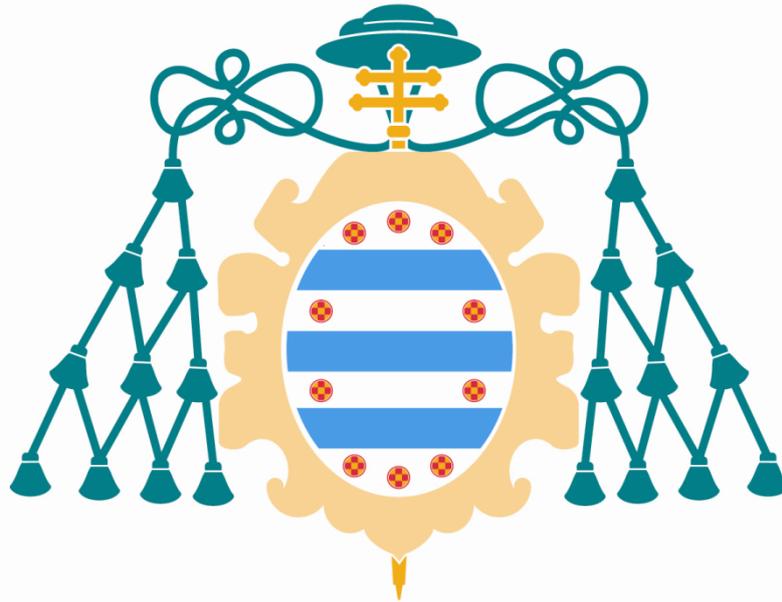


Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN MEDICINA
DEPARTAMENTO: MEDICINA**

Miocardopatía Hipertrófica: Identificación de nuevos genes mediante técnicas de secuenciación masiva

Juan Gómez de Oña



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN MEDICINA
DEPARTAMENTO: MEDICINA**

Miocardopatía Hipertrófica: Identificación de nuevos genes mediante técnicas de secuenciación masiva

Juan Gómez de Oña

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Miocardiopatía hipertrófica: Identificación de nuevos genes mediante técnicas de secuenciación masiva.	Inglés: Hypertrophic Cardiomyopathy: Identification of new genes by massive parallel sequencing

2.- Autor	
Nombre: Juan Gómez de Oña	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Medicina	
Órgano responsable: Comisión de doctorado del Programa de Doctorado "Investigación en Medicina"	

RESUMEN (en español)

La Miocardiopatía Hipertrófica (MCH) es la enfermedad cardíaca hereditaria más común, con una incidencia de 1/500. Está causada mayoritariamente por variantes patológicas de la secuencia del ADN en los genes que codifican proteínas del sarcómero, la unidad funcional contráctil del músculo, entre las que destacan los genes de la cadena pesada de la beta miosina (*MYH7*) y de la proteína C de unión a la beta miosina (*MYBPC3*). Entre las dos son responsables de aproximadamente el 50% de los casos de MCH en los que se han hallado mutaciones causales. Sin embargo, en un 30-60% de los casos la variante genética causal no es identificada, por lo que deben existir otros genes relacionados con la patología, aún no descritos.

La secuenciación masiva o de nueva generación, *next generation sequencing* (NGS) en sus siglas en Inglés, ha revolucionado el campo de la Genética. Dichas técnicas presentan tres ventajas fundamentales respecto al método de secuenciación tradicional, o método de Sanger: la creación de las *librerías* se lleva a cabo sin la necesidad de clonación bacteriana (es decir, es un sistema libre de células), la realización de múltiples de reacciones de secuenciación en paralelo, y sin necesidad de llevar a cabo una electroforesis para visualizar las secuencias. Estas tres características han supuesto una drástica disminución en los costes y el tiempo de estudio, a la vez que se producía un aumento exponencial del número de lecturas de pares de bases secuenciadas por experimento. Dentro de las numerosas aplicaciones de la NGS, la secuenciación de todas las regiones codificantes del ADN o exoma, ha supuesto un avance muy significativo a la hora de identificar nuevos genes asociados a diversas patologías.

Con estos antecedentes, nos propusimos los objetivos de desarrollar un protocolo de secuenciación masiva mediante chips semiconductores (NGS *Ion Torrent Personal Genome Machine*, PGM) para el cribado de los principales genes asociados a la MCH, de tal manera que pudiéramos aumentar la cantidad de genes estudiados a la vez que disminuíamos los costes y el tiempo necesario para ello. El protocolo sería extensible a cualquier laboratorio para facilitar el diagnóstico genético de la enfermedad. A partir de las familias sin mutación sarcomérica identificada, nos propusimos como segundo objetivo la búsqueda de nuevos genes candidatos mediante análisis del exoma y posterior validación con estudios funcionales.

1. Diseñamos un panel (software *Ion Ampliseq Designer*) que contuviera la secuencia codificante y al menos las 5 pares de bases intrónicas flanqueantes de los principales genes asociados a la MCH: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, y *TNNC1*. Para la validación de dicho protocolo, secuenciamos muestras "control" que ya sabíamos que eran portadores de alguna variante patogénica. Identificamos todas estas variantes, por lo que concluimos que nuestro protocolo de secuenciación masiva era válido para el cribado de los principales genes asociados a la MCH, y como tal definimos el espectro mutaciones de los 9 genes en una cohorte de más de 500 pacientes.

2. A continuación seleccionamos una serie de pacientes sin mutación en los principales genes asociados a la MCH, y secuenciamos su exoma. Tras el análisis bioinformático identificamos al gen de la filamina C (*FLNC*) como el mejor candidato, por lo que analizamos su secuencia en una cohorte de 448 pacientes y 450 controles. Entre los pacientes había 168 portadores de una posible mutación en los principales genes sarcoméricos (38%). Identificamos un total de 38 variantes con posible efecto funcional (incluyendo una variante sin sentido) en el gen *FLNC* en

la cohorte de MCHs, frente a sólo 22 variantes entre los controles. De todas estas, 25 estaban presentes solo en los pacientes frente a solo 9 en solo los controles ($p < 0.05$). A su vez, 13 de las variantes identificadas en los pacientes no estaban descritas en las bases de datos del exoma, por solo una de las halladas en los controles ($p < 0.05$). De las 38 variantes de la cohorte de MCHs seleccionamos 20 en 22 portadores para realizar estudios de co-segregación familiar. De ellas, 4 pacientes eran a su vez portadores de variantes en los genes *MYH7* ó *MYBPC3*, por 18 que eran portadores sólo de variantes en *FLNC*, resultando en diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Pudimos realizar dichos estudios en 15 variantes, pertenecientes a 16 familias. Entre los pacientes de MCH sin variación causal identificada en los principales genes sarcoméricos, en 11 familias de las estudiadas había al menos un segundo familiar con signos de MCH y todos ellos eran portadores de la correspondiente variante en *FLNC*. En total, en estas familias identificamos un total de 36 portadores de variantes en *FLNC*, mostrando 27 de ellos signos de MCH.

3. Además, realizamos estudios funcionales en tejido cardíaco de dos de las variantes en *FLNC*, observando la formación de agregados de filamina C. Mediante mutagénesis dirigida se transfectaron en células cardíacas de rata los ADNc de 4 de las variantes, y se comprobó que resultaban en la formación de agregados de *flnc*.

Por tanto, basándonos en la frecuencia poblacional de variantes candidatas (enfermos y controles), los predictores bioinformáticos, la segregación familiar, y los estudios funcionales clasificamos a las variantes en *FLNC* como probablemente patogénicas ($n=6$), posiblemente patogénicas ($n=3$), de significado incierto ($n=7$), y probablemente benignas ($n=4$).

En resumen, el protocolo de secuenciación masiva mediante chips semiconductores es un método válido para el cribado de los principales genes asociados a la Miocardiopatía hipertrófica, con una reducción importante de coste y tiempo de trabajo. Es trasladable a la práctica clínica (cribado genético) con resultados similares a los descritos para otras técnicas de NGS. Por otro lado, presentamos evidencias de que el gen *FLNC* estaría implicado en el desarrollo de un número significativo de casos de MCH, que podría llegar al 2% del total en nuestra población. Sin embargo, la penetrancia incompleta y el carácter benigno de la mayoría de las variantes identificadas resulta a menudo en una clasificación como de significado patogénico incierto, lo que puede dificultar su empleo como predictoras del riesgo de desarrollar la enfermedad entre los portadores y, por tanto, limitar el consejo genético familiar.

RESUMEN (en Inglés)

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common heritable cardiac disease, with a prevalence of one in 500. It is caused by DNA pathogenic sequence variations in the genes encoding protein components of the sarcomere, contractile muscle functional unit, with special mention to genes encoding myosin heavy chain 7 (*MYH7*), and myosin-binding protein C. Between both, they are responsible of approximately 50% of HCM cases in which the causal mutation is found. However, in 30-60% of cases, the causal genetic variation it is not identified, thus other disease-associated genes should be exist, not yet reported.

Massive parallel sequencing, or next generation sequencing (NGS), has revolutionized Molecular Genetics. These techniques achieve three fundamental advantages compared to traditional sequencing method, also called Sanger method: DNA libraries creation is performed without the necessity of bacterial cloning (i.e., cell-free system), multiple parallel sequencing reactions can be performed in a single run, and there is no need of electrophoresis to visualize sequences. These three characteristics have led to a drastic decrease in cost and time labor of the genetic studies, at the same time that an exponential increase of the throughput of sequence reads per experiment. Among the several NGS applications, sequencing of the DNA coding regions, exome sequencing, have led to the identification of new genes associated to several diseases.

According to this background, our aim was to develop and NGS protocol based on semiconductor chips (*Ion Torrent Personal Genome Machine*, PGM), for the screening of the main HCM-associated genes, thus we could increase the number of genes studied, at the same time that we decreased costs and labor time. This protocol could be applied by any other laboratory to facilitate the genetic diagnostic of HCM. From the families without sarcomere mutation identified, we proposed as second objective, the identification of new genes through exome sequencing, and the latter validation of the results by functional studies.

1. We designed a panel (*Ion Ampliseq Designer* software), which contains the coding sequence plus at least 5 intronic flanking bases of the main HCM-associated genes: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, y *TNNC1*. For protocol validation, we sequenced "control" samples, which harbor a pathogenic variant. We identified all control variants, thus we concluded that our NGS protocol was valid for the screening of the main HCM-associated genes, thus we defined the mutational spectrum of the 9 genes in a large cohort of HCM patients.

2. Next, we selected several patients without mutations in the main HCM-associated genes, and sequenced their exome. After the bioinformatics analysis, we identified *FLNC* gene as the best candidate gene, thus we NGS sequenced *FLNC* in a cohort of 448 HCM patients, and 450 controls. Among the HCM patients, 168 of them were carriers of a possible mutation in the main sarcomere genes (38%). We identified a total of 38 *FLNC* variants (including a non-sense) in the HCM cohort with possible functional effect, compared to 22 variants in the control cohort. Among them, 25 were presented only in the HCM cohort, compared to 9 in the control cohort ($p < 0.05$). In addition, 13 of these variants were not previously reported in the HCM cohort, compared to 1 in the control cohort ($p < 0.05$). We selected 20 HCM cohort variants in 22 patients for familial co-segregation studies. Among them, 4 patients were also carriers of another variant in *MYH7/MYBPC3* genes, thus 18 patients were not carriers of additional variants in the sarcomere genes, resulting in significant difference between these two groups. We could perform familial studies in 15 variants, belonging to 16 families. Among patients without variation in the main sarcomere genes, in 11 families had at least one HCM affected relative available, and all of them were carriers of the corresponding *FLNC* variant. Overall all, we identified 36 *FLNC* carriers in these families, and 27 of them had HCM signs.

3. Besides, we performed functional studies in cardiac tissue in 2 *FLNC* variants, which showed the formation of filamin C aggregates. We performed directed mutagenesis to create cDNA clones of 4 *FLNC* variants, and transfected them in rat cardiac cells, resulting in flnc aggregates. Thus, based on population frequencies, bioinformatic *in silico* predictors, co-segregation studies, and functional studies, we classified *FLNC* variants as probably pathogenic ($n=6$), possibly pathogenic ($n=3$), as of uncertain significance ($n=7$), and probably benign ($n=4$).

In summary, the NGS protocol by semiconductors chips is a valid method for the screening of the main HCM-associated genes, with a significant decrease in costs and labor time. It is transferable to clinical practice with similar results to which already NGS reported methods. In addition, we showed evidence that *FLNC* genes is involved in a significant cases of Hypertrophic Cardiomyopathy, which could reach 2% in our population. However, incomplete penetrance and most likely benign character of most of the variants identified often lead to as of uncertain pathogenic significance classification, which difficult its use as HCM developmental predictors, thus limiting familial counseling.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

"La vida es una obra de teatro que no permite ensayos.

Por eso canta, ríe, baila, llora, y vive intensamente cada momento de tu vida....antes de que el telón baje y la obra termine sin aplausos."

(Charles Chaplin)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a Eli y Mavi, el haberme brindado la oportunidad de trabajar a su lado, y hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral. Cuando llegué a su laboratorio de Genética para hacer las prácticas de empresa de la Universidad, era un alumno de Biología que se estaba tomando la carrera "con calma", que no sabía nada del trabajo de Laboratorio ni de la Investigación, y ellos me aceptaron y apoyaron desde el primer día, a pesar de mis limitados conocimientos, e incluso mis "pintas" (de aquella todavía tenía esperanzas de convertirme en una estrella de Rock....así de ingenuo e iluso era). Muchísimas gracias por todo.

También quisiera agradecer a las que fueron por un (por desgracia limitado) tiempo mis compañeras pre-doctorales de laboratorio: Ele, Lore, María, Luci y Bea. Ellas ya estaban metidas en pleno doctorado, y a pesar de ello, emplearon su tiempo en enseñarme, y muy bien, todos los secretos y truquillos de un laboratorio. Me acogieron con los brazos abiertos, y me integraron en su grupo, a pesar de contar con un cromosoma Y. No estuvisteis en la parte final de mi viaje doctoral, pero vuestro recuerdo y consejos los tendré siempre presentes. Mi eterno agradecimiento.

Quisiera acordarme también del resto de personal del Laboratorio, los que se han ido y los que han venido, con los que ha sido un placer trabajar, siempre sonrientes y dispuestas a facilitarme el trabajo: Blanca, Vero, Marta, Ana, Loli, Ana Rosa, Mónica (de cito), Paula, Pilar, Vicky, y especialmente a Sara y Belén, las cuales me han dado soporte en todo momento para que la realización de esta Tesis fuera posible.

También he tenido la fortuna y el placer de trabajar de manera estrecha con la Unidad de Cardiopatías Familiares del HUCA, con mi co-director de Tesis, el Dr. Julián Rodríguez Reguero, gran médico y profesional, y mejor persona (aunque sea del Madrid a muerte). Sin tu entusiasmo nada habría sido igual. Así mismo, agradecer también a Rebeca Lorca, David Calvo, y María Martín, su predisposición y ayuda, para intentar paliar mis lagunas en Cardiología.

He tenido el enorme privilegio de colaborar con el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oviedo, dirigido por el Dr. Carlos López Otín, y entre los que se encuentran Xose Antón, Ana, Rafa, y Diana. He aprendido muchísimo de vosotros, y habéis dado un impulso definitivo a mi Tesis Doctoral, llevándola a cotas inimaginables sin vuestra ayuda. Muchas gracias.

Quería mencionar también a los integrantes del servicio de secuenciación de los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo, Jose Luis, Daniel, y Marcos, por su apoyo y enseñanzas, especialmente en los primeros pasos del manejo de las técnicas de secuenciación masiva con el Ion Torrent, siempre dispuestos a contestar preguntas.

Por último, aunque no menos importante, quisiera dar las gracias a mi familia en general, y amigos, especialmente:

A mis Padres, Ernesto y María, por creer en mí, y no echarme de casa cuando era un vago redomado (alguna vez la bala pasó rozando), y luego apoyarme y darme todo su cariño y ayuda cuando empecé a cumplir. Sois la mayor fuente de inspiración que ningún hijo pudiera tener, y jamás podré agradecerlos lo suficiente el ser simplemente como sois.

A mi "segunda mamá", Oli, la cual me crió como si fuera su propio hijo mientras mis padres trabajaban. Gracias por todos los sacrificios que has hecho por mí y mi familia, de la cual formarás parte siempre. A mi "padrino oficioso", Santi, siempre pendiente de mí y de mi futuro, y echándome un cable siempre que lo necesitaba.

A mis queridos hermanos, A.K.A: Grassa, Krol, Jrul, y Bol. Ha sido una pasada crecer con vosotros, entre risas, juegos, peleas, discusiones....¡nunca hubo tiempo para el aburrimiento, y seguirá sin haberlo!

Y por supuesto, a mi pareja, Romina. Gracias por estar a mi lado todo este tiempo, a pesar de mis múltiples defectos, y darme todo el cariño del mundo, aguantando estoicamente mis chapas sobre Genética, y poniendo siempre mis necesidades por encima de las tuyas.

Finalmente, a mis amigos, los cuales por suerte son tantos que es imposible que pudiera nombrar sin ocupar media Tesis. Tengo la inmensa suerte no sólo de conservar la mayoría de ellos desde parvulitos, sino de haber ido añadiendo de diferentes ámbitos, como la Facultad, el equipo de Fútbol, Valdepeñas, familiares de otros amigos, amigos de amigos,....la gente suele decir que los amigos de verdad se cuentan con los dedos de una mano, en mi estudio diría que eso es rotundamente falso, con un p-valor brutalmente significativo. Gracias a todos.

