (1999).
78. Vassalini, M., Verzeletti, A., Restori, M. & De Ferrari, F. An autopsy study of sudden cardiac death in persons aged 1-40 years in Brescia (Italy). *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)*. **17**, 446–53 (2016).
79. Wilhelm, M. *et al.* Sudden cardiac death in forensic medicine – Swiss recommendations for a multidisciplinary approach. *Swiss Med. Wkly.* (2015). doi:10.4414/smw.2015.14129
80. Skinner, J. R. *et al.* Prospective, population-based long QT molecular autopsy study of postmortem negative sudden death in 1 to 40 year olds. *Hear. Rhythm* **8**, 412–419 (2011).
81. Gladding, P. A. *et al.* Posthumous diagnosis of long QT syndrome from neonatal screening cards. *Hear. Rhythm* **7**, 481–486 (2010).
82. Wang, D. *et al.* Cardiac channelopathy testing in 274 ethnically diverse sudden unexplained deaths. *Forensic Sci. Int.* **237**, 90–99 (2014).
83. Tester, D. J. & Ackerman, M. J. The Molecular Autopsy: Should the Evaluation Continue After the Funeral? *Pediatr. Cardiol.* **33**, 461–470 (2012).
84. Ingles, J. & Semsarian, C. Sudden cardiac death in the young: a clinical genetic approach. *Intern. Med. J.* **37**, 32–37 (2007).
85. Cerrone, M. & Delmar, M. Desmosomes and the sodium channel complex: Implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome. *Trends Cardiovasc. Med.* **24**, 184–190 (2014).
86. Cerrone, M. *et al.* Missense Mutations in Plakophilin-2 Cause Sodium Current Deficit and Associate With a Brugada Syndrome PhenotypeCLINICAL PERSPECTIVE.

- Circulation* **129**, (2014).
87. Neubauer, J., Haas, C., Bartsch, C., Medeiros-Domingo, A. & Berger, W. Erratum to: Post-mortem whole-exome sequencing (WES) with a focus on cardiac disease-associated genes in five young sudden unexplained death (SUD) cases. *Int. J. Legal Med.* **130**, 1023–1023 (2016).
88. Narula, N., Tester, D. J., Paulmichl, A., Maleszewski, J. J. & Ackerman, M. J. Post-mortem Whole Exome Sequencing with Gene-Specific Analysis for Autopsy-Negative Sudden Unexplained Death in the Young: A Case Series. *Pediatr. Cardiol.* **36**, 768–778 (2015).
89. Farrugia, A. *et al.* Targeted next generation sequencing application in cardiac channelopathies: Analysis of a cohort of autopsy-negative sudden unexplained deaths. *Forensic Sci. Int.* **254**, 5–11 (2015).
90. Hertz, C. L. *et al.* Genetic investigations of sudden unexpected deaths in infancy using next-generation sequencing of 100 genes associated with cardiac diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 817–822 (2016).
91. Campuzano, O., Fernández-Falgueras, A., Iglesias, A. & Brugada, R. Brugada Syndrome and PKP2: Evidences and uncertainties. *International Journal of Cardiology* **214**, 403–405 (2016).
92. McNair, W. P. *et al.* SCN5A Mutations Associate With Arrhythmic Dilated Cardiomyopathy and Commonly Localize to the Voltage-Sensing Mechanism. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 2160–2168 (2011).
93. Yu, J. *et al.* SCN5A mutation in Chinese patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Herz* **39**, 271–275 (2014).

VIII. Anexos

Tabla 6. Tabla de las variantes genéticas identificadas en los 81 casos positivos de la cohorte de 119 casos de muerte súbita inexplicada.

Rango	ID	Procesamiento	Edad	Género	Autopsia	Gen	Nucleótido	Variante	dbSNP	MAF (%)	ExAC %	HGMD	VP/PPP/VI/VPB	Enfermedad	PPH2	Provean	Mut. Taster
0-10	1	SANGER	1m	F	SIDS	SCN5A	c.5054A>T	p.1685E>D	---	---	---	BM1492175	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	1					SCN5A	c.5055G>T	p.1685E>V	---	---	---	CM1413453	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	2	SM	3d	M	SIDS	TTN	c.74377C>G	p.24793P>A	rs56137800	---	0.2859	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	2					TTN	c.11446G>A	p.3816V>I	rs72648929	---	0.2733	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
0-10	3	SM	13d	F	SIDS	DSP	c.5598G>C	p.1866Q>H	---	---	0.0008238	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	3					TTN	c.74195G>A	p.24732R>H	rs55850344	0.0608/0.0528/0.0583	0.03066	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	4	SM	1m	F	SIDS	SCN5A	c.5848G>T	p.1950V>L	rs41315493	0.0596/0.457/0.191	0.005412	CM024652	VPP	BrS	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	4					DSG2	c.1003A>G	p.335T>A	rs191564916	0.061/0.0/0.0419	0.05558	CM098196	VPP	ARVC	Damaging	Neutral	Polymorphism
0-10	5	SM	41d	M	SIDS	MYH6	c.595G>A	p.199A>T	rs535526291	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	5					TTN	c.16752C>G	p.5584I>M	rs563320328	---	0.001668	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	6	SM	2m	M	SIDS	CACNA1C	c.5809C>T	p.1937R>C	rs185788586	0.1437/0.1257/0.1379	0.7488	CM1413436	VPP	Sudden Cardiac Death	Benign	Neutral	Disease causing
0-10	7	SM	2m	F	SIDS	SCN5A	c.1844G>A	p.615G>E	rs12720452	0.0595/0.0/0.0399	0.023	CM022061	VPP	LQTS drug-associated	Damaging	Neutral	Polymorphism
0-10	8	SM	3m	M	SIDS	TTN	c.81017G>A	p.27006R>H	rs111727915	0.0239/0.1711/0.0722	0.04143	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	8					TTN	c.70109G>C	p.23370W>S	rs186681106	0.0244/0.3203/0.1171	0.05575	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	8					TTN	c.64675G>A	p.21559E>K	rs149763294	0.0243/0.1318/0.0582	0.03929	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	8					TTN	c.28025C>A	p.9342P>Q	rs200459347	0.0243/0.1326/0.0583	0.04174	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
0-10	8					TTN	c.18047C>A	p.6016S>Y	rs187925021	0.0245/0.1609/0.0672	0.449	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
0-10	8					TTN	c.17936G>A	p.5979R>H	rs138853909	0.0362/0.155/0.074	0.05243	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	8					TTN	c.17600T>C	p.5867M>T	rs374408615	0.012/0.0/0.0081	0.00161	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	9	SM	1	F	SIDS	DMD	c.4529A>G	p.1510K>R	rs72468638	0.0297/0.0/0.0189	0.5399	---	VPB	---	Damaging	Neutral	Polymorphism
0-10	9					PRKAG2	c.1107-5C>T	---	---	---	---	---	VSI	---	---	---	---
0-10	10	SM	14m	M	Unexplained	JUP	c.283G>C	p.95G>R	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	11	SM	16m	M	Unexplained	FBN1	c.8176C>T	p.2726R>W	rs61746008	0.1047/0.1137/0.1078	0.07331	CM950453	VPP	Marfan Syndrome	Benign	Deleterious	Disease causing
0-10	11					TNNC1	c.304C>A	p.102R>S	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Disease causing