Siento si me he extendido un poco en esta parte, pero entiendo que una Tesis Doctoral es una experiencia muy importante en la vida de una persona, años de trabajo, aprendizaje, sufrimiento, y recompensas. Un viaje alucinante, el cual no se puede hacer solo, y es de justicia reconocer a tus compañeros de viaje.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: albúmina de suero bovino, *Bovine Serum Albumin*

CNAG: Centro Nacional de Análisis Genómicos

DAI: Desfibrilador auto-implantable

ESP: *Exome Sequencing Project*

ExAC: *Exome Aggregation Consortium database*

FLNC: Gen de la proteína filamina C

IGV: Visor integrador del genoma, *Integrative Genome Viewer*

MCD: Miocardiopatía Dilatada

MCH: Miocardiopatía Hipertrófica

MCR: Miocardiopatía Restrictiva

MSC: Muerte súbita cardiaca

NGS: Secuenciación de nueva generación, *Next Generation Sequencing*

OBTVI: Obstrucción al tracto de salida del ventrículo izquierdo

PGM: *Personal Genome Machine*

VC: *Variant Caller*

VI: Ventrículo izquierdo

VSI: Variante de significado incierto

Índice

INTRODUCCIÓN	1
I. Miocardiopatía hipertrófica: definición, diagnóstico, y epidemiología	1
II. MCH y muerte súbita cardiaca	3
III. Fisiopatología	4
<i>Alteración del ciclo del calcio</i>	5
<i>Alteración de la homeostasis energética</i>	5
<i>Incremento de la fibrosis del miocardio</i>	5
<i>Alteración del mecanismo de detección del estrés biomecánico</i>	5
IV. Genética de la Miocardiopatía Hipertrófica	6
V. Secuenciación masiva o de nueva generación (NGS)	8
VI. Secuenciación del exoma	11
VII. Consejo genético en la MCH	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
METODOLOGÍA	19
I. Pacientes y controles	19
II. Secuenciación masiva o de nueva generación	20
<i>Preparación de la muestra</i>	20
<i>Diseño del panel de amplificación (Ampliseq)</i>	20
<i>Creación de las librerías</i>	21
<i>PCR en emulsión, enriquecimiento, y secuenciación</i>	23
<i>Validación del protocolo de NGS</i>	24
III. Flujo de trabajo para la identificación de nuevos genes en la MCH	24
IV. Secuenciación masiva de genes candidatos	26
V. Clasificación de las variantes identificadas	27
VI. Estudios funcionales de la filamina C	28
<i>Biopsias musculares</i>	28

<i>Inmunohistoquímica</i>	28
<i>Microscopía electrónica</i>	29
<i>Estudios en tejido cardiaco</i>	29
<i>Mutagénesis dirigida</i>	29
<i>Cultivos celulares e inmunofluorescencia</i>	29
<i>Extracción secuencial de proteínas y western blot</i>	30
VII. Análisis estadístico	31
RESULTADOS	33
I. Características de la cohorte de pacientes	33
II. Validación del método de secuenciación masiva	33
III. Variación en los principales genes sarcoméricos	34
IV. Identificación de nuevos genes en la MCH mediante secuenciación del exoma	35
V. Secuenciación masiva del gen FLNC	36
VI. Espectro de la variación en FLNC	37
VII. Características de los controles con variantes candidatas	39
VIII. Variantes candidatas para estudios familiares en pacientes MCH	40
IX. Estudios funcionales	41
X. Estudios familiares y clasificación final de las variantes	45
<i>Variantes probablemente patogénicas</i>	45
<i>Variantes posiblemente patogénicas</i>	48
<i>Variantes de significado incierto y probablemente benignas</i>	49
<i>Dobles portadores FLNC + MYBPC3 o MYH7</i>	50
<i>Características de los portadores de variantes en FLNC</i>	52
<i>Topografía de las variantes en FLNC, relativa a los dominios de la proteína</i>	54
DISCUSIÓN	57
<i>Desarrollo de un protocolo de NGS para la MCH</i>	57

<i>¿Nuevos genes en la MCH?: secuenciación del exoma</i>	<i>60</i>
<i>FLNC: ¿un nuevo gen en la MCH?</i>	<i>62</i>
<i>FLNC más allá de la MCH: ¿un nuevo gen de cardiopatías estructurales?</i>	<i>65</i>
CONCLUSIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	77

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. Miocardiopatía hipertrófica: definición, diagnóstico, y epidemiología

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) fue descrita por primera vez en 1958 en una serie de ocho pacientes por el médico británico Donal Teare, que la definió como una "hipertrofia asimétrica del corazón" [1]. Debido a la diversidad de sus manifestaciones clínicas la MCH ha recibido varias denominaciones, como cardiopatía hipertrófica obstructiva o hipertrofia idiopática con estenosis aórtica, lo que puede inducir a confusión con otras entidades clínicas. La definición definitiva es la de un engrosamiento primario o esencial de la pared del ventrículo izquierdo (VI); es decir, que dicho engrosamiento no puede ser secundario o explicable por otra causa o condición como la hipertensión arterial sistémica, o la práctica intensa de ejercicio deportivo, siendo la hipertrofia del VI en este caso fisiológica (**Figura 1**) [2]. Una característica de muchas hipertrofias no esenciales o secundarias es que el VI regresa a un grosor normal una vez su causa es controlada, como sucede con el "corazón del atleta" cuando el deportista sigue un periodo de reposo [3].

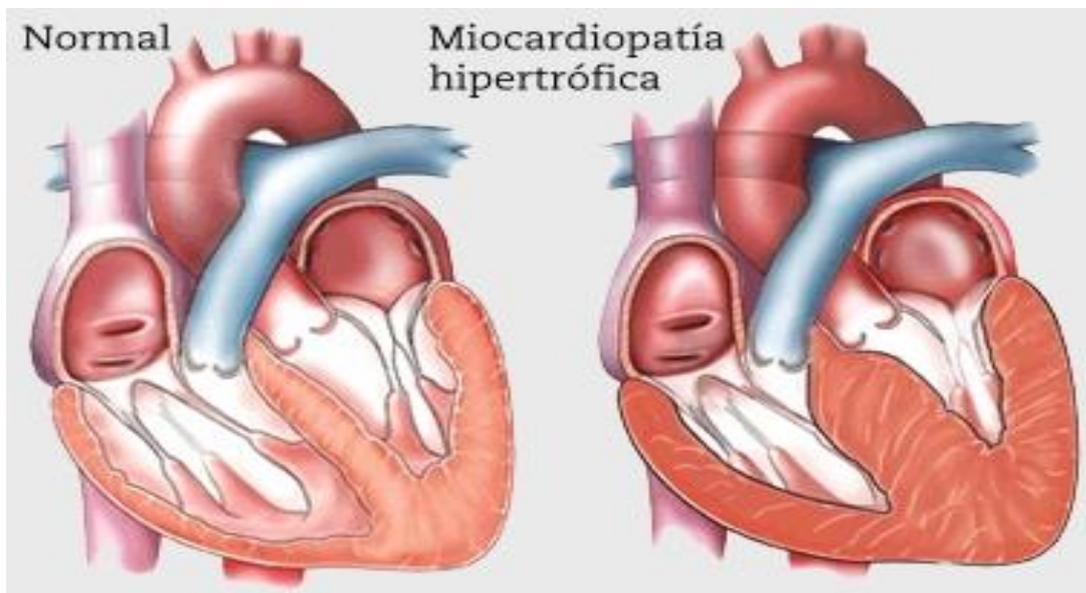


Figura 1: Imagen de un corazón normal y con MCH.

Figura adaptada del ICBA: <http://www.icba.com.ar/pacientes/patologias/miocardiopatiahipertrofica.html>

Los síntomas que nos pueden sugerir que estamos ante un caso de MCH pueden ser variables, pero con frecuencia la dificultad para respirar ante esfuerzos o disnea suele ser el primero, siendo también frecuentes el dolor torácico o las palpaciones. El síncope, e incluso la muerte súbita cardíaca (MSC), pueden ser los primeros síntomas en algunos pacientes. Con todo, la sintomatología de la MCH es muy variable y abarca desde pacientes con manifestaciones muy leves que llevan una vida normal, a síntomas incapacitantes. Esto hace que el manejo del paciente sea en muchos casos complejo, y que sea difícil la toma de decisiones preventivas como la implantación de un desfibrilador auto-implantable (DAI). Ante un paciente en el que sospechamos una MCH podemos avanzar en el diagnóstico a través de las alteraciones en su electrocardiograma (ECG), aunque la confirmación y clasificación final requiere una ecocardiografía en la que se observe un septo de 15 o más mm [2]. La resonancia magnética puede ser útil para el diagnóstico y para la clasificación (subtipo) de la hipertrofia del VI.

La MCH puede ser obstructiva o no obstructiva, según haya o no una obstrucción del tracto de salida del VI (a partir de un gradiente subaórtico de 30 mm Hg). En cuanto a su localización, la hipertrofia se clasifica en asimétrica (distribuida de manera desigual a lo largo de la pared del septo), simétrica (toda la pared engrosada por igual), o apical (localizada en el ápice de la pared).

Algunas enfermedades presentan similitudes con la MCH y pueden dificultar su diagnóstico correcto. Entre estas “fenocopias” están la enfermedad de Fabry, el síndrome de Wolf-Parkinson-White, la enfermedad de Danon, o el síndrome de Noonan [4].

En cuanto a su epidemiología, la MCH fue durante muchos años considerada una enfermedad “rara”. Actualmente sabemos que es la enfermedad cardíaca de base genética más frecuente, con una incidencia de 1/500, y presente en todas las poblaciones y grupos étnicos [5]. Tampoco parece tener predilección por ninguno de los dos sexos, aunque se han sugerido algunas diferencias entre hombres y mujeres en lo referente a su severidad [6]. La MCH se puede presentar a lo largo de toda la vida, desde la infancia hasta adultos de edad avanzada. La tasa de mortalidad es de aproximadamente un 1%, valor que no difiere en exceso de la tasa para la población general, lo que sugiere un curso relativamente benigno y controlable por el cardiólogo en la mayoría de los casos [7].

II. MCH y muerte súbita cardiaca

La muerte súbita cardiaca (MSC) producida por la MCH es el efecto más visible y devastador de la enfermedad. Con todo, es relativamente infrecuente en estos pacientes y afectaría al 2-5% [8]. A pesar de ello, la MCH es una de las principales causas de MSC, y la primera entre sujetos jóvenes (<30 años), incluidos los deportistas [9]. A medida que avanzamos en edad la MSC es menos común, siendo rara en pacientes mayores de 60 años. La MSC es a menudo la primera manifestación clínica de la MCH, sin avisos o sintomatología previa que puedan sugerirla. Ésta puede producirse durante actividades físicas, pero también en reposo. El principal mecanismo por el que se produce es la taquicardia ventricular y la fibrilación ventricular. En 2014 la Sociedad Europea de Cardiología elaboró la guía de estratificación del riesgo de muerte súbita para la MCH [10]. En ella se establecen los siguientes criterios para el cálculo de un índice de riesgo, con el cual el cardiólogo valorará la implantación o no de un DAI:

- Edad de inicio: aumenta el riesgo cuanto menor es la edad.
- Grosor máximo de la pared del ventrículo izquierdo; siendo significativo a partir de 30 mm.
- Diámetro de la aurícula izquierda: aumentando el riesgo cuanto mayor es el diámetro
- Gradiente máximo de la obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo: a partir de 30 mm se considera que existe, y aumenta el riesgo cuanto mayor es el gradiente.
- Historia familiar de MCH: aumentando el riesgo si la hay.
- Taquicardia ventricular no sostenida: aumentando el riesgo.
- Síncope: aumentando el riesgo.

Tras introducir estos criterios en el calculador, éste genera un valor en el que nos basaremos para definir el riesgo y tomar medidas preventivas:

- Riesgo bajo: con una probabilidad de MSC en los próximos 5 años <4%. El DAI no está recomendado en estos casos.
- Riesgo intermedio: con una probabilidad de MSC en los próximos 5 años del 4-6%. El DAI puede ser considerado a criterio del cardiólogo.
- Riesgo alto: con una probabilidad de MSC en los próximos 5 años \geq 6%. El DAI debe ser considerado, siendo recomendable.

III. Fisiopatología

La hipertrofia del septo se acompaña a nivel microscópico de una desorganización de los miocitos del tejido cardíaco, con presencia de microisquemia en vasos pequeños y fibrosis (**Figura 2**)[11].

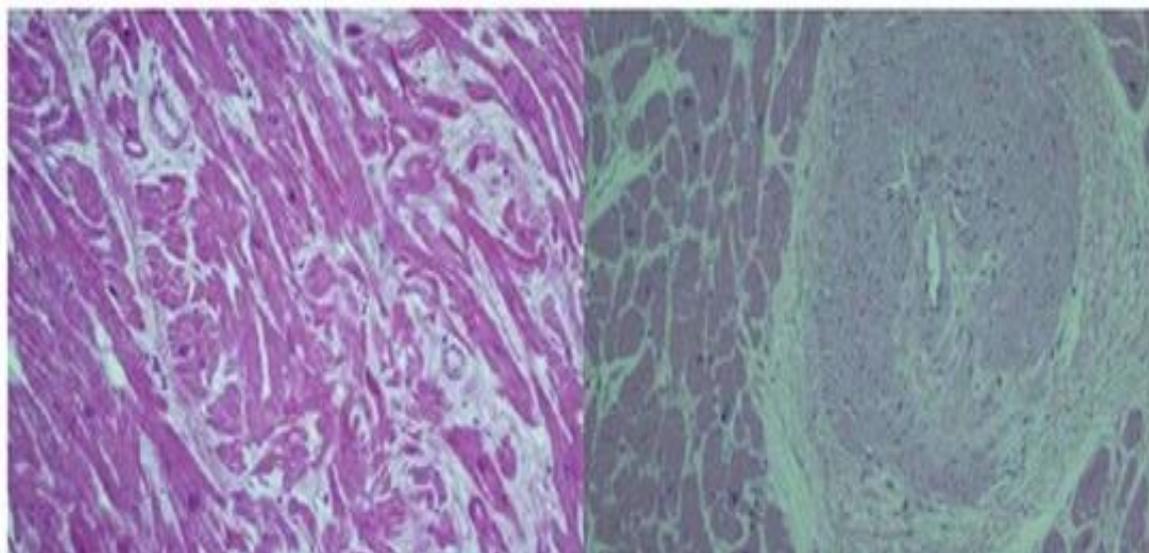


Figura 2: Anatomía patológica de tejido cardíaco. A la izquierda, desorganización de miofibrillas y fibrosis; a la derecha, hipertrofia de la capa media de las arteriolas intramiocíticas, características de la MCH. Figura tomada de SciELO.

Para entender la MCH a nivel molecular debemos tener en cuenta que se trata de una enfermedad del sarcómero cardíaco, con presencia en muchos casos de mutaciones en genes que codifican las proteínas sarcoméricas. Gran parte de nuestro conocimiento del mecanismo fisiopatológico procede de estudios con animales modificados genéticamente para expresar proteínas mutadas. Pese a los avances al respecto, los mecanismos moleculares por los que las mutaciones asociadas a la MCH causan la enfermedad siguen siendo controvertidos [12]. Inicialmente se postuló que las mutaciones provocaban una disminución de la capacidad contráctil que el corazón trataba de compensar, lo que forzaba su hipertrofia [13]. Aunque este modelo puede ser válido en muchos casos, en otros no explica la hipertrofia del VI. Por ejemplo, las mutaciones en *MYH7* (gen de la cadena pesada de la beta-miosina) pueden traducirse tanto en una reducción como en un incremento de la actividad contráctil [14-15]. Por lo tanto, nos situamos en un escenario complejo, sin un modelo único ya que coexistirían varios mecanismos que se pueden complementar:

Alteración del ciclo del calcio

En ratones transgénicos portadores de variantes en el gen *TNNT2* se demostró una alteración del ciclo del Ca^{2+} y la sensibilidad de los miocitos hacia este ion, provocando arritmias ventriculares, asociadas a la MCH [16]. Se han descrito tanto mecanismos de aumento como de disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} [17-18].

Alteración de la homeostasis energética

Este modelo postula la existencia de una capacidad energética deficiente, que se traslada a un aporte insuficiente para el sarcómero que “tratará” de compensarlo, con el resultado de la hipertrofia. En este modelo, factores como el ejercicio facilitarían el desarrollo de MCH en un sujeto genéticamente predispuesto [19]. Está avalado por estudios en ratones y ratas transgénicos, portadores de mutaciones en *MYH7* y *TNNT2* [20-21]. En estos estudios se observó que la ratio fosfocreatina-ATP está disminuida en alrededor del 30% en los portadores.

Incremento de la fibrosis del miocardio

La fibrosis del músculo cardíaco ha sido relacionada con la aparición de arritmias y la alteración del proceso de relajación cardíaca, el cual conllevaría el desarrollo de insuficiencia cardíaca en la MCH. Mediante técnicas de resonancia magnética cardíaca con gadolinio, la fibrosis puede ser medida in vivo, estando situada en muchos casos en áreas de engrosamiento de la pared. Esto parece relacionar la fibrosis con la hipertrofia de los miocitos [22]. Sin embargo, el desencadenante de la fibrosis en la MCH no está claro, aunque ha sido atribuida a la muerte por apoptosis de los miocitos y su consiguiente reemplazo por tejido intersticial [23]. Sin embargo, otros componentes celulares (principalmente fibroblastos), podrían jugar un papel en el desarrollo de la fibrosis independientemente de la proliferación y muerte de los miocitos [24].

Alteración del mecanismo de detección del estrés biomecánico

Las bandas M y el disco Z del sarcómero están implicados en la sensibilidad y la transmisión de la señal de estrés biomecánico [25]. La teoría de que una alteración en este mecanismo puede ser una señal pro-hipertrófica estaría avalada por el hecho de que mutaciones en genes que forman parte de estos componentes han sido relacionadas con la MCH. Entre otros, los genes de la proteína LIM del músculo liso (*CSRP3*), la miozenina-2 (*MYOZ2*), la telotonina (*TCAP*), y la miomesina-1 (*MYOM1*) [26-29].

IV. Genética de la Miocardiopatía Hipertrófica

Por definición, y dado su carácter primario o esencial, se asume que la MCH es una enfermedad de base genética mendeliana. Es decir, causada por variantes patogénicas monogénicas de herencia autosómica dominante, en contraposición a variantes genéticas poligénicas de tipo polimorfismo, que caracterizan a las enfermedades multifactoriales complejas, como la diabetes. Un carácter monogénico también conlleva que los factores adquiridos o ambientales podrían ayudar a desarrollar la MCH, pero no serían la causa determinante. Por otro lado, la presencia de variantes patogénicas de penetrancia elevada debería traducirse en una expresión familiar mendeliana característica, en el cual todos los portadores de la variante causal desarrollarían la enfermedad. Este modelo hereditario de la MCH se aproxima a la realidad, aunque debe ser matizado en el contexto de los datos recientes de secuenciación masiva de pacientes, y sujetos sanos.

La mayoría de los casos familiares siguen un patrón de herencia dominante, aunque en algunos casos existe una penetrancia reducida o incompleta, ya que algunos portadores pueden no manifestar síntomas incluso a edad avanzada [30-32]. Esto dependerá, fundamentalmente, del carácter “maligno” de la variante genética responsable de la enfermedad (en términos clásicos, de una mutación).