0-10	11					GPD1L	c.520G>A	p.174E>K	rs112122950	0.1279/0.0227/0.0923	0.01483	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
0-10	11					TTN	c.44832C>G	p.14944N>K	rs199615557	0.01279/0/0.0333	0.03031	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Disease causing
0-10	12	SM	18m	F	Unexplained	CACNA1C	c.6062G>A	p.2021R>Q	rs112414325	0.2183/0.0518/0.1652	0.3594	CM1413437	VPP	Sudden Cardiac Death	Benign	Neutral	Disease causing
0-10	12					DSP	c.916G>A	p.306A>T	rs368193211	0.0116/0/0.0077	0.004944	CM1413441	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Neutral	Disease causing
0-10	13	SM	3	M	Unexplained	DSP	c.314G>A	p.105R>Q	---	---	0.004118	CM1413443	VPP	Sudden cardiac Death	Damaging	Neutral	Disease causing
0-10	13					DSP	c.946A>G	p.316M>V	rs201672777	0.0116/0/0.0077	0.002484	CM1413442	VPP	Sudden cardiac Death	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	13					CACNB2	c.47_49delCGG	p.A16fs	---	---	---	---	VPP	---	---	---	Disease causing
0-10	13					DMD	c.7183G>A	p.2395A>T	rs72466590	0.2229/0/0.142	0.07408	CM072994	VP	Muscular dystrophy	Benign	Neutral	Polymorphism
0-10	13					FBN1	c.1175C>G	p.392P>R	rs534127494	---	0.003345	CM1413444	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	14	SM	3	M	SUDEP	TTN	c.89494C>A	p.29832P>T	rs373876117	0.0122/0/0/0.0084	0.01195	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
0-10	14					TTN	c.5577G>T	p.1859R>S	---	---	0.003295	BM1437281	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Deleterious	Polymorphism
0-10	15	SM	3	M	Unexplained	TTN	c.77076A>C	p.25693E>D	---	---	0.002485	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
0-10	16	SANGER	10	M	Unexplained	KCNH2	c.2674C>T	p.892R>C	rs201627778	0.0116/0.0227/0.0154	0.04794	CM1413446	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Deleterious	Disease causing
11--20	17	SM	14	F	Unexplained	DSC2	c.1789G>T	p.597V>F	rs143040393	0.0116/0.2497/0.0923	0.01818	CM1413440	VPP	Sudden Cardiac Death	Benign	Deleterious	Polymorphism
11--20	17					CACNA1C	c.5809C>T	p.1937R>C	rs185788586	0.1437/0.1257/0.1379	0.7488	CM1413436	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Neutral	Disease causing
11--20	17					ANK2	c.7148C>T	p.2383P>L	rs35960628	0/0.0908/0.0308	0.01237	CM1413435	VPP	Sudden Cardiac Death	Benign	Neutral	Polymorphism
11--20	17					TGFB3	c.755-5T>C	---	---	---	---	---	VSI	---	---	---	---
11--20	17					DMD	c.4328A>G	p.1443Q>R	---	---	0.001150	CM1413439	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Neutral	Disease causing
11--20	18	SM	19	M	Unexplained	TTN	c.27470A>G	p.9157Y>S	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
11--20	19	SM	20	M	Unexplained	ANK2	c.4373A>G	p.1458E>G	rs72544141	0.0233/0/0.0154	0.04222	CM030186	VP	LQTS	Damaging	Deleterious	Disease causing
11--20	19					TNNT2	c.832C>T	p.278R>C	rs121964857	0.0582/0.0227/0.461	0.04291	CM951222	DM	HCM	Damaging	Neutral	Disease causing
11--20	19					TTN	c.64001T>C	p.21334I>T	rs55837610	0.3873/0.026/0.2725	0.2155	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
11--20	20	SM	20	M	Unexplained	CACNA1C	c.5086G>A	p.1696A>T	rs370432385	0.0119/0/0/0.008	0.008678	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
21-30	21	SM	21	M	SUDEP	FBN1	c.5443G>A	p.1815G>S	---	---	0.001649	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	21					HCN4	c.2452G>A	p.818G>S	---	---	---	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	22	SM	22	M	Unexplained	VCL	c.510C>T	p.197T>I	rs189242810	0.0349/0/0/0.0231	0.02307	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing

21-30	23	SM	22	H	Unexplained	MYH6	c.3428G>A	p.1143R>Q	rs543585784	---	0.0111	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	23					TPM1	c.451G>A	p.151A>T	---	---	---	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	23					TTN	c.74315T>A	p.24772I>K	rs371592971	0.0122/0.0/0.0084	0.002485	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	24	SM	23	F	Unexplained	TTN	c.98971G>C	p.32991E>Q	rs199632397	0.0245/0.0275/0.0254	0.04170	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Polymorphism
21-30	24					TTN	c.5993G>A	p.1998R>H	rs144135510	0.1163/0/0.0769	0.1756	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	24					TTN	c.74366C>G	p.24789T>R	---	---	0.002486	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	25	SM	23	M	Unexplained	KCNQ1	c.1343C>G	p.448P>R	rs12720449	0.0116/0.0/0.0077	0.7614	CM002332	VPP	LQTS	Benign	Neutral	Polymorphism
21-30	25					TTN	c.87857G>C	p.29286W>S	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	25					TTN	c.74842T>A	p.24948W>R	---	---	0.0008286	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	26	SM	23	D	SUDEP	JUP	c.526C>T	p.176R>W	rs368336007	0.0116/0.0/0.0077	0.006811	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	26					KCNH2	c.1810G>A	p.604G>S	rs199473522	---	---	CM990760	VP	LQTS	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	27	SM	24	M	Unexplained	RYR2	c.2047G>A	p.683E>K	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	27					TTN	c.29295T>A	p.Y9766stop	---	---	---	---	VPP	---	---	Deleterious	Disease causing
21-30	28	SM	24	M	Unexplained	SCN5A	c.393-5C>A	---	rs368678204	0.0118/0.0/0.0078	0.01297	CS097852	VPP	LQTS	---	---	---
21-30	28					FBN1	c.698G>A	p.233R>H	rs770140872	---	0.002477	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	28					TTN	c.2776-4C>A	---	---	---	0.0008331	---	VPP	---	---	---	---
21-30	29	SM	24	F	Unexplained	KCNH2	c.1757T>C	p.586L>P	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	29					TNNC1	c.337G>A	p.113D>N	rs369639550	0./00227/0.0077	---	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	29					TTN	c.79708C>A	p.26570P>T	rs72648227	0.0121/0/0.0083	0.1093	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	29					TTN	c.39487C>T	p.13163R>C	rs72677231	0.2887/0.517/0.2136	0.2249	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	29					TTN	c.8884G>A	p.2962A>T	rs376039623	0.0243/0.0/0.0167	0.0008986	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	30	SM	24	F	Unexplained	RYR2	c.1392C>A	p.464H>Q	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
21-30	30					DSG2	c.1912G>A	p.638G>R	rs201564919	0.0242/0/0.0165	0.01244	CM109865	DM	ARVC	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	30					TTN	c.84472C>T	p.28158P>S	rs72648247	0.2305/0.0524/0.1742	0.2484	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	30					TTN	c.29781_29783dupAGA	p.E9928dup	rs368327166	---	---	---	VPP	---	---	---	Disease causing
21-30	31	SM	24	M	Unexplained	PKP2	c.1592T>G	p.531I>S	rs147240502	0.4884/0.0/0.3229	0.4722	CM102861	VPP	ARVC	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	31					HCN4	c.3082C>G	p.1028P>A	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism

21-30	31					TTN	c.85866T>A	p.28623N>K	---	---	0.004143	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	31					TTN	c.79896G>C	p.26633M>I	---	---	0.02733	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	31					TTN	c.43823G>C	p.14608G>A	---	---	0.02735	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	32	SM	27	M	Unexplained	SCN4B	c.613T>C	p.205S>P	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	33	SM	29	M	Unexplained	HCN4	c.2938G>A	p.980G>R	---	---	0.003473	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Polymorphism
21-30	33					ANK2	c.2938G>A	p.2948A>Q	rs138438183	0.0349/0.0227/0.0308	0.01898	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
21-30	33					TTN	c.68678T>C	p.22893I>T	---	---	0.0008334	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	34	SM	30	M	Unexplained	VCL	c.829C>A	p.277L>M	rs71579353	0.0116/0.0/0.0077	0.004126	CM062022	VP	HCM	Benign	Neutral	Disease causing
21-30	34					TTN	c.31720C>T	p.10574P>S	rs200992277	---	---	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
21-30	35	SM	30	M	Unexplained	ANK2	c.4912A>G	p.1638N>D	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
21-30	35					TTN	c.88582G>A	p.29528A>T	rs376039623	0.0243/0.0/0.0167	0.006650	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
21-30	36	SM	30	M	Unexplained	CASQ2	c.730C>T	p.244H>Y	rs142036299	---	0.02327	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	37	SM	33	F	Unexplained	DES	c.935A>C	p.312D>A	rs148947510	0.0/0.2951/0.1	0.03891	CM137784	VPP	Cardiomyopathy	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	38	SM	33	M	Unexplained	MYH7	c.4879A>T	p.1627I>F	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
31-40	38					TTN	c.89786T>C	p.29929I>T	rs55660660	0.0119/0.5682/0.1932	0.09549	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	38					TTN	c.81004A>G	p.27002I>V	rs139506970	0.0119/0.636/0.2166	0.07539	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
31-40	38					TTN	c.76036A>G	p.19020G>R	rs181717727	0.024/0.6021/0.211	0.08071	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Polymorphism
31-40	38					TTN	c.57058G>A	p.922R>H	rs56046320	0.0116/0.9305/0.3229	0.09066	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
31-40	38					TTN	c.2765G>A	p.25346T>A	rs188370772	0.0121/0.6282/0.2053	0.07464	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
31-40	39	SM	33	F	Unexplained	PKP2	c.1872G>T	p.624E>D	rs370219248	0.0/0.0227/0.0077	0.006593	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
31-40	39					ANK2	c.8768A>G	p.2923Q>R	rs551454026	---	0.09067	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
31-40	39					TTN	c.30515_17delAAG	p.E10172fs	rs397517549	---	---	---	VPP	---	---	---	Disease causing
31-40	40	SM	34	M	Unexplained	RYR2	c.8145G>T	p.2715E>D	rs200420897	0.0126/0.0283/0.0175	---	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	40					TTN	c.93961G>A	p.33889V>I	rs34924609	0.6481/0.1623/0.4969	0.3311	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
31-40	41	SM	34	M	Unexplained	TTN	c.47109T>G	p.15703F>L	rs370583314	0.0124/0.0/0.0086	0.004479	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
31-40	41					TTN	c.52341A>C	p.17447E>D	rs575796706	---	0.001662	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
31-40	41					TTN	c.45509A>T	p.15170D>V	---	---	0.004973	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing

31-40	41				JUP	c.1717G>T	p.573D>Y	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing	
31-40	42	SM	34	F	Unexplained	DSP	c.4372C>G	p.1458R>G	rs28763965	0.2093/0.0908/0.1692	0.1737	CM113816	VPP	ARVC	Damaging	Neutral	Polymorphism
31-40	42					CACNB2	c.1180G>A	p.394V>I	rs149793143	0.0/0.0227/0.0077	0.001649	CM127056	VP	BrS	Damaging	Neutral	Disease causing
31-40	42					SCN5A	c.6007T>C	p.2004F>L	rs41311117	0.3107/0.0497/0.2259	0.2018	CM086913	VPP	BrS	Damaging	Neutral	Polymorphism
31-40	43	SM	35	H	Unexplained	MYBPC3	c.3569G>T	p.1190R>L	rs117354682	0.0/0.0254/0.0082	0.005870	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	43					MYBPC3	c.961G>A	p.321V>M	rs200119454	0.0471/0.0232/0.039	0.04625	CM115891	VP	DCM	Damaging	Neutral	Disease causing
31-40	44	SANGER	36	M	Unexplained	SCN5A	c.3530C>G	p.1177P>R	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	45	SM	36	F	Unexplained	KCNJ2	c.1229A>G	p.410N>S	rs141069645	0.0233/0.0454/0.0308	0.03722	CM1313311	VP	LQTS	Benign	Neutral	Disease causing
31-40	46	SM	36	F	Unexplained	PKP2	c.611G>A	p.204R>H	rs755215178	---	0.007414	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
31-40	46					FBN1	c.83A>G	p.28N>S	rs193922245	---	0.00659	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
31-40	47	SM	37	M	Unexplained	SCN5A	c.4G>A	p.2A>T	rs199473042	---	0.002537	CM104269	VP	BrS	Damaging	Neutral	Disease causing
31-40	47					SCN5A	c.1855C>T	p.619L>F	rs199473133	0.0238/0.0/0.016	0.003699	CM030952	VP	LQTS	Damaging	Neutral	Disease causing
31-40	48	SM	37	M	Unexplained	JPH2	c.1625G>A	p.542R>H	rs369279135	0.0/0.0304/0.0096	0.005589	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
31-40	49	SM	38	M	Unexplained	PRKAG2	c.298G>A	p.100G>S	rs79474211	0.0814/0.0908/0.0846	0.8132	CM136115	VP	PRKAG2 cardiac syndrome	Damaging	Neutral	Disease causing
31-40	49					ACTN2	c.1975-6C>G	---	rs201255023	---	0.1120	---	VSI	---	---	---	---
31-40	49					TTN	c.77702C>G	p.25901S>C	rs202040332	0.7558/0.227/0.5767	0.1666	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	49					FBN1	c.6987C>G	p.2329D>E	rs363831	0.0/0.1137/0.0385	0.06105	---	VSI	---	Neutral	Neutral	Polymorphism
31-40	49					FBN1	5672-3T>C	---	rs193922217	---	---	---	VPP	---	---	---	---
31-40	50	SM	38	F	Unexplained	DSP	c.8402G>A	p.2801R>H	---	---	0.0008249	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	50					TTN	c.10503G>C	p.3501K>N	---	---	---	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Polymorphism
31-40	51	SM	38	M	Unexplained	SCN5A	c.4648G>C	p.1550D>H	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	51					TTN	c.5419C>A	p.1807P>T	rs200563229	---	0.0008254	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	52	SM	38	M	Unexplained	DSP	c.3399C>G	p.1133D>E	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	52					DSC2	c.2603C>T	p.868S>F	rs141873745	0.0/0.0227/0.0077	0.005769	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
31-40	53	SM	39	M	Unexplained	TGFB3	c.97G>A	p.33G>S	---	---	0.003295	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
31-40	53					TTN	c.19013C>G	p.6338S>C	---	---	0.003320	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Polymorphism