La primera impresión de la genética de la MCH era claramente optimista, con un modelo de herencia dominante y penetrancia casi total. Esto fue así porque los estudios iniciales exigían disponer de varios afectados con los que analizar el ligamiento a marcadores microsatélites de los genes candidatos. Mediante genética posicional se fueron identificando primero los loci cromosómicos de la MCH, y tras refinamiento de las regiones candidatas los genes correspondientes. Entre estos, *MYH7*, *MYBPC3* y *TNNT2*. La primera mutación asociada a la MCH fue p.R403Q en el gen *MYH7* [33]. A esta siguieron otras muchas en varios genes, la mayoría de ellos codificantes de proteínas del sarcómero [32]; aunque también en genes que codifican proteínas que regulan la homeostasis del calcio [34], del disco Z [26-29], e incluso de genes mitocondriales[35]. El escenario genético tiene muchos actores, pero *MYH7* y *MYBPC3* representarían el grueso de las mutaciones (**Tabla 1**).

Tabla 1: Principales genes asociados a la MCH, y la frecuencia en la que se encuentran mutaciones en los mismos.

Gen	Locus	Proteína	Tipo	Frecuencia
<i>MYH7</i>	14q12	Cadena pesada de la β -miosina cardiaca	Sarcómero (filamento grueso)	20-30%
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	Proteína C de unión a la miosina cardiaca	Sarcómero (filamento intermedio)	25-40%
<i>TNNT2</i>	1q32	Troponina T cardiaca	Sarcómero (filamento fino)	2-5%
<i>TNNI3</i>	19q13.4	Troponina I cardiaca	Sarcómero (filamento fino)	2-5%
<i>TPM1</i>	15q22.1	α -Tropomiosina	Sarcómero (filamento fino)	1-3%
<i>MYL2</i>	12q24.11	Cadena ligera reguladora de la miosina	Sarcómero (filamento grueso)	1-3%
<i>MYL3</i>	3p21.3-p21.2	Cadena ligera esencial de la miosina	Sarcómero (filamento grueso)	1%
<i>ACTC1</i>	15q14	α -Actina cardiaca	Sarcómero (filamento fino)	1%
<i>TNNC1</i>	3p21.1	Troponina C cardiaca	Sarcómero (filamento fino)	1%
<i>TTN</i>	2q31	Titina	Sarcómero (filamento grueso)	-
<i>MYH6</i>	14q12	Cadena pesada de la α -miosina cardiaca	Sarcómero (filamento grueso)	-
<i>ACTN2</i>	1q42-q43	α -Actinina 2	Disco Z	-
<i>LDB3</i>	10q22.3-q23.2	Dominio de unión de LIM 3	Disco Z	-
<i>CSRP3</i>	11p15.1	Proteína LIM del músculo liso	Disco Z	-
<i>MYOZ2</i>	4q26-q27	Myozenina 2	Disco Z	-
<i>TCAP</i>	17q12	Telotonina	Disco Z	-
<i>NEXN</i>	1p31.1	Nexilina	Disco Z	-
<i>VCL</i>	10q22.2	Vinculina	Disco Z	-
<i>CASQ2</i>	1p13.1	Calsecuestrina	Homeostasis del Calcio	-
<i>CALR3</i>	19p13.11	Calreticulina 3	Homeostasis del Calcio	-
<i>JPH2</i>	20q13.12	Juntophilina	Homeostasis del Calcio	-
<i>PLN</i>	6q22.1	Fosfolambano	Homeostasis del Calcio	-

Sin embargo, en aproximadamente el 30-60% de los casos no se hallarán variantes claramente relacionadas con la enfermedad en los genes ya caracterizados [2, 32]. Esto es más probable en los pacientes aislados, aparentemente esporádicos o sin varios familiares afectados. Muchos de estos pacientes quedarán en una especie de “limbo” genético, ya que o bien no hallaremos variantes candidatas en los genes conocidos, o hallaremos variantes que no vamos a poder clasificar como claramente patogénicas (variantes de significado incierto, VSI). Entre otras razones, porque si realmente lo fueran cabría esperar que todos los portadores de la familia estuviesen afectados. Es decir, habremos pasado de un escenario inicial dominado por variantes de penetrancia elevada claramente patogénicas y con una segregación familiar clara, a otro con variantes menos patogénicas o de penetrancia reducida, que no van a dar manifestaciones en muchos portadores. En estas VSI podemos incluso dudar de su relación con la MCH, una ambigüedad que puede condicionar el consejo genético si hemos asumido que son la causa de la enfermedad en el caso índice.

Incluso aunque secuenciamos todos los genes ya relacionados con la MCH, en muchos pacientes no hallaremos ninguna variante candidata. Esto sugiere que hay otros genes implicados en la MCH que aún no se han descubierto. Su identificación es compleja por varios motivos. En primer lugar, la mayoría de estos pacientes presentan poca agregación familiar sobre la que testar un ligamiento estadísticamente fiable a cualquier gen/variante candidata. Por otro lado, es probable que cualquier gen nuevo implique a muy pocos casos o familias, o las variantes sean incluso “mutaciones privadas” de una sola familia. Como corolario, podríamos decir que si hubiese algún gen nuevo de alta penetrancia claramente relacionado con la MCH, este ya habría sido descubierto a partir de alguna familia con varios afectados, de igual forma que fueron identificados los genes principales.

V. Secuenciación masiva o de nueva generación (NGS)

La secuenciación masiva (más conocida por su término inglés *Next Generation Sequencing*, NGS) ha revolucionado el estudio de la base genética de las enfermedades. Nos ha permitido analizar la secuencia de muchos genes en un paciente, de forma rápida, fiable y con un coste asumible [36-37]. La NGS presenta tres grandes avances respecto a la secuenciación tradicional o método de Sanger: 1) La creación de *librerías* de ADN no precisa clonación bacteriana; es decir, es un sistema libre de células. 2) La

realización de millones de reacciones de secuenciación en paralelo en una misma "carrera". 3) No es necesario llevar a cabo una electroforesis.

La primera plataforma de NGS fue comercializada en el año 2005 (secuenciador 454 de Roche) y podía secuenciar fragmentos de unas 100 bases para un total de aproximadamente 20 Mb de genoma [38]. Se basa en la "pirosecuenciación", en la que se detectan los pirofosfatos liberados al incorporarse a la hebra de ADN la base complementaria. Una característica de éste y los otros métodos de NGS es que, a diferencia del método de Sanger, la reacción de síntesis puede continuar en cada hebra al no emplear dideoxi-dNTPs. En 2007 se comercializa el modelo Illumina-Solexa, que emplea terminadores reversibles. Dicho secuenciador utilizaba una variación del método de terminadores irreversibles de Sanger, y una amplificación mediante "PCR en puente" (*bridge PCR*) de fragmentos menores de 50 bases. Una cámara láser detectaba la fluorescencia emitida por cada nucleótido, haciendo posible la lectura de hasta 30 Mb de genoma. La evolución de este equipo ha dado lugar a los modelos MiSeq y HiSeq, que lideran actualmente el mercado de secuenciación masiva.

En 2010 sale al mercado el Ion Torrent *Personal Genome Sequencer* (PGM), de Life Technologies (actualmente Thermo Fisher Scientific), que se diferenciaba de los demás por emplear chips semiconductores; es decir, sin necesidad de nucleótidos marcados con fluorescencia. Los chips semiconductores están compuestos de millones de celdillas o pocillos, en las que entrará un único fragmento del ADN que queremos secuenciar unido a una "bola", generado mediante PCR en emulsión. Debajo de cada celdilla hay un sensor que mide los cambios en el pH que se producen. Cuando la base correspondiente es incorporada en la síntesis de ADN se libera un protón, que es detectado (cambio de pH) por el sensor, y debido a que los dNTP pasan a través del chip de manera secuencial el equipo traduce la información de los cambios de pH en la secuencia de ADN correspondiente [39]. Una ventaja de este método es que su evolución depende fundamentalmente del desarrollo de los chips de secuenciación (**Figura 3**), hasta una capacidad para secuenciar genomas completos (modelo Ion Proton, S5, y S5 XL).



Figura 3: A la izquierda, el secuenciador Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), a la derecha, los chips semiconductores que emplea para la secuenciación.

Desde su aparición, cada plataforma ha ido mejorando considerablemente sus prestaciones para aumentar la longitud de cada fragmento secuenciado y la cantidad de lecturas obtenidas en cada "carrera". Con ello se ha conseguido reducir el tiempo y el coste necesarios para leer muchos genes en cada paciente (**Figura 4**).

La mayoría de los laboratorios que ofertan la NGS como método diagnóstico emplean paneles de genes candidatos. Es decir, un paciente con una enfermedad concreta es secuenciado en una sola "carrera" para todos los genes conocidos implicados en la enfermedad. En el caso de la MCH un panel básico incluiría los genes mejor caracterizados (unos 9), aunque cabría la posibilidad analizar varios centenares de genes relacionados con enfermedades cardiovasculares en cualquier paciente con una enfermedad de este tipo. Por ejemplo, estos paneles incluirían genes de la MCH, de la miocardiopatía dilatada (MCD), de las arritmias cardiacas, etc. Esta secuenciación masiva presenta ventajas evidentes, en lo referente a la cantidad de información obtenida en un solo experimento, pero ha introducido también márgenes de incertidumbre en lo referente a la naturaleza patogénica o benigna de la variación identificada en cada paciente, y su interpretación y utilidad en la práctica clínica. Dicha incertidumbre, y las dificultades de interpretación de los resultados obtenidos, serán mayores cuantos más genes analicemos, alcanzando su máxima expresión en el caso de la secuenciación del exoma. Este aspecto se trata de forma más detallada más adelante (apartado Consejo Genético en la MCH)

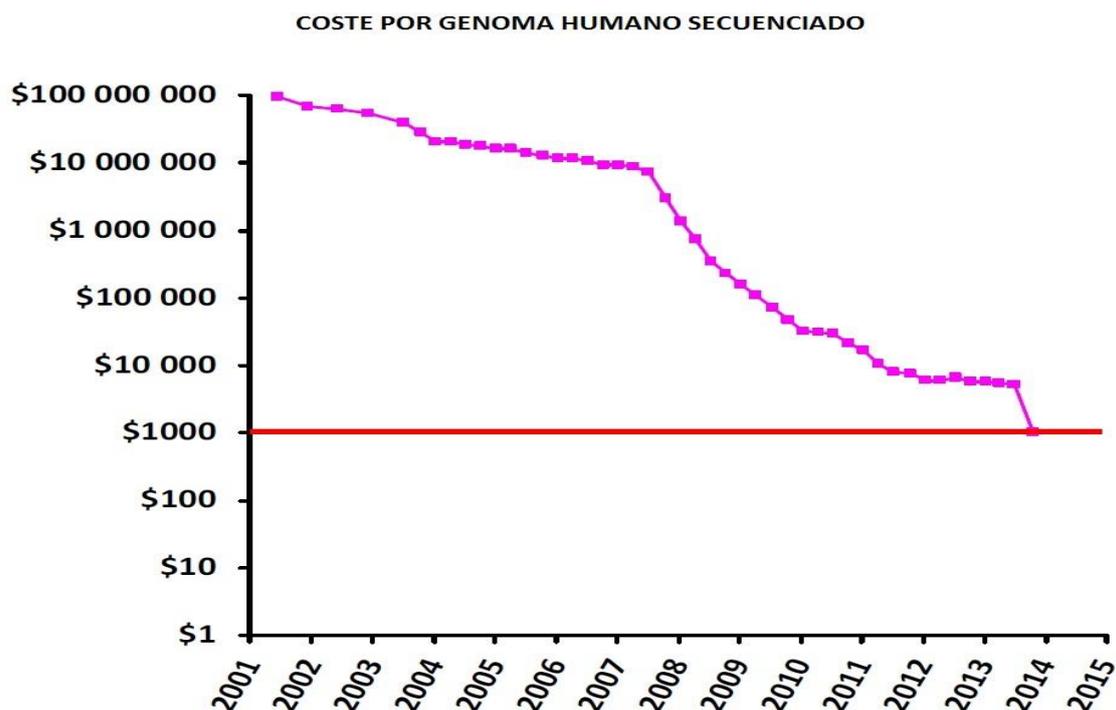


Figura 4: Coste por genoma humano secuenciado desde que vio la luz el primer borrador del genoma huma en 2001, hasta el año 2015. Figura adaptada de van Dijk y cols (2010).

VI. Secuenciación del exoma

La aplicación extrema de la NGS es la lectura del genoma completo de un individuo. Debido a que el 85% de las variaciones patológicas que se conocen están localizadas en las secuencias codificantes, la secuenciación del genoma completo puede resultar poco práctica a la hora de analizar la información obtenida, por lo que una aproximación de mayor utilidad reside en secuenciar los exones codificantes de todos los genes; es decir, el exoma (alrededor del 2-5% del genoma) [40-41]. Los fragmentos de ADN son secuenciados mediante NGS, y las secuencias se alinean informáticamente con los transcritos de referencia para los todos los genes; o con los de genes concretos si no se quiere analizar el exoma completo.

La secuenciación del exoma requiere el empleo de herramientas bioinformáticas potentes que filtren y depuren toda la información, para aumentar la confianza en que las variantes identificadas sean reales y tengan además un efecto posiblemente patogénico. Gracias a esta tecnología se han identificado muchos genes nuevos asociados a patologías diversas, existiendo un sesgo hacia las enfermedades con un patrón de herencia recesivo o *de novo*, debido a que es más fácil definir el carácter patogénico de las variantes/genes candidatos comparando entre las secuencias del

paciente y ambos progenitores [36, 40]. Tengamos en cuenta que para cualquier exoma secuenciado hallaremos muchas variantes candidatas, la mayoría irrelevantes para la enfermedad a estudio. Para una enfermedad dominante puede ser difícil concluir cuál de las variantes/genes candidatos es el realmente implicado, pero en una patología recesiva la necesidad de que un gen candidato deba tener una variante materna y otra paterna reducirá el número de variantes candidatas. Podemos adelantar aquí que, dada la naturaleza dominante de la MCH y la ausencia de grandes familias afectadas sin causa genética ya identificada, la secuenciación del exoma no ha resultado tan exitosa para identificar nuevos genes en esta enfermedad.

En el campo de las cardiopatías, la secuenciación del exoma ha descubierto genes como *BAG3* en la MCD [42] o *FHL1* en la propia MCH [43]. En el caso del gen *FHL1*, éste se había asociado previamente a miopatías. Se identificó como candidato en una familia (variante de cambio de pauta de lectura) con herencia ligada al sexo, al tratarse de un gen localizado en el cromosoma X. Sin embargo, los dos portadores varones de menor edad no presentaban signos de MCH. Otros estudios han demostrado la presencia de variantes posiblemente patogénicas en este gen asociadas a un fenotipo MCH puro, o mixto con miopatía, en unas pocas familias [44-46].

En todos estos estudios del exoma se partía de varios afectados en una familia en la que no se habían hallado mutaciones en los genes ya conocidos para la enfermedad. De toda la variación genética posiblemente patogénica, es condición *sine qua non* que la realmente relacionada con la enfermedad debe estar en todos los afectados de la familia. Y cuántos más afectados se secuencien, mayor será la fiabilidad del estudio. Para casos aislados puedes ser imposible obtener conclusiones definitivas, ya que será imposible discriminar entre todas las variantes “sospechosas”.

Las técnicas de NGS y de secuenciación del exoma se han aplicado no sólo a pacientes, sino también para definir la variación genómica en la población general. A través de un proyecto a escala internacional disponemos de la información de toda la variación en el exoma de miles de sujetos de diferentes poblaciones. Podemos acceder a esta información en las bases del *Exome Sequencing Project* (ESP; <http://evs.gs.washington.edu/EVS>) o en la del *Exome Aggregation Consortium* (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>), y ver si cualquier variante de un paciente ha sido también hallada en estos sujetos cuyo exoma se ha secuenciado. A pesar de la ventaja que supone disponer de esta enorme cantidad de información, la interpretación del carácter

patogénico de un cambio en un paciente puede ser complicado si la variante aparece en las bases del exoma con una frecuencia muy baja (en uno o unos pocos sujetos) [47-49]. Especialmente en los cambios de aminoácido (*missense*), el margen de incertidumbre es elevado si estamos ante un gen con mucha variación “rara” en la población general. Resulta llamativo que hayamos tenido que reevaluar la clasificación de muchas de las variantes consideradas mutaciones tras su aparición en las bases de exoma, que incluyen sujetos aparentemente sanos [47-49]. Es decir, la idea clásica de que cualquier variante candidata presente en un paciente y ausente en un grupo limitado de controles sanos (generalmente bastaban 500) era seguramente patogénica se ha visto desbordada al disponer de información miles de exomas. Con todo, el que una variante aparezca entre los exomas secuenciados no excluye necesariamente su patogenicidad, especialmente para cambios con penetrancia reducida para los que los portadores pueden permanecer asintomáticos en el momento de su inclusión como controles. Por ejemplo, en el gen *MYBPC3*, están descritos en la base del *Exome Sequencing Project* (ESP), 3 cambios de pauta de lectura, un codón de parada y 4 cambios de ajuste (*splicing*), todos reconocidos por su pérdida de función, y asociación a la MCH. Así mismo, hay descritas 57 variantes únicas en *MYH7* y 67 en *MYBPC3* (**Tabla 2**). Toda esta variación "rara" hallada a partir de la NGS a escala poblacional va a dificultar enormemente la interpretación de las variantes, incluyendo muchas de las identificadas en los genes “tradicionales”.

Tabla 2: Número de portadores de variantes nucleotídicas “raras” que darían lugar a cambios de aminoácido, presentes en sólo 1-4 exomas secuenciados en la base ESP (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

Portadores en la base ESP	MYH7	MYBPC3	MYH7 + MYBPC3
1	56	67	123
2	10	13	23
3	1	7	8
4	0	3	3
Total	71	119	190

VII. Consejo genético en la MCH

Históricamente, las variantes genéticas causales responsables del desarrollo de la MCH no han tenido relevancia en el manejo clínico del paciente de MCH. La mayoría, aunque estén relacionadas con el origen de la enfermedad, no aportaban información trascendental para el manejo clínico del paciente. En gran medida esto se debe a que para definir el carácter benigno vs maligno habría que analizar el comportamiento de cada variante de forma estadística, lo que exige un número mínimo de portadores. Dicha potencia estadística no se puede alcanzar para la inmensa mayoría de las variantes patogénicas relacionadas con la MCH, ya que son variantes poco prevalentes o incluso privadas. Sólo unas pocas mutaciones recurrentes, como la variante p.R92Q en el gen *TNNT2*, se han testado en muchos casos, y tienen un comportamiento lo suficientemente homogéneo como para poder ser empleadas como factor pronóstico de la enfermedad (**Figura 5**) [50].

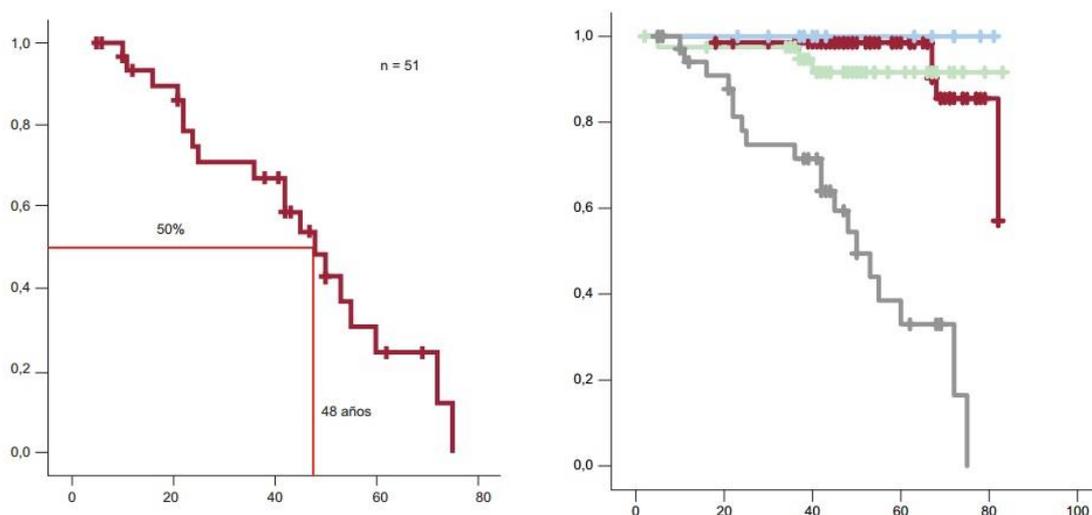


Figura 5: Curvas de Kaplan-Meier en las cuales se mide la supervivencia libre de muerte súbita. En el panel de la izquierda, el valor para la variante p.R92Q en el gen *TNNT2*. En el panel de la derecha, el valor para la variante p.R92Q (gris), comparado con pacientes sin mutación identificada (rojo), con mutación en alguno de los otros genes sarcoméricos (verde), o con otra mutación en *TNNT2* (azul). En el eje de las X se representa la edad en años. Figura adaptada de Ripoll-Vera y cols (2016).

Actualmente se considera un factor de mal pronóstico la presencia de más de una variante patogénica en alguno de los genes sarcoméricos [51-52]. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos no se recomienda utilizar la presencia de una variante candidata para definir el riesgo, y tomar decisiones del tipo de implantar un DAI [53-

54]. Para esta intervención se valoran fundamentalmente criterios clínicos del paciente y una historia familiar de eventos adversos.

Sin embargo, en las nuevas guías del manejo clínico de la MCH de la Sociedad Europea de Cardiología publicadas en 2014, el valor del cribado genético y los estudios familiares se ha incrementado respecto a la guía previa del año 2003[10]. El análisis de los genes relacionados con la MCH tiene en último término la finalidad de corroborar el diagnóstico clínico, y ofertar el estudio genético a los familiares del caso índice. Una variante causal puede testarse en otros afectos de la familia, definiendo a los que sean portadores y no. En estos últimos el riesgo de desarrollar la enfermedad sería el mismo que el de la población general sin historia previa de MCH, por lo que no precisarían seguimiento periódico, ahorrando costes al sistema sanitario. Especialmente relevante sería el caso de adultos jóvenes, ya que si se confirma que son portadores de una variante causal de la MCH podríamos recomendar evitar prácticas que pudieran incrementar el riesgo de acelerar las manifestaciones de la enfermedad. A este respecto, podemos indicar que algunos países prohíben competir de forma profesional (federada) a deportistas con MCH de causa genética demostrada.

Como señalamos anteriormente, el consejo genético en la MCH se ha visto afectado por los matices que ha introducido la NGS sobre el carácter patogénico o no de muchas variantes, incluidas algunas consideradas mutaciones. Muchas de ellas han pasado a ser clasificadas como VSI, en las que no podemos asegurar la patogenicidad y relación con la MCH [47]. Sin entrar en discusiones exhaustivas, hay aspectos que dificultan esta interpretación como los siguientes:

1. No todos los individuos que componen las cohortes de las bases de datos del exoma, tienen por qué ser realmente no portadores de mutaciones, aunque al ser incluidos estén aparentemente sanos. Algunos de los cambios hallados en éstos son variantes claramente patológicas, y la ausencia de síntomas en los portadores podría explicarse por la penetrancia reducida, y su relación con la edad del sujeto.
2. En el caso de la MCH, muchas de las variantes nuevas halladas en pacientes son privadas de éste y su familia, lo que dificulta también su interpretación al no disponer de una casuística amplia. En último término la patogenicidad de la variante hallada se ha de comprobar mediante segregación familiar, lo que no siempre es posible.

3. La edad es un parámetro fundamental para manifestar la MCH entre los portadores, por lo que muchos no van a manifestar síntomas si no han alcanzado el umbral característico de cada variante patogénica. La mayoría de las variantes claramente patogénicas suelen manifestarse con penetrancia elevada y a edad precoz, por lo que son fáciles de caracterizar.

Para evitar el sesgo definitivo de la patogenicidad de las variantes genéticas, el Colegio Americano de Genómica y Medicina Genética elaboró unas guías para la clasificación y su uso en la práctica clínica [55]. Estas se redactaron para los genes bien caracterizados de las diversas patologías, como *MYH7* o *MYBPC3* en la MCH, y establecen unos criterios muy restrictivos para la clasificación de una variante como realmente patogénica, lo que finaliza con muchos pacientes clasificados como portadores de VSI. Podemos ver esto como una dificultad natural a la hora de plantear la utilidad del estudio/consejo genético, pero está claramente dirigido a evitar clasificar erróneamente como portador de una variante patológica a alguien que realmente no lo es, especialmente si se trata de un familiar del caso índice asintomático (el manejo clínico del caso índice sería el mismo independientemente de si se le identifica la variante causal o no), ya que en dicho caso, conllevaría un impacto innecesario y evitable en la vida de la persona.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La Miocardiopatía Hipertrófica (MCH) es una enfermedad cardíaca con un patrón de herencia autosómico dominante. Hay varios genes bien caracterizados en los que se pueden hallar mutaciones en los pacientes/familias con MCH. Sin embargo, en un porcentaje elevado de los casos (30-60% según series publicadas) no se identificarían cambios en la secuencia de esos genes, que puedan ser relacionados con la enfermedad.

La hipótesis de trabajo es que debe haber genes aún no identificados en la MCH. Para descubrirlos, planteamos una investigación mediante técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NGS), partiendo de la caracterización del espectro mutacional de los principales genes sarcoméricos mediante NGS dirigida (paneles de genes característicos de la enfermedad) en una cohorte grande de pacientes, seguida secuenciación del exoma de casos/familias sin mutación identificada y secuenciación de los nuevos genes candidatos en toda la cohorte.

Los objetivos concretos son:

1. Desarrollar y validar un protocolo de NGS mediante chips semiconductores (tecnología Ion Torrent) para el análisis de los principales genes sarcoméricos ya relacionados con la MCH.
2. Definir el espectro mutacional (y en general el grado de variación nucleotídica) de estos genes en la cohorte de pacientes MCH reclutados a través de la Unidad de Referencia para Cardiopatías familiares del HUCA.
3. Secuenciar y analizar el exoma de varios pacientes/familias en los que no se halla identificado ninguna mutación en los genes sarcoméricos, para buscar nuevos genes candidatos.
4. Validar los mejores candidatos identificados mediante análisis del exoma con técnicas funcionales (expresión de las posibles mutaciones en modelos celulares) y clínicas (segregación de las variantes con la enfermedad en las familias).
5. Caracterizar el espectro de variación genética de los nuevos genes candidatos en el total de pacientes MCH y en un grupo de controles sanos, para definir a escala poblacional el porcentaje de casos que podrían ser explicados por variantes en estos genes.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

I. Pacientes y controles

Este trabajo se basó en 448 pacientes no emparentados (casos índice) diagnosticados de Miocardiopatía Hipertrófica durante los años 2001-2015, y reclutados a través de la Unidad de Referencia de Cardiopatías Familiares del Hospital Universitario Central de Asturias (CSUR, Ministerio de Sanidad y Consumo). El diagnóstico de MCH fue establecido por un cardiólogo a partir de los síntomas clínicos (disnea, dolor torácico, síncope, etc...), y la existencia de un septo del ventrículo izquierdo ≥ 15 mm; y siempre que la hipertrofia no fuese secundaria a otras causas.

La evaluación clínica de los pacientes incluía el historial médico, la exploración física, un electrocardiograma de 12 derivaciones, y un ecocardiograma Doppler. En algunos casos se realizaron resonancias magnéticas, electrocardiograma de monitorización Holter de 24 horas, y/o test de esfuerzo. El riesgo de muerte súbita cardiaca fue determinado mediante el calculador de riesgo de MSC establecido en las Guías de manejo clínico del paciente de MCH por la Sociedad Europea de Cardiología (<http://www.doc2do.com/hcm/webHCM.html>) [10]. Los pacientes que al ser incluidos en el estudio tenían al menos un familiar diagnosticado también de MCH fueron clasificados como casos familiares. Para dichos familiares, se consideró afectos a aquellos con un septo ≥ 13 mm, tal como establecen las guías del manejo clínico de la MCH de la Sociedad Europea de Cardiología de 2014 [10].

Como grupo control se emplearon 450 individuos sanos de la cohorte RENASTUR [56-57]. Se trata de sujetos sanos, sin antecedentes personales de enfermedad cardiaca, mayores de 55 años, y reclutados a través de varios centros de salud del área central de Asturias.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de Asturias, siendo las cohortes de pacientes y controles registradas como colecciones en el *Registro de Biobancos* del Instituto de Salud Carlos III. A todos los pacientes y controles se les extrajeron unos 5 mL de sangre en tubos con EDTA, y se procedió a obtener el ADN mediante un método de precipitación salina [58]. El ADN se resuspendió en agua y almacenó a -20°C en el Laboratorio de Genética Molecular del HUCA.

Todos los pacientes y controles fueron informados de los objetivos del estudio y firmaron un consentimiento para participar en el mismo.

II. Secuenciación masiva o de nueva generación

Para el estudio genético diseñamos y validamos un protocolo de secuenciación masiva (NGS), de los principales genes sarcoméricos asociados a la MCH (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, *TNNC1*) mediante tecnología Ion Torrent™, que emplea chips semiconductores y un equipo PGM (*Personal Genome Machine*, Thermo Fisher Scientific) [39].

Preparación de la muestra

Para la NGS mediante chips semiconductores cada muestra de ADN fue ajustada a una concentración final de 10 ng/μl mediante el kit de cuantificación RNase P Detection Reagents (Thermo Fisher Scientific), en un equipo Real Time 7500 (Thermo Fisher Scientific). Mediante este procedimiento también comprobamos que las muestras de ADN eran válidas para su amplificación genómica. Tras la cuantificación se crearon mezclas equimoleculares de ADN. Algunos de los ADNs de las mezclas pertenecían a sujetos previamente secuenciados mediante el método de Sanger para los principales genes asociados a la MCH, de tal manera que las variantes previamente identificadas actuarían para validar el método, ya que deberían ser identificadas en NGS ("variantes control"). Para decidir el número de muestras con las que se creó cada mezcla tuvimos en cuenta la capacidad de lectura nucleotídica del chip de secuenciación, la longitud de las secuencias objetivo, y el número de lecturas por base para una cobertura mínima de 50X.

Diseño del panel de amplificación (Ampliseq)

Se diseñó un procedimiento para amplificar en sólo dos tubos la secuencia codificante y al menos las 5 bases intrónicas flanqueantes de los genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, *TNNC1*. Para ello empleamos el software *Ion Ampliseq Designer* (www.ampliseq.com). Se compararon varios diseños y se escogió el que daba la máxima cobertura de la secuencia objetivo, basado en 176 parejas de cebadores para amplificar el 99% de la secuencia objetiva (Thermo Fisher Scientific) (**Tabla 3**).

Tabla 3: Cobertura del *Ampliseq* de los genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL2*, *MYL3*, *TPM1*, *ACTC1*, *TNNC1*.

Gen	Chr	Exones	Amplicones	Bases totales	Bases cubiertas	Bases perdidas	Cobertura total
<i>MYH7</i>	14	38	54	5808	5681	127	97,8%
<i>MYBPC3</i>	11	33	46	3826	3817	9	99,8%
<i>TNNT2</i>	1	17	17	1286	1286	0	100%
<i>TNNI3</i>	19	7	8	632	632	0	100%
<i>TPM1</i>	15	15	19	1429	1429	0	100%
<i>ACTC1</i>	15	6	10	1134	1134	0	100%
<i>MYL2</i>	12	7	7	501	501	0	100%
<i>MYL3</i>	3	6	8	588	517	71	87,9%
<i>TNNC1</i>	3	6	7	486	476	10	97,9%

Creación de las librerías

Cada mezcla de ADN fue amplificada mediante los reactivos Ion Ampliseq™ Library kit 2.0 siguiendo las instrucciones del proveedor (Thermo Scientific). En primer lugar se amplificaron las secuencias diana en dos tubos con las mezclas de cebadores del *Ampliseq*, seguido por digestión parcial de los adaptadores mediante el reactivo FuPa Reagent, ligación de los adaptadores con secuencia *código de barras*, purificación mediante el Agencourt® AMPure® XP Reagent, cuantificación de la muestra mediante el reactivo Ion Library Taqman Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) en un equipo Real Time 7500. Finalmente, las diferentes mezclas de ADN eran juntadas en un tubo, y diluidas hasta una concentración final de 8 pM (**Figura 6**).

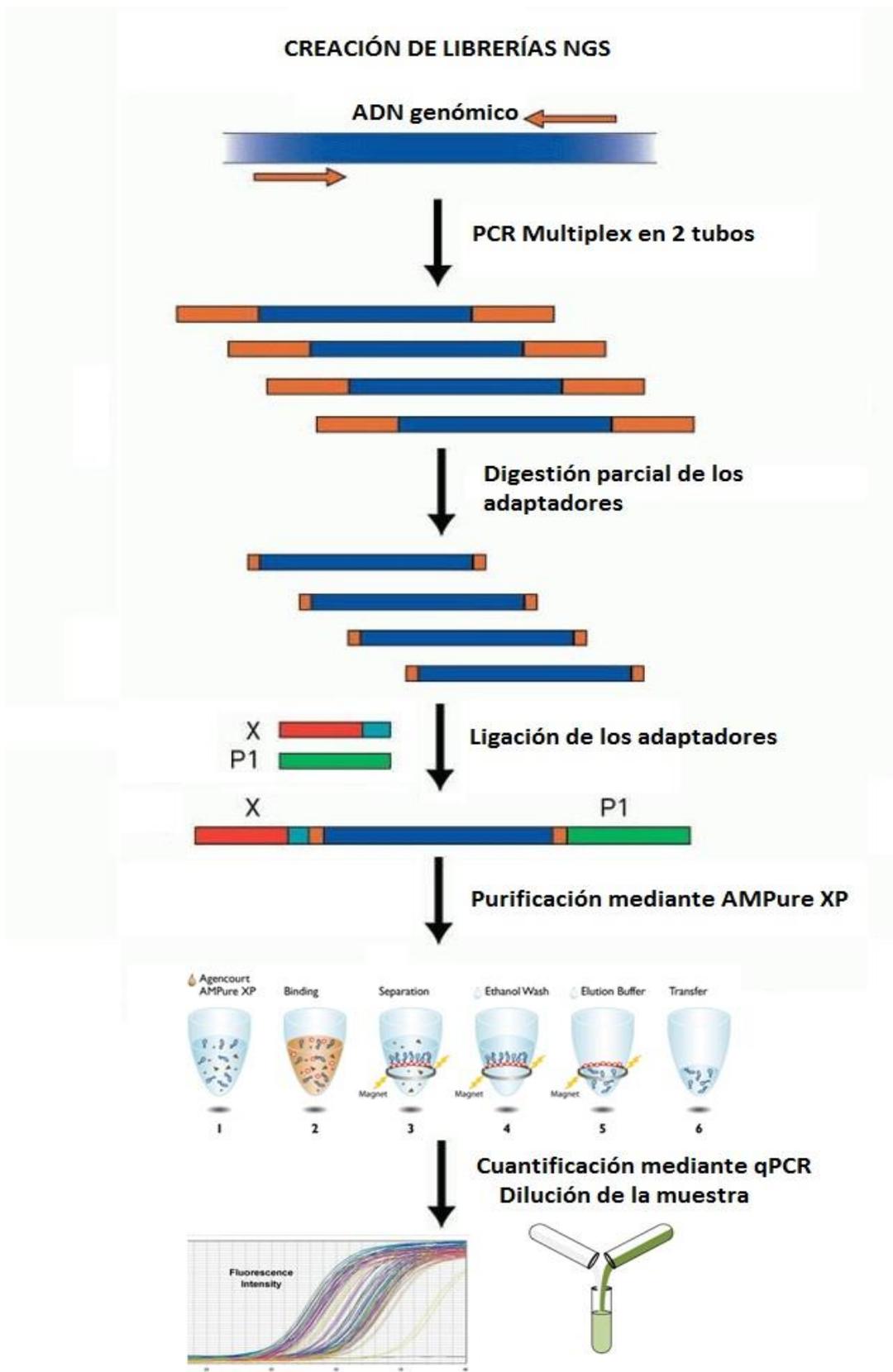


Figura 6. Esquema del procedimiento seguido para la creación de las librerías de ADN.

PCR en emulsión, enriquecimiento, y secuenciación

Tras la amplificación, se llevó a cabo una PCR en emulsión y el enriquecimiento de la muestra con los equipos Ion One Touch 2 y ES instrument respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor (Thermo Fisher Scientific). Para la PCR en emulsión empleamos el Ion PGM Hi-Q OT2 Kit. Las esferas de ADN resultantes fueron recuperadas mediante el reactivo Enrichment beads (Thermo Fisher Scientific).

La secuenciación de los fragmentos derivados de cada mezcla de ADN se realizó en un equipo *Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM), mediante el Ion PGM Hi-Q Sequencing kit, y chips semiconductores (Thermo Fisher Scientific). Empleamos un flujo de 500 carreras, el cuál soporta una longitud de amplificado de aproximadamente 200 pares de bases (**Figura 7**).