31-40	54	SM	39	M	Unexplained	TTN	c.23200G>C	p.7734D>H	---	---	0.0008503	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	55	SANGER	40	M	Unexplained	KCNH2	c.2119T>C	p.707Y>H	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	56	SM	40	F	Unexplained	FBN1	c.4163G>A	p.1388R>H	---	---	0.002477	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	57	SM	42	M	Unexplained	MYH7	c.5669A>G	p.1890N>S	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	57					MYH7	c.3235C>T	p.1079R>W	rs192722540	---	0.004944	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	57					TTN	c.21088G>A	p.7030E>K	rs72648981	0.3747/0.0261/0.2642	0.198	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	57					TTN	c.583+5G>A	---	---	---	---	---	VSI	---	---	---	---
41-50	58	SM	42	M	Unexplained	KCNJ2	c.1229A>G	p.410N>S	rs141069645	0.0233/0.0454/0.0308	0.03722	CM1313311	VP	LQTS	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	59	SM	42	M	Unexplained	CACNB2	c.209G>A	p.70R>H	rs150722502	---	0.08816	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	60	SANGER	43	M	Unexplained	RYR2	c.12919C>T	p.4307R>C	rs200092869	0.1092/0.0/0.0745	---	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Polymorphism
41-50	61	SM	43	F	Unexplained	KCNH2	c.2860C>T	p.954R>C	rs141401803	---	0.008263	CM070176	VP	SIDS	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	62	SM	43	M	Unexplained	CACNA1C	c.6169C>T	p.2057R>W	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	62					DMD	c.6275A>G	p.2092Y>C	rs745717858	---	0.001141	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	62					CASQ2	c.928G>A	p.310D>N	rs141314684	0.0581/0.0227/0.0461	0.06344	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Disease causing
41-50	62					PRKAG2	c.1387G>T	p.463V>L	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	62					RYR2	c.4465T>C	p.1489C>R	rs200450676	0.0119/0.0/0.008	0.0166	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	62					KCNE2	c.22A>G	p.8T>A	rs2234916	0.686/0.1135/0.4921	0.3804	CM003449	VSI	LQT int. Drug induced	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	63	SM	43	M	Unexplained	MYBPC3	c.3384G>C	p.1128E>D	rs375116558	0.0241/0.0/0.0162	0.0127	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	64	SM	44	M	Unexplained	KCNH2	c.2941A>G	p.981S>G	rs76649554	0.0116/0.0227/0.0154	0.04304	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	65	SM	44	M	Unexplained	HCN4	c.2210A>G	p.737Q>R	rs146732972	0.0/0.1365/0.0462	0.02074	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	65					PKP2	c.1637C>A	p.546A>E	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	65					CACNA1C	c.667G>A	p.223A>T	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	66	SM	44	M	Unexplained	ANK2	c.11465G>C	p.3822G>A	rs79577190	0.0/0.6809/0.2307	0.06609	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	66					ANK2	c.11791G>A	p.3931E>K	rs45454496	0.4186/0.0908/0.3076	0.267	CM041240	VP	Cardiac arrhythmia	Damaging	Neutral	Polymorphism
41-50	66					TTN	c.84206T>C	p.28069M>T	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
41-50	67	SM	44	M	Unexplained	MYH6	c.3612G>C	p.1204E>D	rs751153777	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing

41-50	67				TTN	c.50144-4G>A	---	rs369462016	0.0/0.0274/0.0085	0.002627	---	VPP	---	---	---		
41-50	68	SM	45	M	Unexplained	JUP	c.475G>T	p.159V>L	---	---	0.004237	CM1010258	VPP	ARVC	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	68					KCNE3	c.46G>A	p.16A>T	---	---	0.003299	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	68					KCNE3	c.40C>A	p.14L>M	---	---	0.003299	---	VPP	---	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	68					TTN	c.18248C>T	p.6083T>M	---	---	0.01457	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	69	SM	45	M	Unexplained	MYBPC3	c.1786G>A	p.596G>R	rs199728019	0.0/0.0238/0.0079	0.02622	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	70	SM	46	M	Unexplained	TTN	c.55460C>T	p.18487P>L	rs779343098	---	0.001820	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	71	SM	46	M	Unexplained	DSP	c.1140+6T>C	---	rs534740669	---	---	---	VSI	---	---	---	---
41-50	71					TTN	c.40796G>A	p.13599R>Q	---	---	0.0008291	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Polymorphism
41-50	72	SM	47	M	Unexplained	CACNA1C	c.6029G>A	p.2010R>Q	rs199776761	0.0122/0.0522/0.0249	0.01333	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	72					DES	c.635G>A	p.212R>Q	rs144261171	---	0.02059	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	72					TTN	c.92737A>G	p.30913I>V	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	72					TTN	c.6950G>A	p.2317R>H	---	---	0.004945	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	73	SM	48	M	Unexplained	SCN5A	c.1440A>C	p.480K>N	---	---	0.0008383	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	73					TTN	c.60754G>C	p.20252A>P	rs72646880	0.315/0.0264/0.2242	0.1961	CM1413461	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	73					TTN	c.52846G>A	p.17616V>I	rs564621227	---	0.002489	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	74	SM	48	F	Unexplained	MYH7	c.3613G>A	p.1205E>K	---	---	0.0008536	CM081343	VP	HCM	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	75	SM	48	M	Unexplained	VCL	c.1907A>G	p.636H>R	rs71579374	0.1279/0.0227/0.0923	0.1492	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	75					TTN	c.68360A>G	p.22787H>R	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Disease causing
41-50	76	SM	48	M	Unexplained	FBN1	c.3463+3A>G	---	rs80344206	0.0/0.0227/0.0077	0.3114	---	VSI	---	---	---	---
41-50	76					LDB3	c.163G>A	p.55V>I	rs3740343	0.1047/0.1135/0.1076	0.7222	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	76					TTN	c.99430A>C	p.33144N>H	---	---	0.009807	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	76					TTN	c.86021G>A	p.28674R>H	rs369899675	0.012/0.0/0.0081	0.01079	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	77	SM	48	M	Unexplained	DSG2	c.1003A>G	p.335T>A	rs191564916	0.061/0.0/0.0419	0.05558	CM098196	VPP	ARVC	Damaging	Neutral	Polymorphism
41-50	77					SCN5A	c.1140+2T>C	---	---	---	---	---	VPP	---	---	---	---
41-50	78	SM	49	M	Unexplained	CAV3	c.216C>G	p.72C>W	rs116840776	0.1744/0.0681/0.1384	0.1125	CM980306	VP	Muscular dystrophy	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	78					ANK2	c.7372A>T	p.2458S>C	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing

41-50	78					MYH6	c.3010G>T	p.1004A>S	s143978652	0.1279/0.0227/0.0923	0.09801	CM052257	VP	DCM	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	78					TGFBR2	c.1159G>A	p.387V>M	rs35766612	0.3023/0.0908/0.2307	0.1156	CM063201	VP	Aortic aneurysm, thoracic	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	78					LMNA	c.1580G>A	p.527R>H	rs57520892	0.0116/0.0/0.0077	0.006832	CM021630	VP	Mandibuloacral dysplasia	Benign	Deleterious	Disease causing
41-50	79	SM	49	M	Unexplained	SCN5A	c.1715C>A	p.572A>D	rs36210423	0.2388/0.0245/0.1685	0.4304	CM034060	VPP	LQTS	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	79					MYBPC3	c.2497G>A	p.833A>T	rs199865688	0.1758/0.0/0.1166	0.1682	CM032957	VP	HCM	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	79					TTN	c.58726G>A	p.19576A>T	rs183276016	0.0242/0.0261/0.0248	0.01746	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	79					TTN	c.89494C>A	p.29832P>T	rs373876117	0.0122/0.0/0.0084	0.01195	CM1413459	VPP	Sudden Cardiac Death	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	79					TTN	c.17387G>T	p.5796R>L	---	---	---	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Polymorphism
41-50	80	SM	50	F	Unexplained	MYH7	c.3382G>A	p.1128A>T	rs61741930	---	0.01147	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	80					ANK2	c.11725T>C	p.3909S>P	rs141124755	0.0116/0.2724/0.1	0.03627	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	80					TTN	c.87872A>C	p.29291K>T	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Deleterious	Polymorphism
41-50	81	SM	50	M	Unexplained	TCAP	c.171C>G	p.57C>W	rs369447207	0.0116/0.0/0.0077	0.003123	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	81					TTN	c.27913A>G	p.9305I>V	rs376613199	0.0123/0.0/0.0085	0.02567	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	81					TTN	c.835C>T	p.279R>W	rs138060032	0.0116/0.0/0.0077	0.01318	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing

Tabla 7.Tabla de las variantes genéticas identificadas en los 25 casos positivos de la cohorte de 32 casos de miocardiopatías.

Range	ID	Procesamiento	Edad	Género	Autopsia	Gen	Nucleótido	Variante	dbSNP	MAF (%)	ExAC %	HGMD	VP/VPP/VSI/VPB	Enfermedad	PPH2	Provean	Mut. Taster
11--20	1	NGS	17	M	HCM	TNNI3	c.611G>A	p.204R>H	---	---	---	CM050764	VP	HCM	Damaging	Deleterious	Disease causing
11--20	2	NGS	19	M	DCM	JUP	c.56C>T	p.19T>I	rs570878629	---	0.01139	CM098198	VPP	ARVC	Damaging	Deleterious	Disease causing
11--20	2					VCL	c.2046A>T	p.682L>F	rs565398652	---	0.006589	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
11--20	2					TTN	c.81269T>C	p.27090I>T	rs750026544	---	0.003331	---	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
11--20	2					TTN	c.26041A>G	p.8681I>V	---	---	---	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	3	NGS	26	M	HCM	SCN5A	c.569G>A	p.190R>Q	rs199473069	---	0.01131	CM077628	VP	LQTS	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	4	NGS	26	M	HCM	MYBPC3	c.1505G>A	p.502R>Q	rs397515907	---	---	CM981325	VP	HCM	Damaging	Deleterious	Disease causing
21-30	5	NGS	29	M	HCM	TTN	c.14818G>A	p.4940A>T	rs72648947	0.0722/0.0.0493	0.04558	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Tolerated
21-30	5					TTN	c.17441G>A	p.5814G>D	rs72648964	0.1332/0.6309/0.2741	0.1708	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Tolerated
21-30	5					TTN	c.47849A>G	p.15950K>R	rs72646823	0.1332/0.359/0.2057	0.1372	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Tolerated
21-30	6	NGS	30	M	HCM	PKP2	c.184C>A	p.62Q>K	rs199601548	0.0358/0.0/0.0238	0.01679	CM061171	VP	ARVC	Damaging	Neutral	Disease causing
21-30	6					MYBPC3	c.1598A>G	p.533Q>R	---	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
21-30	6					FBN1	c.3058A>G	p.1020T>A	rs111801777	0.0349/0.0/0.0231	0.04632	CM010035	VPP	Marfan Syndrome	Benign	Neutral	Polymorphism
21-30	6					TTN	c.85109G>C	p.28370R>T	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	7	NGS	31	M	Mioc. No Clasific.	ANK2	c.11326A>G	p.3776T>A	rs746620876	---	---	---	VSI	---	---	Neutral	Polymorphism
31-40	7	NGS				TTN	c.90538C>T	p.30180R>C	rs72648272	0.4066/0.0495/0.2902	0.4045	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	7	NGS				TTN	c.26542C>T	p.8848H>Y	rs72650011	0.4067/0.0745/0.2987	0.4143	CM116750	VPP	ARVC	Benign	Deleterious	Polymorphism
31-40	7	NGS				TTN	c.9359G>A	p.3120R>Q	rs72647894	0.4419/0.0908/0.3229	0.4396	---	VSI	---	Damaging	Neutral	Polymorphism
31-40	8	NGS	31	M	Mioc. No Clasific.	ANK2	c.9185A>G	p.3062E>G	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	8	NGS				TTN	c.100184delA	p.K3395fs	rs281864930	---	---	---	VPP	---	---	---	Disease causing
31-40	9	NGS	37	M	HCM	SCN5A	c.1127G>A	p.376R>H	rs199473101	0.0119/0/0.008	---	CM054856	VPP	BrS	Damaging	Neutral	Disease causing
31-40	9					TNNT2	c.101C>T	p.34A>V	---	---	0.0008242	---	VSI	---	---	Neutral	Polymorphism
31-40	9					TTN	c.89795C>A	p.29932P>H	---	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
31-40	9					TTN	c.46610G>A	p.15537R>H	---	---	0.001666	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing