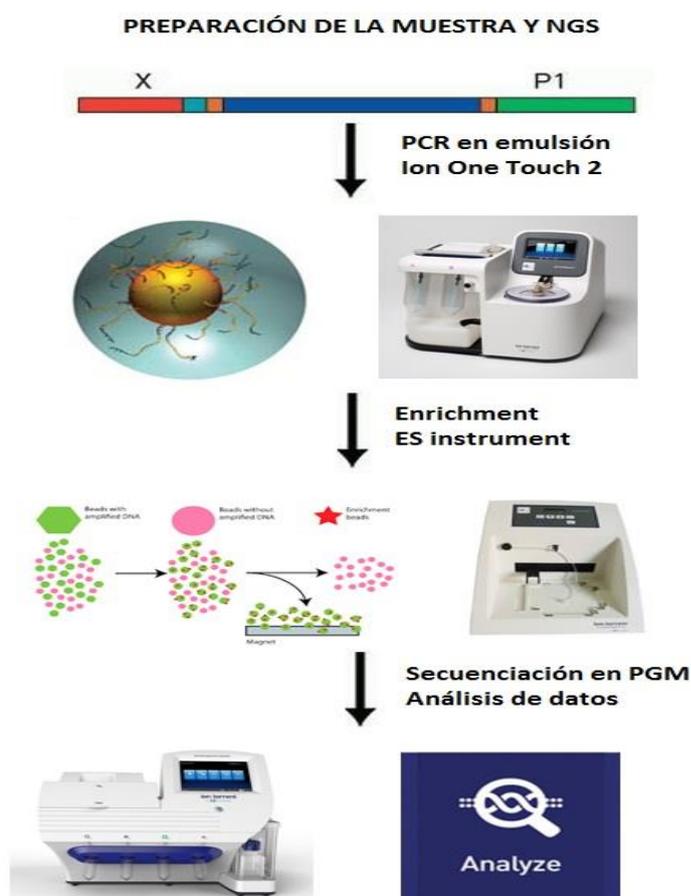


Figura 7. Esquema del procedimiento de preparación de la muestra, y su posterior secuenciación en un equipo *Ion Torrent PGM*.

Validación del protocolo de NGS

Los datos *crudos* resultantes de la secuenciación masiva fueron procesados con el Torrent Suite Software v5, para generar lecturas filtradas por los controles de calidad del software. La identificación de las variantes se realizó en paralelo con los softwares Variant Caller v5 (VC) e Ion Reporter software v5, usando los archivos FastQ generados que contenía las lecturas y el archivo BED proporcionado por el software *Ion Ampliseq Designer* para mapear los fragmentos de ADN secuenciados. Las variantes fueron identificadas mediante el algoritmo somático por defecto de dichos softwares. El programa Integrative Genome Viewer (IGV; Broad Institute) fue usado para el análisis de la cobertura, la calidad de las secuencias, y la visualización de las variantes.

Para identificar al portador de las variantes candidatas en cada mezcla, amplificamos mediante PCR convencional y secuenciamos mediante Sanger el fragmento correspondiente en los individuos usados para crear la mezcla.

Para validar que el método era útil para definir el espectro mutacional de los genes sarcoméricos, tomamos como referencia la capacidad para identificar las variantes control ya conocidas en los pacientes incluidos en las mezclas.

III. Flujo de trabajo para la identificación de nuevos genes en la MCH

Para la identificación nuevos genes candidatos en la MCH se planteó el esquema de trabajo descrito en la **figura 8**.

Partimos de una cohorte inicial de 300 pacientes con MCH en los que secuenciamos los 9 genes sarcoméricos mediante chips semiconductores. Aquellos sin mutación identificada servirían, en principio, para buscar nuevos genes candidatos, pero para incrementar la fiabilidad del estudio del exoma seleccionamos seis pacientes con otros familiares también afectados y de los que disponíamos de ADN. A estos 6 pacientes se les secuenció su exoma en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) de Barcelona. Brevemente, 3 µg de ADN se fragmentaron mediante un equipo de sonicación Covaris S2, y se creó una librería de extremos "*paired-end*" para su secuenciación en un equipo Illumina. El enriquecimiento de las muestras fue llevado a cabo mediante el método de captura exónica con el reactivo SureSelectXT Human All Exons 50 Mb kit (Agilent technologies), y secuenciado en un equipo HiSeq 2000 (Illumina). La información de dicha secuenciación fue analizada en la mediante el software de análisis SIDRÓN diseñado por investigadores de la Universidad de Oviedo

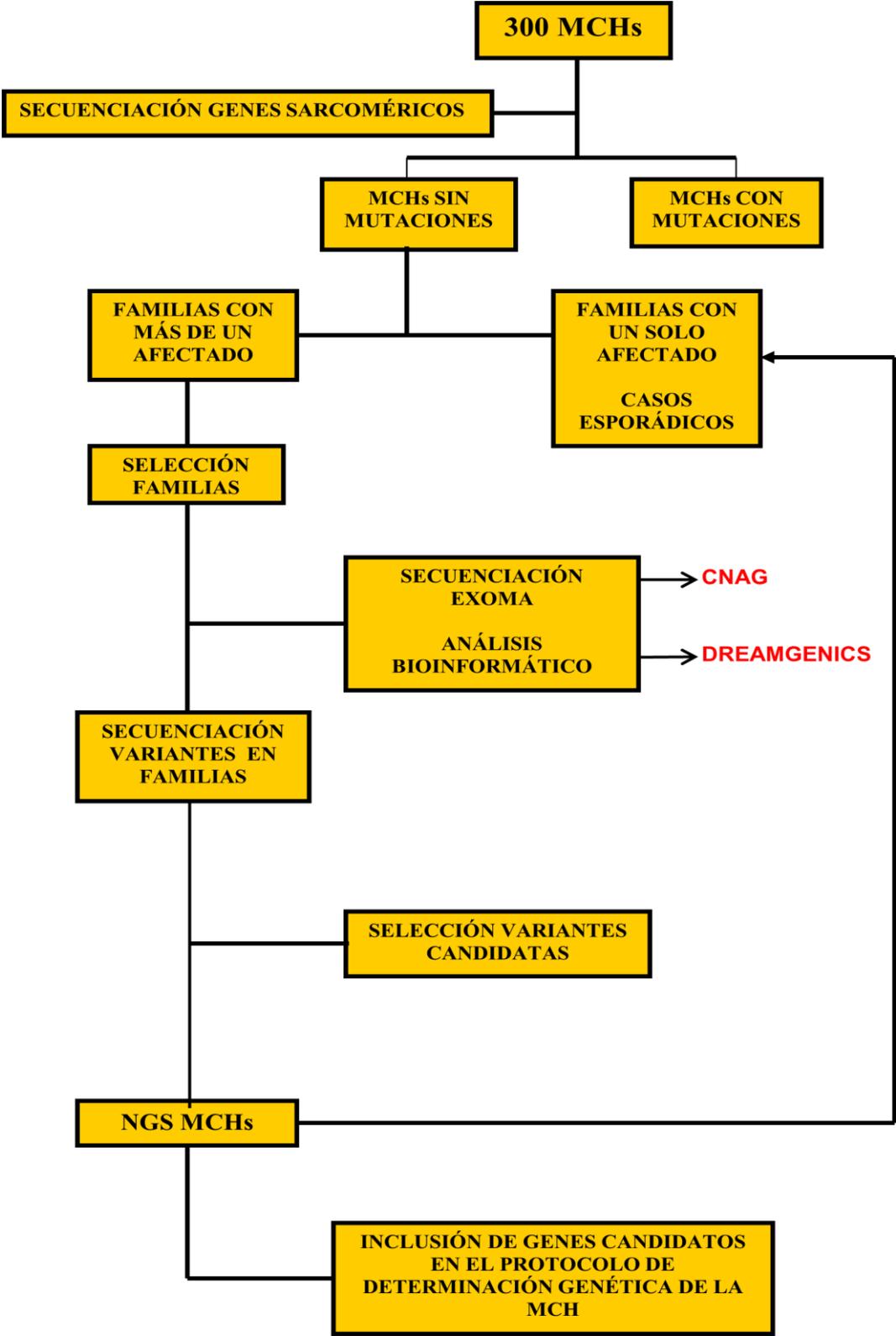


Figura 8: Flujo de trabajo para la identificación de nuevos genes mediante secuenciación del exoma.

y la empresa *spin-off* de la Universidad, Dreamgenics. Los genes candidatos se seleccionaron en base a la predicción de la patogenicidad de las variantes identificadas y del papel del gen en la fisiopatología cardíaca.

Las variantes candidatas se determinaron mediante secuenciación Sanger en los familiares de cada paciente, de forma que sólo consideramos válidas aquellas que mostraban una segregación total con la enfermedad. Es decir, sólo aquellas que estaban en todos los afectados de la familia correspondiente.

Los genes candidatos serían analizados mediante NGS en todos los pacientes con MCH negativos para mutaciones en los principales genes sarcoméricos. Finalmente, los genes que presentaran variantes patológicas candidatas en varios pacientes serían analizados en el total de la muestra de pacientes y controles para definir su espectro mutacional en nuestra población.

IV. Secuenciación masiva de genes candidatos

Tras aplicar el proceso de selección de nuevos genes candidatos resumido en el apartado anterior, sólo *FLNC* (filamina C) cumplió el requisito de presentar variantes posiblemente patogénicas en varios casos índice. Para su estudio por secuenciación masiva rediseñamos el panel de genes candidatos para un ampliseq que contenía los genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, *TNNC1* y *FLNC* (*Ion Ampliseq Designer*; www.ampliseq.com). El Ampliseq adquirido consistía en dos tubos con un total de 255 parejas de cebadores para la amplificación del 98,2% de la secuencia diana (Thermo Fisher Scientific) (**Tabla 4**). El protocolo de secuenciación mediante chips semiconductores fue el mismo descrito previamente.

Las variantes candidatas se asignaron a individuos concretos mediante amplificación convencional y secuenciación Sanger del correspondiente fragmento de ADN, en cada sujeto incluido en la mezcla de ADN.

Tabla 4: Cobertura del *Ampliseq* de los genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL2*, *MYL3*, *TPM1*, *ACTC1*, *TNNC1*, y *FLNC*.

Gen	Chr	Exones	Amplicones	Bases Totales	Bases cubiertas	Bases perdidas	Cobertura total
<i>MYH7</i>	chr14	38	52	6188	6116	72	98.8%
<i>MYBPC3</i>	chr11	33	46	4146	4081	65	98.4%
<i>TNNT2</i>	chr1	22	18	1081	1081	0	100%
<i>TNNI3</i>	chr19	7	9	702	702	0	100%
<i>MYL2</i>	chr12	7	7	571	571	0	100%
<i>MYL3</i>	chr3	6	8	648	648	0	100%
<i>TPM1</i>	chr15	16	19	1500	1490	10	99.3%
<i>ACTC1</i>	chr15	6	10	1194	1109	85	92.9%
<i>TNNC1</i>	chr3	6	8	546	546	0	100%
<i>FLNC</i>	chr7	48	78	8658	8427	231	97.3%

V. Clasificación de las variantes identificadas

Las variantes nucleotídicas identificadas que introducían codones de parada (*non-sense*), inserciones/deleciones de cambio de pauta de lectura (*frameshifting*), o estaban en nucleótidos que afectarían al procesamiento del ARN mensajero (cambios de ajuste o *splicing*), fueron clasificadas como probablemente patogénicas dado su efecto drástico sobre la proteína. En cuanto a las variantes que daban cambios de aminoácido (*missense*), consideramos candidatas para un posible papel en la MCH aquellas que no estuvieran descritas en las bases de datos del Exome Sequencing Project (ESP; <http://evs.gs.washington.edu>) y Exome Aggregation Consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>), o lo estuvieran a una frecuencia muy baja ($\leq 0,001$). También tuvimos en cuenta su presencia o no en nuestra cohorte de controles sanos, también secuenciados mediante NGS. Una vez pasado el filtro de la frecuencia poblacional, seguimos otros criterios como su segregación con la enfermedad en la familia correspondiente, estudios funcionales, o el efecto potencial medido con varios predictores bioinformáticos: SIFT ([59]; <http://sift.jcvi.org>), Polyphen-2 ([60]; <http://genetics.bwh.harvard.edu>), Condel ([61]; <http://bg.upf.edu/fannssdb/>), y CADD ([62]; <http://cadd.gs.washington.edu>).

VI. Estudios funcionales de la filamina C

Para la validación de algunas de las variantes candidatas identificadas en el gen *FLNC*, se llevaron a cabo una serie de estudios funcionales en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del HUCA, y el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo.

Biopsias musculares

Dado que el gen de la filamina C era conocido por su papel en la miopatía muscular, considerándose la cardíaca una afectación secundaria en algunos pacientes, era obligado descartar la alteración del músculo esquelético en nuestros pacientes con MCH. Para ello se realizaron biopsias musculares sobre muestras de unos 2 mm del cuádriceps derecho fijadas en glutaraldehído. Parte de la muestra se fijó en parafina. Se realizaron estudios de histoquímica para tricómico de Engel-Gomorri, succinato deshidrogenasa, NADH deshidrogenasa, citocromo C oxidasa, y adenosín trifosfato (ATPasa).

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó en cortes de parafina de 3 mm de grosor, previamente calentado a 60°C. A continuación, se aclararon y deshidrataron con xileno y alcoholes graduados. La recuperación del antígeno se llevó a cabo calentando en un tampón TrisEDTA borato (pH 8,4). La actividad peroxidasa endógena se inactivó mediante incubación en TBS-T, que contiene 3% de peróxido de hidrógeno. Para bloquear la unión no específica, los tejidos se incubaron durante 20 min en TBS-T con 10% de albúmina de suero bovino (BSA). Las muestras se incubaron con un anticuerpo policlonal primario de conejo contra filamina C (Novus Biologicals, Littleton, CO) a una dilución de 1:25, seguido de las incubaciones con un anticuerpo biotinilado secundario OMNImap durante 15 min, estreptavidina marcada con peroxidasa, y el sustrato de diaminobencidina. El control de la tinción inmunohistoquímica se realizó siguiendo el mismo procedimiento pero omitiendo el anticuerpo primario.

Microscopía electrónica

Las muestras de músculo se fijaron en glutaraldehído durante 3 h y fueron post-fijadas en tetróxido de osmio y embebido en resina Epon. Se realizaron cortes ultrafinos con un cuchillo de diamante y un ultramicrotomo (Ultracut Reigert-Jung), y fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se realizaron las observaciones ultraestructurales mediante un microscopio electrónico Jeol 1200 equipado con una cámara digital.

Estudios en tejido cardiaco

Se obtuvieron muestras de tejido cardiaco de dos pacientes trasplantados de corazón y portadores de variantes candidatas en *FLNC*. Como control se utilizó tejido cardiaco de un donante sano, y de tres pacientes con MCH, uno de ellos portador de la mutación p.R403Q en el gen *MYH7*.

Las muestras procedían de los ventrículos derecho e izquierdo, el área septal, y las coronarias. Se obtuvieron cortes de 3 mm para su tinción mediante hematoxilina-eosina. De estos corazones se obtuvieron también muestras para estudios de inmunohistoquímica y microscopía electrónica mediante el procedimiento anteriormente descrito.

Mutagénesis dirigida

Se adquirió un clon de ADNc para filamina C (OriGene), y a partir de este se crearon mediante mutagénesis dirigida (kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis, Stratagene), clones con las variantes p.A1539T, p.V123A, p.R2133H y p.A2430V. La secuencia de los clones creados fue validada mediante secuenciación Sanger.

Cultivos celulares e inmunofluorescencia

Se utilizaron tres tipos de células: mioblastos cardiacos de rata H9C2 (proporcionados por la Dra. María Mittelbrunn, del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre, y la Universidad Autónoma, Madrid), miocitos cardiacos neonatales de rata (Lonza), y mioblastos C2C12. Las células H9C2 fueron cultivadas en suero DMEM, suplementado con un 10% de suero de ternera fetal y L-glutamina. Las células se transfectaron con los clones de *FLNC* mediante un kit Amaxa SF cell line 4D-Nucleofector X siguiendo las instrucciones del fabricante (Lonza). La presencia de agregados fue medida por extracción con detergente secuencial de proteínas.

Los miocitos cardiacos neonatales de rata fueron cultivados en un medio rCMC, que contenía medio basal RCBM suplementado con suero de caballo, suero fetal bovino, gentamicina/anforericina-B, y Bromo-20-desoxiuridina (BrdU). Las células fueron transfectadas con un kit Amaxa rat Cardiomyocyte Neo Nucleofecto (Lonza), analizadas por inmunofluorescencia, y visualizadas en un microscopio confocal Leica SP2.

Los mioblastos C2C12 fueron cultivados en medio DMEN, suplementado con un 10% de suero de ternero de recién nacido, L-glutamina, y piruvato sódico. Las células fueron transfectadas mediante lipofectamina (Invitrogen), inducidas para la formación de miotubos en un medio con un 5% de suero de caballo, y analizados mediante inmunofluorescencia.

Extracción secuencial de proteínas y western blot

Para medir si las proteínas filamina C y actina se encontraban en la fracción soluble o insoluble, se procedió al lisado de las células de los cultivos celulares y su centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue conservado como fracción soluble. La fracción insoluble fue posteriormente solubilizada mediante medio TEN, que contiene 2% de SDS, y centrifugado a 16.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante resultante de esta segunda centrifugación fue conservado como fracción insoluble. Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en geles SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa, e incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-DDK (Cell Signaling) para la detección de filamina C, y anti-actina (Sigma) para la de actina. Las proteínas fueron finalmente visualizadas mediante un kit Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore), en un equipo LAS-300 FUJIFILM.

VII. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS, asignando un valor $<0,05$ como estadísticamente significativo. Los datos de las variables clínicas cuantitativas se expresaron en forma de media y desviación estándar. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la distribución normal de las mismas. Para comparaciones entre variables cuantitativas se utilizaron los test T de comparación de medias, y ANOVA de un factor. Los estadísticos Chi-cuadrado y F-Fisher se emplearon para comparar las frecuencias de las variables discretas entre grupos.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. Características de la cohorte de pacientes.

Las características generales de los pacientes (casos índices) se muestran en la **tabla 5**. Cabe destacar la mayoría de mujeres (55,4%), y el bajo % de casos con historia familiar de MCH, tan sólo el 31,5% del total. Para considerar como positiva la historia familiar de MSC, ésta debía haberse presentado en un familiar de primer grado y a una edad < 50 años, como marcan las guías de riesgo de MSC de 2014.

Tabla 5: Características generales de la cohorte de MCHs. OTSVI: Obstrucción al tracto de salida del ventrículo izquierdo. MSC: Muerte súbita cardiaca

	Género (%Hombres)	Edad de inclusión	Edad de inicio	OTSVI	Septum	Historia MCH	Historia MSC
MCHs (n=448)	44,60%	58,3 ± 16,3	48,7 ± 16,7	21,20%	20,1 ± 20,9	31,50%	8,90%

II. Validación del método de secuenciación masiva.

Los nueve genes sarcoméricos principales (por su asociación estrecha con la MCH) se analizaron en los 448 pacientes mediante secuenciación masiva con chips semiconductores. Como se indica en la metodología, partimos del diseño *on-line* con la herramienta *Ion Ampliseq Designer* (www.ampliseq.com) de una mezcla de cebadores (*AmpliseqTM*) para amplificar las regiones codificantes + al menos las 5 bases intrónicas flanqueantes de los genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, *TNNI1*. El proveedor (Thermo Fisher Scientific) suministró la mezcla de cebadores en sólo dos tubos. A nivel práctico, el panel de cebadores nos permitió leer el 99% de la secuencia diana en los 9 genes.

Para caracterizar la variación en los nueve genes en los pacientes seguimos una aproximación consistente en secuenciar mezclas de ADN de varios casos mediante chips semiconductores, en un equipo *Ion Torrent Personal Genome Machine* (Thermo Fisher Scientific). En todos los ensayos los “amplicones” correspondientes a los exones 12 de *MYBPC3*, 1 de *TPM1*, y 6 de *ACTC1* no dieron lecturas suficientes para dar por buena su secuenciación. Por ello, dichos exones se analizaron mediante secuenciación Sanger de los fragmentos de PCR de cada paciente. En cada mezcla de ADNs se

incluían algunos pacientes con mutación ya conocida, que nos permitieron validar el método de secuenciación masiva. Todos estos cambios fueron identificados (incluidos una deleción y una inserción), por lo que podemos concluir que nuestro protocolo resultaba eficaz para identificar la variación en los genes estudiados.

III. Variación en los principales genes sarcoméricos.

A efectos prácticos sólo nos referiremos a los cambios en la secuencia que fueron clasificados como variantes “candidatas” para el desarrollo de la enfermedad. Es decir, cambios que podrían afectar al procesamiento del ARN (mutaciones de ajuste o *splicing*), inserciones que darían lugar a cambios en la pauta de lectura (*frameshifting*), cambios que introducían un codón de parada (*non sense*), o cambios de aminoácido que por frecuencia poblacional, descripción en la literatura, o predicción mediante programas *in silico*, fuesen posiblemente patogénicas. Con estos criterios identificamos un total de 169 portadores (38%) de variantes “candidatas” en los principales genes sarcoméricos (**Tabla 6; tabla suplementaria 1**).

Tabla 6: Distribución de las variantes en los genes sarcoméricos halladas en el cribado mediante NGS de los genes *MYBPC3*, *MYH7*, *ACTC1*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNI3*, *TPM1*, *TNNT2*, *TNNC1*, y porcentajes en relación a la cohorte total de MCHs (n=448), y en relación a los portadores de variantes (n=169).

Gen	# portadores	% entre todos los MCH	% entre los portadores de variantes	No descritos en ESP-ExAC	% entre todos los MCH	% entre los portadores de variantes
<i>MYBPC3</i>	100	22,3%	55,9%	66	14,7%	36,9%
<i>MYH7</i>	48	10,7%	26,8%	28	6,3%	15,6%
<i>ACTC1</i>	3	0,7%	1,7%	1	0,2%	0,6%
<i>MYL2</i>	4	0,9%	2,2%	4	0,9%	2,2%
<i>MYL3</i>	1	0,2%	0,6%	1	0,2%	0,6%
<i>TNNI3</i>	8	1,8%	4,5%	4	0,9%	2,2%
<i>TPM1</i>	3	0,7%	1,7%	3	0,7%	1,7%
<i>TNNT2</i>	8	1,8%	4,5%	1	0,2%	0,6%
<i>TNNC1</i>	0	0,0%	0,0%	0	0,0%	0,0%

IV. Identificación de nuevos genes en la MCH mediante secuenciación del exoma

Tras el cribado de los principales genes sarcoméricos en los 448 pacientes, nos centramos en aquéllos casos en los que no se identificó ninguna variante candidata. El principal criterio para su inclusión en el estudio del exoma fue la existencia de otros familiares también afectados, eligiendo finalmente 6 pacientes.

Tras el análisis bioinformático seleccionamos 6 variantes en 4 genes como posibles candidatas para explicar la MCH en el paciente y sus familiares (**Tabla 7**).

Tabla 7: Genes candidatos tras el análisis de la secuenciación del exoma.

Gen	Proteína	Localización	Función	Cambio	Paciente
MYO3B	Miosina III tipo B	Cromosoma 2	Contracción del músculo cardiaco	p.H1058R	MCH 124
TTN	Titina	Cromosoma 2	Elasticidad muscular	p.R18824H	MCH 154
				p.G24787D	
FLNC	Filamina C	Cromosoma 7	Interacción con el citoesqueleto de actina	p.A1539T	MCH 2.1
				p.G2151S	MCH 242
AHNAK2	AHNAK nucleoproteína 2	Cromosoma 14	Regulación canal de Ca ²⁺ tipo L cardiaco	p.G2726S	MCH 2.1

A continuación, se determinaron estas variantes en todos los familiares disponibles de cada paciente, para comprobar si las variantes candidatas segregaban o no con la enfermedad (**Figura 9**).

Sólo las variantes p.A1539T en el gen *FLNC* y p.H1058R en el gen *MYO3B* superaron la prueba de segregación familiar para ser consideradas finalmente candidatas y proceder a su validación como genes relacionados con la MCH.

Tras secuenciar 93 pacientes sin mutación sarcomérica identificada, *MYO3B* fue descartado para su análisis posterior al no hallarse ningún otro paciente con variantes candidatas en este gen. Por el contrario, tras este cribado inicial, hallamos 8 variantes en *FLNC* en 9 familias, por lo que procedimos a su secuenciación en el total de nuestros pacientes.

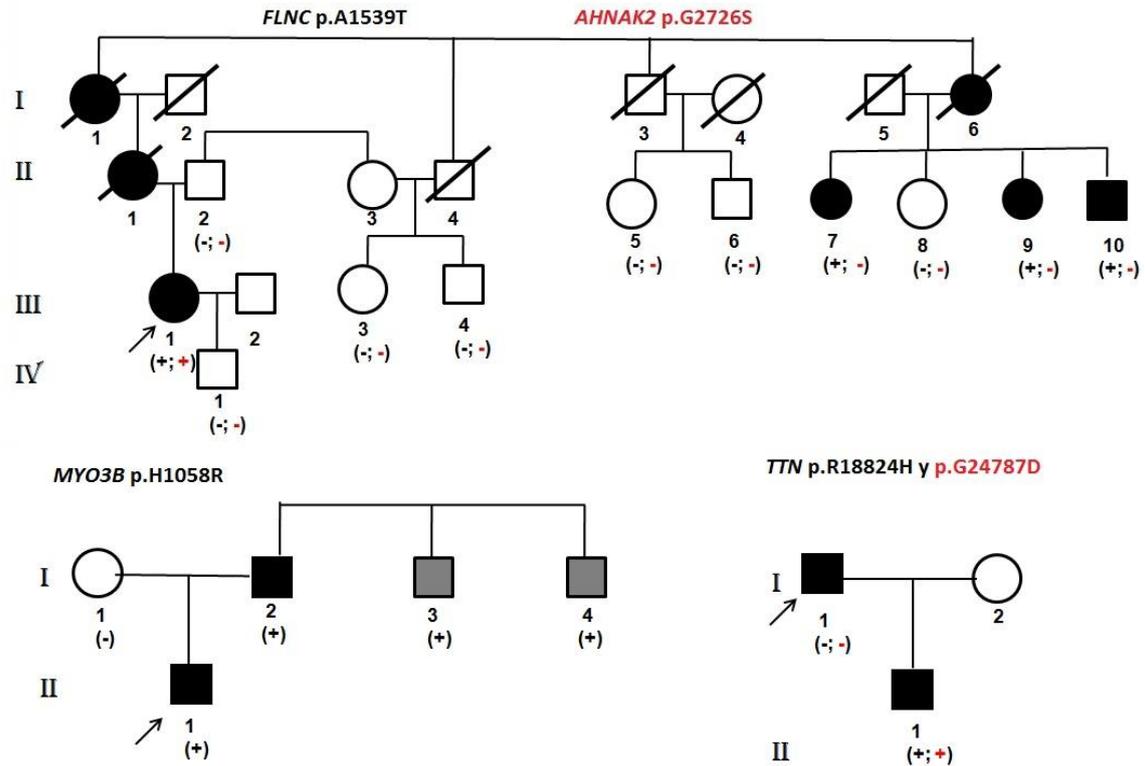


Figura 9: Segregación de las variantes candidatas identificadas mediante secuenciación del exoma. Los círculos representan mujeres, los cuadrados hombres. El sombreado negro indica MCH, el sombreado gris valores límite del tamaño del septo.

+: portador de la correspondiente variante. -: no portador.

V. Secuenciación masiva del gen *FLNC*

Tras la identificación del gen *FLNC* como candidato en la MCH procedimos a su análisis en el total de los pacientes. Para ello, rediseñamos el panel de cebadores incluyendo en el *Ampliseq* a *FLNC* además de los 9 genes sarcoméricos. Sobre las mezclas de ADN pudimos leer el 98,2% de la secuencia diana de los 10 genes. Respecto al gen *FLNC*, 46 de los 48 exones (96%) del gen dieron lecturas nucleotídicas óptimas, y sólo los amplicones correspondientes a los exones 3 y 11 tenían una cobertura inferior a 50X (**Figura 10**). Debido a que estos fallos se replicaron en todas las carreras y siendo la secuencia de los cebadores correcta, concluimos que dichos fragmentos tenían alguna característica que los hacía refractarios a la amplificación, como su alto contenido en secuencias GC. Por tanto, dichos exones se estudiaron mediante secuenciación Sanger.

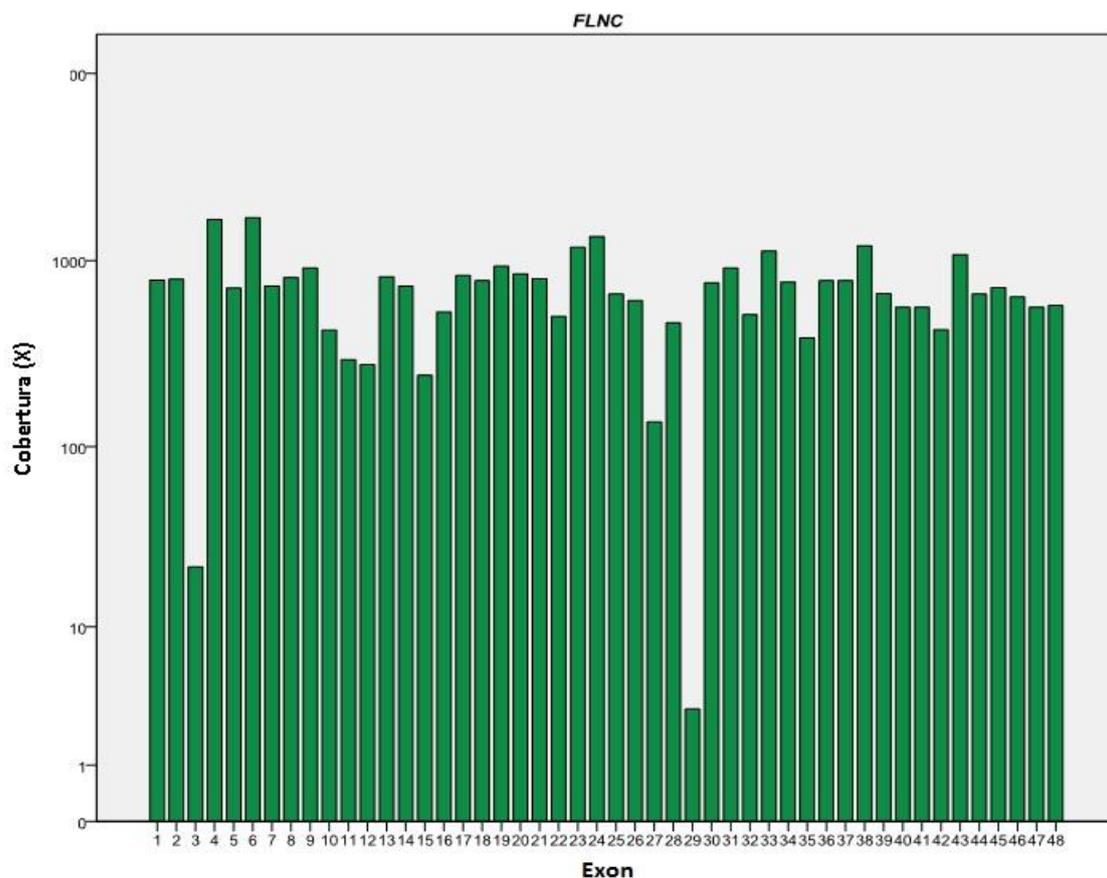


Figura 10: Media de las lecturas por nucleótido de los 48 exones del gen *FLNC*.

Dentro de cada mezcla incluimos al menos un caso con mutación ya conocida, que nos sirvieron como controles de validación de la técnica. Todas estas variantes control fueron identificadas en el análisis de los datos de la NGS, por lo que concluimos que nuestro procedimiento de secuenciación mediante chips semiconductores de mezclas de ADN era válido para el cribado del gen *FLNC*.

VI. Espectro de la variación en *FLNC*.

Además de los pacientes, secuenciamos un total de 450 sujetos sanos mayores de 55 años (cohorte RENASTUR), con el fin de determinar la variación en el gen *FLNC* en nuestra población y comparar las frecuencias con las de los pacientes.

En la cohorte de pacientes se identificaron un total de 37 variantes de cambio de aminoácido (*missense*), y una de codón de parada (*non-sense*) (**Tabla 8**). Sin embargo, en la cohorte de controles sanos tan sólo identificamos 22 variantes de cambio de aminoácido (**Tabla 9**).

Resultados

Tabla 8: Variantes identificadas mediante NGS en la cohorte de MCHs (n=448).

Efecto	SIFT	Polyphen-2	Condel	CADD	Frecuencia alélica ESP	Frecuencia alélica ExAC	En cohorte control	Clasificación final
p.E108X	-	-	-	38	No	No	No	Posiblemente patogénica
p.V123A	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	26.9	No	No	No	Probablemente patogénica
p.N290K	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	33	No	No	No	Significado incierto
p.K492E	Damaging	Benign	Deleterious	23	1/12376	29 / 120588	No	Polimorfismo
p.G507R	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	34	12/12532	108/121058	No	Polimorfismo
p.R526Q	Damaging	Benign	Neutral	16.1	18/12766	281/121172	Sí	Polimorfismo
p.D693A	Damaging	Possibly damaging	Deleterious	28.9	50/12480	447/120525	Sí	Polimorfismo
p.D710N	Damaging	Benign	Neutral	24.1	3/12642	32/116320	Sí	Polimorfismo
p.P836Q	Damaging	Probably damaging	Deleterious	25.4	24/12712	70/119636	Sí	Polimorfismo
p.T834M	Tolerated	Benign	Deleterious	23.5	15/12750	1081/121092	No	Polimorfismo
p.P1031L	Tolerated	Benign	Deleterious	19.8	No	8/120960	No	Probablemente benigna
p.P1102S	Damaging	Probably damaging	Deleterious	27.5	1/12632	11/120618	Sí	Polimorfismo
p.R1241C	Damaging	Benign	Deleterious	27	86/12852	756/121212	Sí	Polimorfismo
p.A1247V	Tolerated	Possibly damaging	Deleterious	23.8	No	7/119154	Sí	Polimorfismo
p.R1341Q	Tolerated	Benign	Deleterious	27.5	15/12692	113/121092	No	Polimorfismo
p.E1408D	Tolerated	Probably Damaging	Deleterious	23.2	No	No	No	Probablemente benigna
p.A1539T	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	32	No	No	No	Probablemente patogénica
p.R1567Q	Tolerated	Possibly damaging	Deleterious	25	818/12594	9212/121038	Sí	Polimorfismo
p.T1599A	Tolerated	Benign	Deleterious	8.5	No	1/121146	No	Significado incierto
p.T1681M	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	27.7	No	4/120642	No	Posiblemente patogénica
p.L1690F	Damaging	Possibly Damaging	Deleterious	27.5	No	No	No	Significado incierto
p.N1843S	Tolerated	Benign	Neutral	15.9	No	No	No	Probablemente benigna
p.R1860C	Damaging	Possibly damaging	Neutral	34	57/12410	646/120992	Sí	Polimorfismo
p.I1882V	Tolerated	Benign	Neutral	10.3	22/12806	116/121228	Sí	Polimorfismo
p.R2045Q	Damaging	Benign	Deleterious	26.1	No	6/12980	No	Probablemente benigna
p.V2059M	Tolerated	Benign	Neutral	23.9	9/12556	135/121022	Sí	Polimorfismo
p.R2133H	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	34	No	No	No	Probablemente patogénica
p.R2140Q	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	34	1/12726	2/121150	No	Probablemente patogénica

Resultados

p.G2151S	Damaging	Probably Damaging	Deleterios	33	No	No	No	Significado incierto
p.E2270K	Tolerated	Benign	Neutral	23.9	8/12864	79/83320	Sí	Polimorfismo
p.P2298S	Damaging	Probably Damaging	Neutral	28.3	No	No	No	Probablemente patogénica
p.P2301A	Damaging	Probably Damaging	Deleterios	26	No	No	No	Posiblemente patogénica
p.H2315N	Damaging	Benign	Neutral	23.6	No	No	No	Probablemente patogénica
p.R2318W	Damaging	Probably Damaging	Deleterious	30	No	3/121184	No	Significado incierto
p.G2330S	Tolerated	Probably Damaging	Deleterious	25.8	No	89 / 112846	No	Polimorfismo
p.R2364H	Tolerated	Benign	Neutral	25.7	25/12412	234/120948	Sí	Polimorfismo
p.V2375F	Damaging	Probably Damaging	Deleterios	29.2	No	No	No	Significado incierto
p.A2430V	Tolerated	Possibly Damaging	Deleterios	11.6	2/12626	11/121122	No	Significado incierto

Al comparar las variantes presentes sólo en los pacientes MCH (n=25) con las presentes sólo en los controles (n=9) observamos diferencias significativas (5.6% vs 2%; p=0,005). Además, tan sólo una de las variantes identificadas en los controles, no estaba descrita en ambas bases de datos poblaciones del *Exome Sequencing Project* (ESP) y el *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), mientras que en la cohorte de pacientes 13 variantes en 14 portadores no estaban en dichas bases. Por lo tanto, la frecuencia de cambios no descritos era de un 3.1% en los pacientes (14/448) frente al 0.2% en los controles (1/450) (p=0.007, test de probabilidad exacta de Fisher).