31-40	10	NGS	38	M	DCM	ACTN2	c.1984C>T	p.662R>W	rs15002173 g	0.0/0.0227/0.0077	0.004943	---	VSI	---	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
31-40	11	NGS	38	M	HCM	MYBPC3	c.2539_2549delinG	p.Y847_N850delin D	---	---	---	---	VPP	---	---	---	---
31-40	11					TTN	c.34372G>C	p.11458V>L	---	---	---	---	VSI	---	Damagin g	Neutral	Disease causing
31-40	12	NGS	39	M	HCM	DSG2	c.3175T>A	p.1059S>T	rs20178615 8	---	0.02816	CM071712	VP	ARVC	Damagin g	Neutral	Polymorphism
31-40	12					MYBPC3	c.103C>T	p.35R>W	---	---	0.005626	CM091020 3	VP	HCM	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
31-40	12					TTN	c.15625G>A	p.5209G>S	rs37496461 2	0.0121/0.0/0.0083	0.005090	---	VSI	---	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
31-40	13	NGS	40	M	HCM	TTN	c.76559G>A	p.25520S>N	rs20045002 2	0.085/0.0/0.0583	0.05921	---	VSI	---	Bening	Neutral	Disease causing
31-40	13					TTN	c.17066G>C	p.5689G>A	rs20011874 3	0.0843/0.0/0.0574	0.08920	---	VSI	---	Bening	Neutral	Disease causing
41-50	14	NGS	41	M	DCM	MYBPC3	c.2177C>T	p.726R>C	---	---	0.003633	CM092563	VP	HCM	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
41-50	14					HCN4	c.2800C>T	p.934R>C	rs19963846 5	0.0133/0/0.0088	0.06047	---	VSI	---	Damagin g	Neutral	Disease causing
41-50	15	NGS	41	M	DCM	DSP	c.6497G>A	p.2166R>Q	---	---	0.000824 4	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	15					TTN	c.47501T>G	p.15834I>S	rs77689939 8	---	0.000831 2	---	VSI	---	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
41-50	15					TTN	c.4208G>C	p.1403R>T	rs53159092 1	---	0.03321	---	VSI	---	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
41-50	16	NGS	44	M	HCM	CSRP3	c.10T>C	p.4W>R	rs45550635	0.5358/0.0455/0.369 7	0.237	CM023060	VP	DCM	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
41-50	16					HCN4	c.2730C>A	p.910F>L	rs20081453 4	0.0123/0.0/0.0081	0.01675	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	17	NGS	45	M	HCM	ANK2	c.10948G>C	p.3650E>Q	---	---	0.001649	---	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	17					TTN	c.19570G>A	p.6524D>N	rs72648973	0.1463/0.0539/0.117 5	0.07463	---	VSI	---	Damagin g	Deleteriou s	Disease causing
41-50	17					TTN	c.41023C>T	p.13675P>S	rs72677242	0.3262/0.0258/0.230 5	0.5239	---	VSI	---	Benign	Deleteriou s	Disease causing
41-50	17					TTN	c.10966G>A	p.3656A>T	rs72648923	0.3282/0.0267/0.233 9	0.3419	---	VSI	---	Damagin g	Neutral	Disease causing
41-50	18	NGS	45	H	HCM	TTN	c.62584G>A	p.20862V>I	rs54970948 1	---	0.002488	---	VSI	---	Damagin g	Neutral	Disease causing
41-50	18					TTN	c.289G>A	p.97V>M	rs18592134 5	0.0349/0.0227/0.030 8	0.2084	---	VSI	---	Damagin g	Neutral	Disease causing
41-50	19	NGS	46	M	DCM	TTN	c.23131A>G	p.7711I>V	rs72648994	0.0486/0.0524/0.049 8	0.43	---	VSI	---	Damagin g	Neutral	Polymorphism
41-50	19					TTN	c.67191A>C	p.22397Q>H	rs20151252 7	0.1936/0.0262/0.140 6	0.09869	---	VSI	---	Damagin g	Neutral	Polymorphism
41-50	19					TTN	c.95443G>C	p.31815E>Q	rs14852515 5	0.0603/0.512/0.0574	0.3337	---	VSI	---	Benign	Deleteriou s	Disease causing
41-50	20	NGS	46	M	HCM	TTN	c.96220- 96222delCCT	p.P32074del	---	---	---	---	VPP	---	---	Deleteriou s	Disease causing
41-50	20	NGS	46	M	HCM	RYR2	c.649A>G	p.217I>V	rs20064252 5	0.0362/0.0/0.0246	0.01408	CM125874	VPP	LQTS	Benign	Neutral	Disease causing