VII. Características de los controles con variantes candidatas.

Con el fin de determinar si las variantes candidatas halladas en los controles sanos estaban relacionadas con la presencia de hipertrofia del ventrículo izquierdo subclínica, se les realizó un estudio ecocardiográfico a los portadores de variantes únicas (n=9). Entre ellos, al portador del cambio p.P1938L, única variante no descrita en las bases ESP y ExAC. Todos tenían un septo dentro del rango normal, sin antecedentes personales o familiares de enfermedad cardiaca. Por tanto, clasificamos todas estas variantes como probablemente no patogénicas.

Tabla 9: Variantes identificadas en la cohorte control (RENASTUR; n=450).

Effect	Portadores	SIFT	Polyphen-2	CONDEL	CADD	ESP allele frequency	ExAC allele frequency	En cohorte MCH
p.M370V	1	Tolerated	Benign	Neutral	17	1/12706	7/120674	No
p.R421W	1	Damaging	Possibly damaging	Deleterious	33	No	3/117864	No
p.R461C	1	Damaging	Possibly damaging	Neutral	34	No	12/118654	No
p.V523A	1	Damaging	Possibly damaging	Deleterious	24	1/12766	23/121172	No
p.R526Q	4	Damaging	Benign	Neutral	16.1	18/12766	281/121172	Sí
p.A688T	2	Tolerated	Benign	Deleterious	21.2	No	5/120774	No
p.D693A	5	Damaging	Possibly damaging	Deleterious	28.9	50/12480	447/120525	Sí
p.D710N	8	Damaging	Benign	Neutral	24.1	3/12642	32/116320	Sí
p.P836Q	2	Damaging	Probably damaging	Deleterious	25.4	24/12712	70/119636	Sí
p.P1102S	2	Damaging	Probably damaging	Deleterious	27.5	1/12632	11/120618	Sí
p.R1241C	4	Damaging	Benign	Deleterious	27	86/12852	756/121212	Sí
p.A1247V	1	Tolerated	Possibly damaging	Deleterious	23.8	No	7/119154	Sí
p.R1267W	1	Damaging	Probably damaging	Deleterious	35	1/12618	3/118732	No
p.R1291H	1	Tolerated	Benign	Deleterious	23.1	2/12444	11/118840	No
p.R1567Q	38	Tolerated	Possibly damaging	Deleterious	25	818/12594	9212/121038	Sí
p.T1681R	1	Damaging	Possibly damaging	Deleterious	20.1	19/12924	69/120642	No
p.R1860C	12	Damaging	Possibly damaging	Neutral	34	57/12410	646/120992	Sí
p.I1882V	3	Tolerated	Benign	Neutral	10.3	22/12806	116/121228	Sí
p.P1938L	1	Damaging	Probably damaging	Deleterious	25.8	No	No	No
p.V2059M	6	Tolerated	Benign	Neutral	23.9	9/12556	135/121022	Sí
p.E2270K	2	Tolerated	Benign	Neutral	23.9	8/12864	79/83320	Sí
p.R2364H	3	Tolerated	Benign	Neutral	25.7	25/12412	234/120948	Sí

VIII. Variantes candidatas para estudios familiares en pacientes MCH

De las 38 variantes identificadas en la cohorte de pacientes seleccionamos 20 (en 22 portadores) como candidatas para la realización de estudios de segregación familiar (**Figura 11**). La selección de las variantes se realizó en base a su probable patogenicidad, con los siguientes criterios: codones de parada (*non-sense*); cambios de aminoácido no descritos, o con una frecuencia alélica $\leq 0,0001$ en las dos bases de datos (ESP y ExAC); no identificadas en la cohorte control. Ninguna de las variantes candidatas habían sido previamente descritas en pacientes con miopatía.

De las 20 variantes que cumplían los criterios, 13 eran nuevas (no descritas en ESP ni ExAC), 5 estaban sólo en ExAC, y 2 estaban en ESP y ExAC. Las variantes p.A1539T y p.A2430V fueron identificadas en dos pacientes. Además, 4 se identificaron en pacientes portadores de otra variante en los genes *MYH7* ó *MYBPC3*. Por lo tanto, el

porcentaje de variantes candidatas en *FLNC* era significativamente menor en los pacientes con alguna variante candidata en los 9 genes sarcoméricos básicos que en los que no tenían ninguna: $18/279 = 6.4\%$ vs $4/169 = 2.3\%$ ($p=0.03$; test de probabilidad exacta de Fisher).

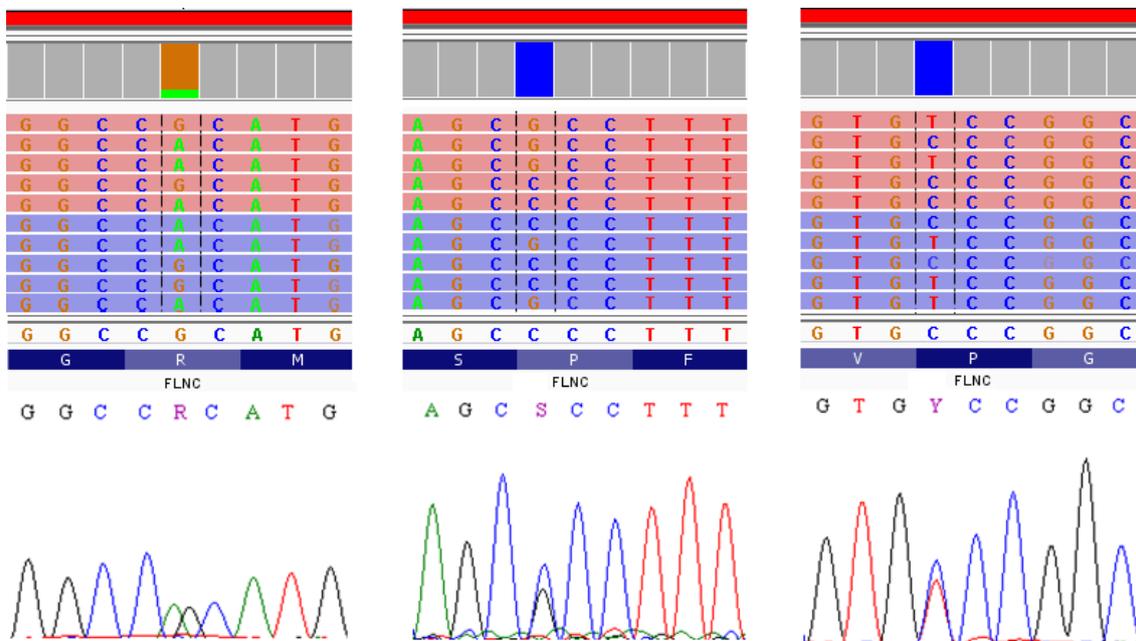


Figura 11: Visualización a través del software IGV (*Integrative Genome Viewer*), y electroferograma de Sanger, de algunas de las variantes en *FLNC* identificadas mediante NGS (p.R2133H, p.P2301A, p.P2298S).

IX. Estudios funcionales

Una vez seleccionadas las variantes candidatas en los pacientes con MCH, nos planteamos realizar estudios funcionales para definir con más precisión su posible carácter patogénico. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica del HUCA, y el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo.

Las biopsias del músculo esquelético realizadas a dos portadores de las variantes p.A1539T y p.H2315N no mostraban ninguna de las características asociadas a las variantes de *FLNC* que causan miopatía miofibrilar, como un sarcómero desorganizado, la presencia de agregados de filamina C, desmina, o de cuerpos esferoides, por lo que se descartó que dichas variantes estuvieran relacionadas con miopatía miofibrilar.

Los estudios de Inmunohistoquímica se realizaron sobre tejido cardiaco de dos trasplantados de corazón y portadores de las variantes *FLNC* p.A1539T y p.G2151S, y

de donantes sanos, un paciente de MCH sin mutación identificada, y un paciente con la mutación *MYH7* p.R403Q. Comprobamos que la proteína filamina C formaba agregados en el tejido cardiaco de los dos casos con las variantes candidatas, en contraste con la ausencia de agregados en el tejido cardiaco control (**Figura 12**).

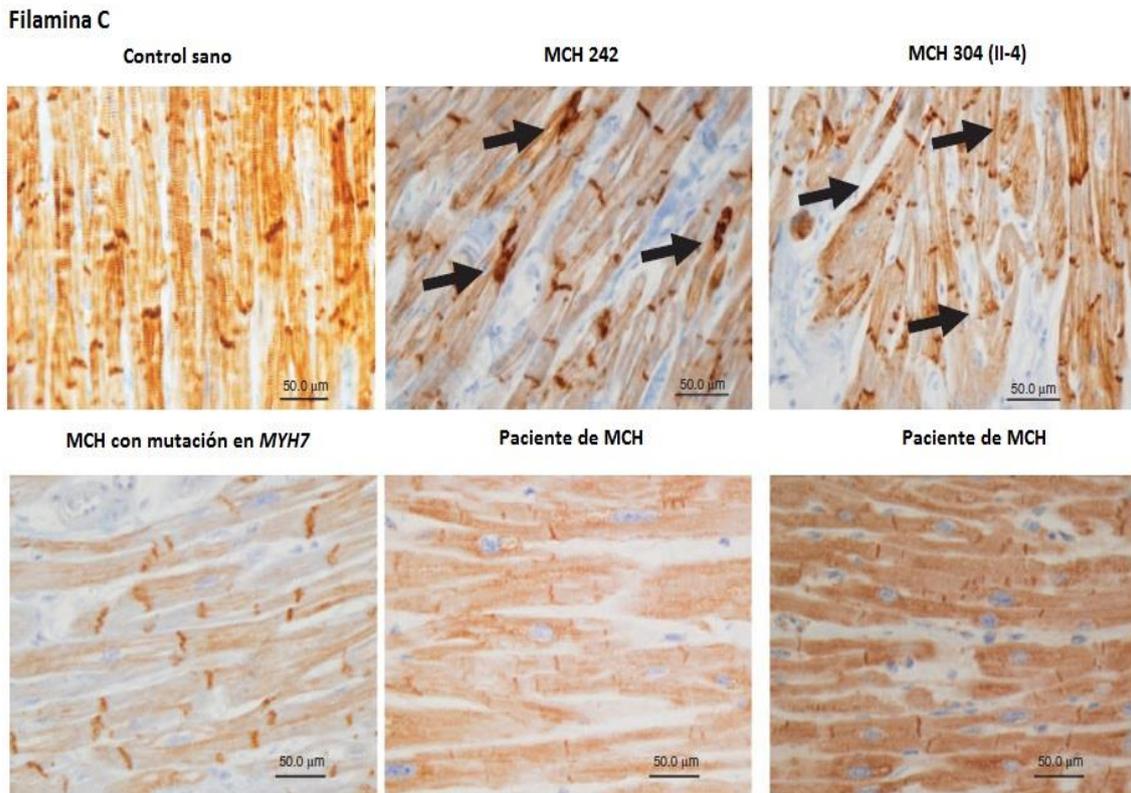


Figura 12: Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-flnc. Arriba se observa tejido cardiaco de un control sano, y de dos trasplantados (MCH 242 y MCH 304_II4) con variante candidata en *FLNC*, donde se pueden apreciar los depósitos de la proteína filamina C (flechas). Abajo, tejido cardiaco de pacientes MCH con la mutación enp.R403Q en *MYH7* y sin variantes en los genes asociados a la MCH, en los cuáles no se observan dichos agregados.

A continuación, se realizaron análisis *in vitro* de las formas normales y mutantes de *FLNC*. Para ello se crearon clones de ADNc con la secuencia de *FLNC* conteniendo las variantes p.A123V, p.A1539T, p.R2133H, y p.A2430V, y se transfectaron en células mioblásticas cardíacas de rata. Mediante *Western blot* comprobamos cómo las variantes p.A123V, p.R2133H y p.A2430V se encontraban en la fracción insoluble, lo que indicaría la formación de agregados de filamina C, mientras que la proteína normal se hallaba únicamente en la fracción soluble. Además, las variantes p.A1539T y p.R2133H formarían agregados con la proteína actina.

También estudiamos la formación de agregados de filamina C en células cardíacas de rata neonatal mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal (**Figura 13**).

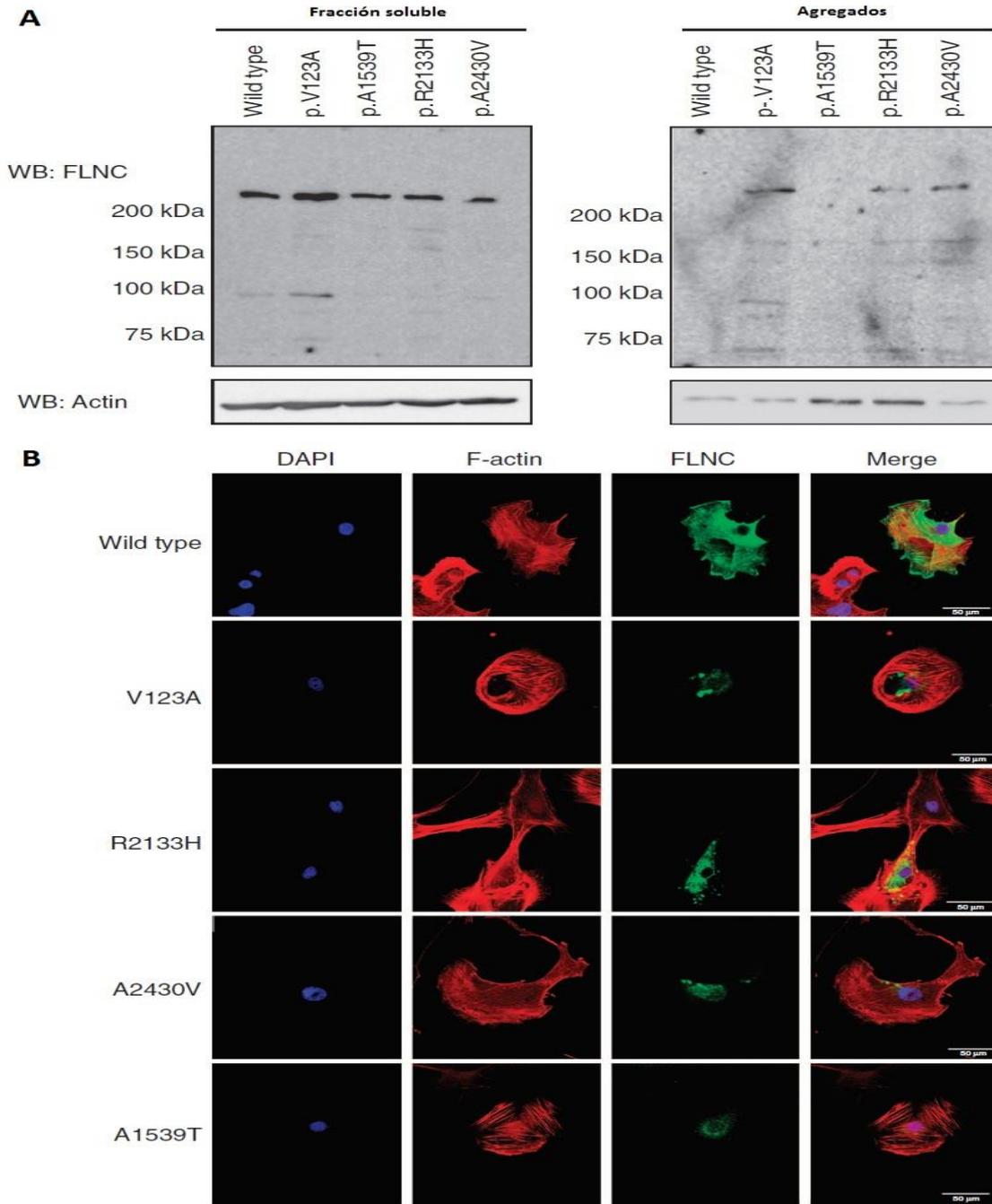


Figura 13: **A.** Estudios de *Western blot* en mioblastos cardiacos de rata, en los que se observan las fracciones soluble e insoluble de las células transfectadas con las variantes p.V123A, p.A1539T, p.R2133H, p.A2430V y con la proteína normal. Las variantes p.V123A, p.R2133H, p.A2430V forman agregados en la fracción insoluble, y las variantes p.A1539T, p.R2133H forman agregados con la proteína actina. **B.** Estudios de microscopía confocal en células cardiacas de rata neonatal transfectadas con las mismas variantes. El núcleo de las células está teñido con DAPI (en azul), y se observa la distribución de la actina (en rojo) y la filamina C (en verde). Se observan agregados en las células transfectadas con las variantes p.V123A, p.R2133H, p.A2430V.

Mientras la proteína normal tenía una distribución citoplasmática y asociada a las fibras de actina, las células transfectadas con los mutantes de filaminaC mostraban agregados proteicos, confirmando así lo que habíamos observado mediante en los tejidos de los pacientes (**Figura 12**). En conjunto, los resultados de nuestros estudios funcionales sugieren una alteración funcional de las isoformas de filamina C con las variantes candidatas estudiadas, lo que apoya el papel de este gen y sus variantes candidatas en la MCH.

X. Estudios familiares y clasificación final de las variantes

Pudimos realizamos estudios familiares en 15 de las 20 variantes candidatas, en las que los portadores tenían al menos un familiar disponible para el estudio genético. Entre estos había 3 casos con variantes en alguno de los genes sarcoméricos y 13 familias con variante candidata sólo en *FLNC*. Entre estos últimos, en 11 había al menos un segundo afectado con MCH.

De las 20 variantes candidatas identificadas en *FLNC*, 6 fueron finalmente clasificadas como probablemente patogénicas, 3 como posiblemente patogénicas, 7 como de significado incierto, y 4 como probablemente benignas.

Variantes probablemente patogénicas

FLNC p.A1539T

La variante p.A1539T había sido hallada mediante secuenciación del exoma en un caso índice con antecedentes familiares de MCH y de MSC: su madre había muerto mientras trabajaba, a la edad de 34 años. Tras identificar la variante, los análisis genéticos realizados en 10 familiares revelaron que 3 de ellos eran portadores, y todos fueron diagnosticados con MCH. Ninguno de los 7 familiares no portadores presentaba signos de MCH. Tres antepasados ya fallecidos padecían la enfermedad, y fueron considerados portadores obligados (**Figura 14**).