41-50	20				TTN	c.61160G>C	p.20387G>A	rs20138108 5	0.0366/0.0/0.0252	0.02398	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	21	NGS	47	F	DCM	ANK2	c.2048A>G	p.683D>G	---	---	---	VSI	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	21					RYR2	c.3380A>G	p.1127E>G	rs20052596 2	0.0832/0.0/0.0556	---	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	21					DMD	c.8555A>G	p.2852K>R	---	---	0.001181	VSI	---	Benign	Neutral	Disease causing
41-50	21					VCL	c.1907A>G	p.636H>R	rs71579374	0.1279/0.0227/0.092 3	0.1492	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	22	NGS	48	M	HCM	TTN	c.30760- 30762delGAA	p.E10254del	---	---	---	VPP	---	---	Deleterious	Polymorphism
41-50	23	NGS	49	M	HCM	PKP2	c.1468C>T	p.490R>W	rs14993087 2	0.0233/0.159/0.0693	0.06146	VSI	---	Damaging	Neutral	Polymorphism
41-50	24	NGS	49	F	HCM	PKP2	c.712G>T	p.269G>R	---	---	0.000826 4	VSI	---	Damaging	Neutral	Disease causing
41-50	24					CACNA1 C	c.805G>A	p.550N>S	---	---	0.003790	VPB	---	Benign	Neutral	Polymorphism
41-50	24					TTN	c.55862G>T	p.18621G>V	---	---	---	VPP	---	Damaging	Deleterious	Disease causing
41-50	25	NGS	49	M	DCM	ANK2	c.158G>C	p.53G>A	---	---	0.000886 0	VSI	---	Damaging	Deleterious	Polymorphism
41-50	25					TTN	c.89737G>A	p.29913G>R	rs11161603 7	0.0119/0.0246/0.016	0.003876	VSI	---	Damaging	Deleterious	Disease causing

Tabla 8. Tabla resumen del número de variantes encontrados por Sanger y Secuenciación masiva en la cohorte de inexplicados y miocardiopatías. Los genes se muestran clasificados en dos grupos, los que están asociados a canales iónicos y los asociados a proteínas estructurales. En las columnas se ha contabilizado el número de variantes encontradas en cada gen por cada metodología, el porcentaje relativo al total de variantes encontradas en cada grupo (columna % Grupo Genético), y el porcentaje total de variantes encontradas.

		INEXPLICADOS					MIOCARDIOPATÍAS		
		SANGER		NGS			NGS		
GEN		N = 6	%	N = 191	% Grupo Genes	% TOTAL	N = 62	% Grupo Genes	% TOTAL
Genes asociados a canales iónicos	SCN5A*	3	50,0%	10	19,6%	5,2%	2	16,7%	3,2%
	KCNH2*	2	33,3%	4	7,8%	2,1%	---	---	---
	KCNE1*	---	---	---	---	---	---	---	---
	KCNE2*	---	---	1	2,0%	0,5%	---	---	---
	KCNE3*	---	---	2	3,9%	1,0%	---	---	---
	KCNQ1*	---	---	1	2,0%	0,5%	---	---	---
	RYR2*	1	16,7%	4	7,8%	2,1%	2	16,7%	3,2%
	ANK2			9	17,6%	4,7%	5	41,7%	8,1%
	CACNA1C			7	13,7%	3,7%	1	8,3%	1,6%
	CACNB2			3	5,9%	1,6%	---	---	---
	CASQ2			2	3,9%	1,0%	---	---	---
	GPD1L			1	2,0%	0,5%	---	---	---
	HCN4			4	7,8%	2,1%	2	16,7%	3,2%
	KCNJ2			2	3,9%	1,0%	---	---	---
	SCN4B			1	2,0%	0,5%	---	---	---
TOTAL		6	100%	51	100,0%	26,7%	12	100%	19,40%
Genes asociados a proteínas estructurales	ACTC1			---	---	---	---	---	---
	ACTN2			1	0,7%	0,5%	1	2,0%	1,6%
	CAV3			1	0,7%	0,5%	---	---	---
	CRYAB			---	---	---	---	---	---
	CSRP3			---	---	---	1	2,0%	1,6%
	DES			2	1,4%	1,0%	---	---	---
	DMD			4	2,9%	2,1%	1	2,0%	1,6%
	DSC2			2	1,4%	1,0%	---	---	---
	DSG2			3	2,1%	1,6%	1	2,0%	1,6%
	DSP			8	5,7%	4,2%	1	2,0%	1,6%
	EMD			---	---	---	---	---	---
	FBN1			9	6,4%	4,7%	1	2,0%	1,6%
	GLA			---	---	---	---	---	---
	JPH2			1	0,7%	0,5%	---	---	---
	JUP			4	2,9%	2,1%	1	2,0%	1,6%
LAMP2			---	---	---	---	---	---	

LDB3		1	0,7%	0,5%	---	---	---
LMNA		1	0,7%	0,5%	---	---	---
MYBPC3		5	3,6%	2,6%	5	10,0%	8,1%
MYH6		4	2,9%	2,1%	---	---	---
MYH7		5	3,6%	2,6%	---	---	---
MYL2		---	---	---	---	---	---
MYL3		---	---	---	---	---	---
MYOZ2		---	---	---	---	---	---
PDLIM3		---	---	---	---	---	---
PKP2		4	2,9%	2,1%	3	6,0%	4,8%
PLN		---	---	---	---	---	---
PRKAG2		3	2,1%	1,6%	---	---	---
SGCB		---	---	---	---	---	---
SGCD		---	---	---	---	---	---
TAZ		---	---	---	---	---	---
TCAP		1	0,7%	0,5%	---	---	---
TGFB3		2	1,4%	1,0%	---	---	---
TGFBR2		1	0,7%	0,5%	---	---	---
TNNC1		2	1,4%	1,0%	---	---	---
TNNI3		---	---	---	1	2,0%	1,6%
TNNT2		1	0,7%	0,5%	1	2,0%	1,6%
TPM1		1	0,7%	0,5%	---	---	---
TTN		71	50,7%	37,2%	31	62,0%	50,0%
VCL		3	2,1%	1,6%	2	4,0%	3,2%
TOTAL		140	1	73,3%	50	100%	80,6%