La misma variante fue hallada en otro caso índice en el cribado de *FLNC*. Pudimos realizar análisis genéticos en 7 familiares, 5 de los cuales eran portadores. Uno de los portadores desarrolló una miocardiopatía no compactada, mientras otros dos presentaban signos de MCH familiar. Un varón de 51 años portador presentaba un septo no patogénico de 11 mm, y una niña de 15 años tenía un septo normal (**Figura 14**). Por tanto, la variante p.A1539T fue considerada como probablemente patológica.

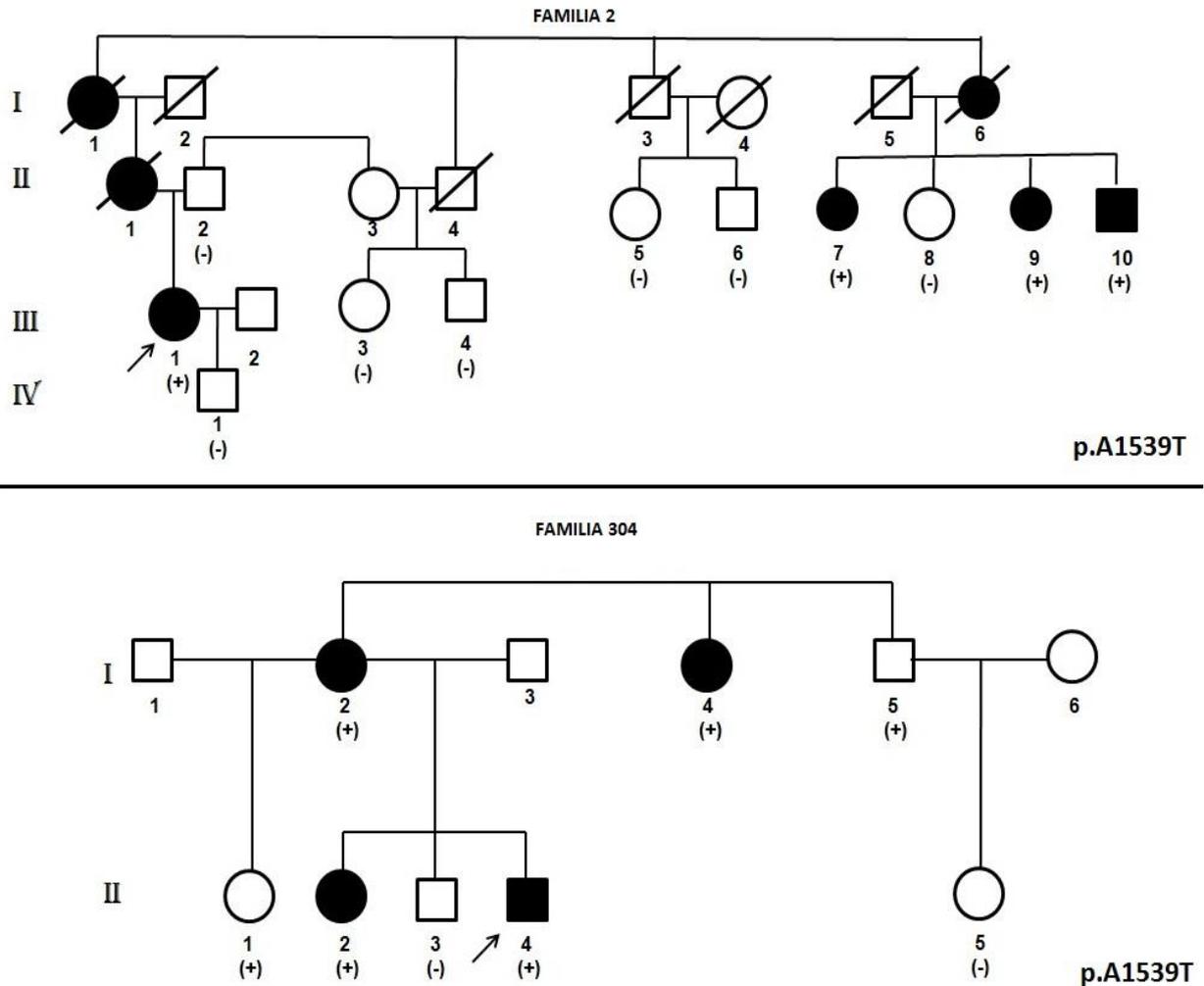


Figura 14: Árbol de las familias 2 y 304, portadoras de la variante p.A1539T. Los círculos representan a las mujeres, los cuadrados a los hombres. Las barras cruzadas significan que ha fallecido. En sombreado negro los afectados de MCH. La flecha indica el caso índice. Marcados con (+) los portadores de la variante, y con (-) los no portadores.

***FLNC* p.R2133H**

La variante p.R2133H fue identificada mediante NGS en una paciente diagnosticada a partir de un síncope durante el embarazo, con antecedentes familiares de MCH (padre fallecido), pero no de MSC. Se estudiaron 4 familiares, siendo únicamente portador una hermana también afectada. El padre sería portador obligado y había sido diagnosticado de MCH (**Figura 15**). En base a los datos familiares y a los estudios funcionales en los que observamos la formación de agregados proteicos de filamina C, esta variante fue clasificada como probablemente patogénica.

FLNCp.H2315N

El caso índice portador de la variante p.H2315N tenía antecedentes familiares, con un hermano también diagnosticado de MCH. Se comprobó la segregación en 3 familiares disponibles, siendo todos ellos portadores. Además del hermano afectado, una hermana presentaba un septo límite y un electrocardiograma con un patrón patológico claro de crecimiento con sobrecarga del ventrículo izquierdo. Un hijo del caso índice, de 32 años, no presentaba signos de MCH (**Figura 15**). Esta variante fue clasificada como probablemente patogénica, aunque de penetrancia reducida.

FLNCp.R2140Q

La variante p.R2140Q se encontró en un caso índice sin antecedentes de MCH ni de MSC, diagnosticado a raíz de un síncope. Tras estudiar a 5 familiares hallamos la variante en su padre, sintomático (hipertrofia cardiaca y síncope), y en un hermano asintomático. Una hermana de 50 años presentaba un septo normal (**Figura 15**). La variante fue clasificada como probablemente patogénica.

FLNCp.P2298S

El portador de la variante p.P2298S no tenía antecedentes familiares de MCH ni de MSC. Pudimos analizar a tres familiares, de los que dos eran portadores y tenían septos hipertróficos (**Figura 15**). Esta variante fue clasificada como probablemente patogénica.

FLNCp.V123A

La variante p.V123A fue hallada en un paciente con disnea de esfuerzo (I/IV) y dolor torácico. Se realizó estudio genético a dos hijos varones, siendo ambos portadores. Una vez realizadas las pruebas clínicas, uno de ellos fue diagnosticado de MCH. El otro hijo presentaba un ecocardiograma normal a la edad de 31 años (**Figura 15**). Los estudios funcionales realizados en la variante p.V123A revelaron la formación de agregados proteicos, siendo éstos los de mayor magnitud de todas las variantes analizadas. La variante fue clasificada como probablemente patogénica.

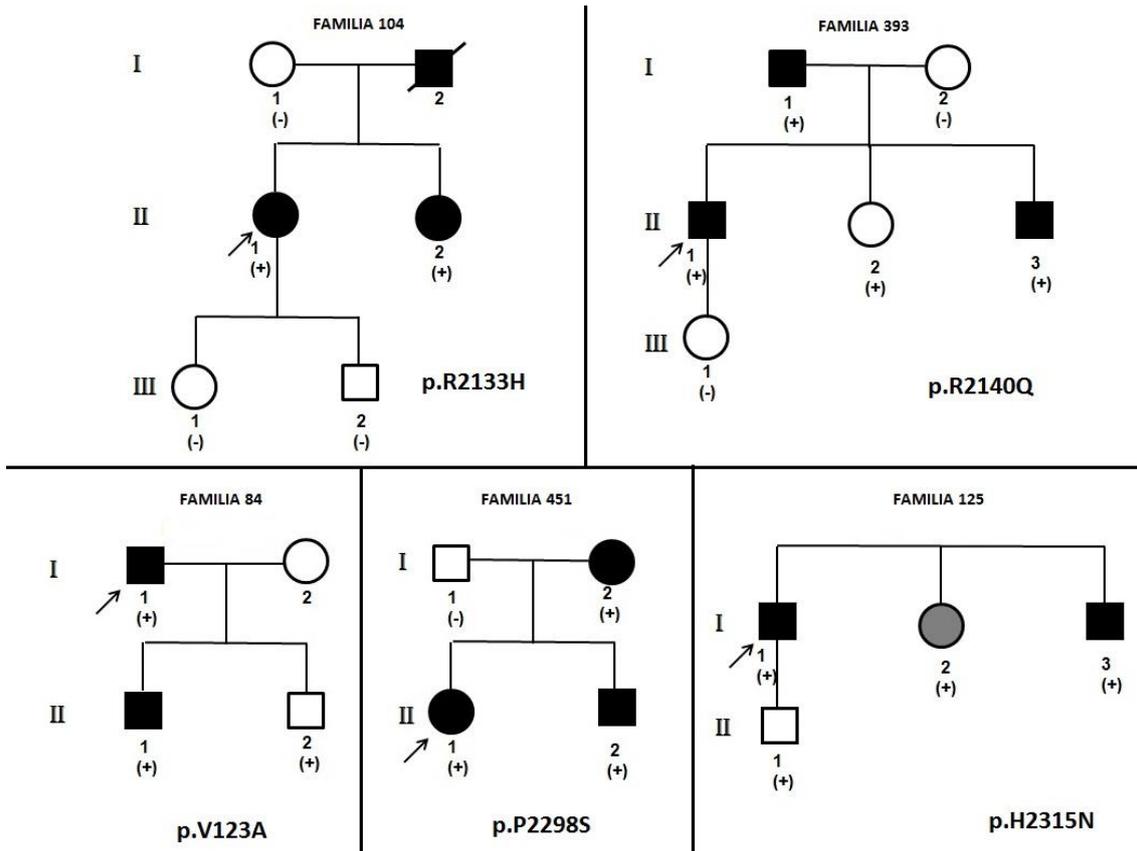


Figura 15: Árboles familiares de las variantes p.V123A, p.R2133H, p.R2140Q, p.P2298S, y p.H2315N, clasificadas como probablemente patológicas. En sombreado gris aquellos con valores de *septum* limítrofes.

Variantes posiblemente patogénicas

FLNC p.E108X

Esta fue la única variante candidata que introduce un codón de parada prematuro, no descrito en las bases ESP y ExAC, por lo que su carácter posiblemente patogénico se podría asumir sin datos adicionales sobre la segregación familiar. El paciente era un varón de 30 años diagnosticado a los 21, sin antecedentes familiares conocidos; aunque una tía-abuela había fallecido súbitamente a la edad de 25 años. Asintomático desde el punto de vista clínico, no presentaba dilatación de las cavidades cardiacas, ni disfunción en la fracción de eyección. Tras realizar el estudio genético a tres familiares identificamos dos portadores, ambos asintomáticos: una hermana de 33 años y con un septo normal y el padre, con un septo en el límite de normalidad (**Figura 16**).

***FLNC* p.T1681M**

El portador de la variante p.T1681M era un varón de 37 años, sin historia familiar de MCH ni de MSC, que fue diagnosticado tras sufrir un síncope. Tras analizar a los 4 familiares disponibles, tan sólo su madre era portadora de la variante y tenía hipertrofia aunque permanecía asintomática (**Figura 16**). Pese a que la variante segregaba con la enfermedad, debido a lo limitado del estudio familiar (sólo un portador además del caso índice) fue clasificada como posiblemente patogénica.

***FLNC* p.P2301A**

El caso índice con esta variante (p.P2301A) era un varón con antecedentes familiares de MCH y de MSC. Sólo pudimos estudiar a su hijo, que era también portador y afectado por MCH (**Figura 16**). Dado el tamaño limitado de esta familia la variante fue clasificada como posiblemente patogénica.

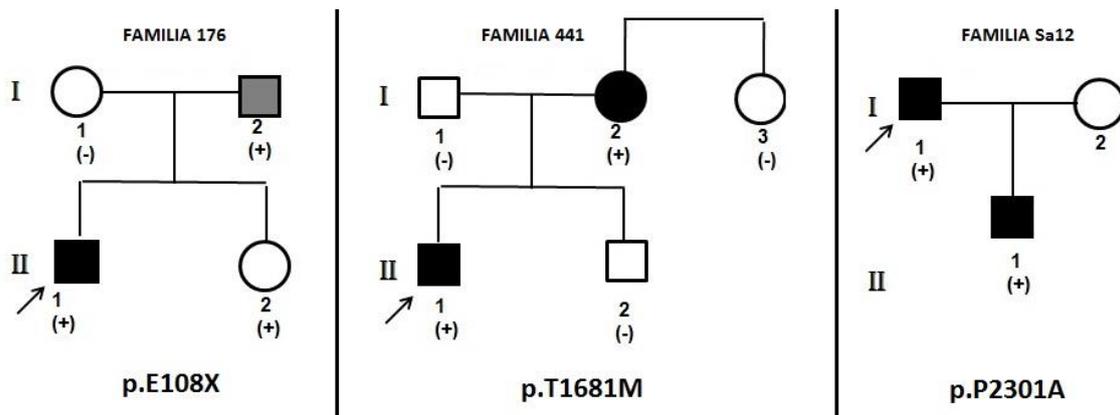


Figura 16: Árboles familiares de las variantes p.E108X, p.T1681M, p.P2301A, clasificadas como posiblemente patológicas.

Variantes de significado incierto y probablemente benignas

Dos casos índice no emparentados eran portadores de p.A2430V, que figura como variante muy rara tanto en la base de datos ESP como en la ExAC (11/121122 alelos). Sin embargo, los estudios con esta variante mostraron la formación de agregados proteicos por lo que podemos asumir un efecto funcional para este cambio de aminoácido. En una de las familias había dos familiares portadores de los que uno tenía MCH y el otro un septo en el límite de la normalidad (**Figura 17**). A pesar de estos indicios y dada su relativamente elevada frecuencia en la base ExAC (11 portadores de

la variante), y a que no disponíamos de ningún familiar en una de las dos familias, ésta variante fue clasificada como de significado incierto (VSI).

La variante p.N290K se halló en una mujer diagnosticada a los 64 años de edad, sin antecedentes familiares de MCH pero sí de muerte súbita en un hijo fallecido a los 34 años. Se realizó el estudio genético a otro hijo, siendo portador aunque sano a los 42 años de edad (**Figura 17**). Debido a que no se pudo realizar el análisis genético al hijo fallecido, clasificamos esta variante como de significado incierto.

La variante p.P1031L fue hallada en una mujer sin antecedentes familiares y diagnosticada a los 75 años. Tras determinarla en sus 3 hijas, todas eran portadoras y sin síntomas de MCH y con septos normales (**Figura 17**), por lo que la clasificamos como probablemente benigna.

Ningún familiar estaba disponible para el estudio genético de las variantes p.T1599A, p.G2151S, p.R2318W, p.V2375F, por lo que fueron clasificadas como VSI.

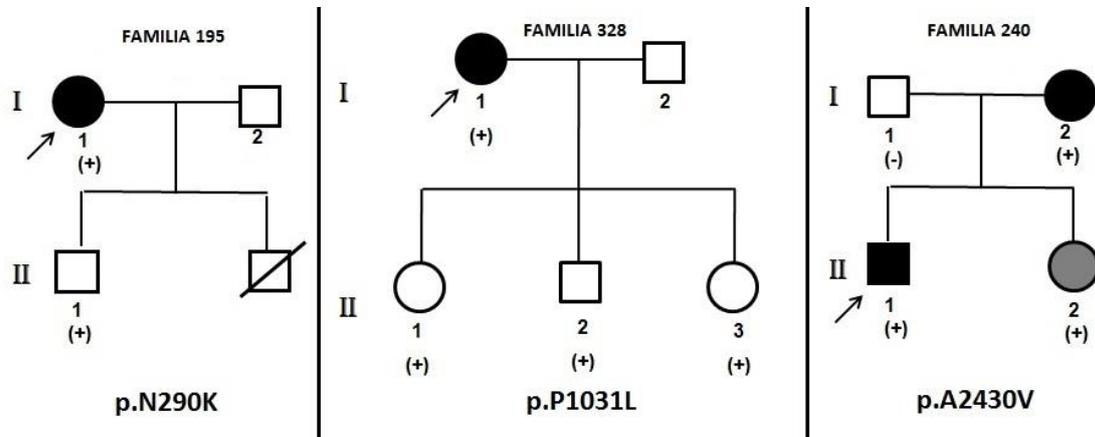


Figura 17: Árboles familiares de las variantes p.N290K, p.P1031L, y p.A2430V, clasificadas como de significado incierto, probablemente benigna, y de significado incierto, respectivamente.

Dobles portadores FLNC + MYBPC3 o MYH7.

De los 4 casos índices portadores variantes en *FLNC* y *MYH7* ó *MYBPC3*, pudimos analizar algún familiar en tres de ellos. En el primer caso, era portador de la variante patogénica p.R143Q en *MYH7* y de la variante p.L1690F en *FLNC*. Se estudiaron dos hijos del caso índice, ambos negativos para la variante en *MYH7*, y uno de ellos portador de la variante en *FLNC* (**Figura 18**). Se trataba de un niño de 6 años, al que se

le realizó un ecocardiograma con resultado normal. Debido a su corta edad y pese a que el ecocardiograma no mostraba signos de MCH, un desarrollo más tardío de la misma no puede ser descartado por lo que la variante p.L1690F fue clasificada como de significado incierto.

Otro paciente era portador de las variantes *MYBPC3*p.G1248R + *FLNC* p.E1408D. A pesar de que varios de los familiares estudiados eran portadores de una o ambas variantes ninguno de ellos estaba afectado, lo que cuestiona la patogenicidad de los dos cambios (**Figura 18**). De esta forma, p.E1408D fue clasificada como probablemente benigna.

El tercer caso con familiares disponibles para su estudio genético era doble portador p.E258K en *MYBPC3* + p.R2045Q en *FLNC*. La variante en *MYBPC3* ha sido descrita asociada a MCH en varios pacientes de origen poblacional diverso. Sin embargo, está descrita en 3 de los sujetos en la base de datos ExAC. Pudimos estudiar a dos familiares, uno portador de la variante en *MYBPC3* y con síntomas de MCH y otro portador de la variante en *FLNC* y no afectado (**Figura 18**). Por lo tanto, p.R2045Q fue clasificada como probablemente benigna.

Finalmente, no pudimos estudiar ningún familiar del portador de las variantes *MYH7*p.R1689H + *FLNC* p.N1843S, lo que en combinación con la predicción bioinformática como no patogénica nos indujo a clasificar a esta variante en *FLNC* como probablemente benigna.

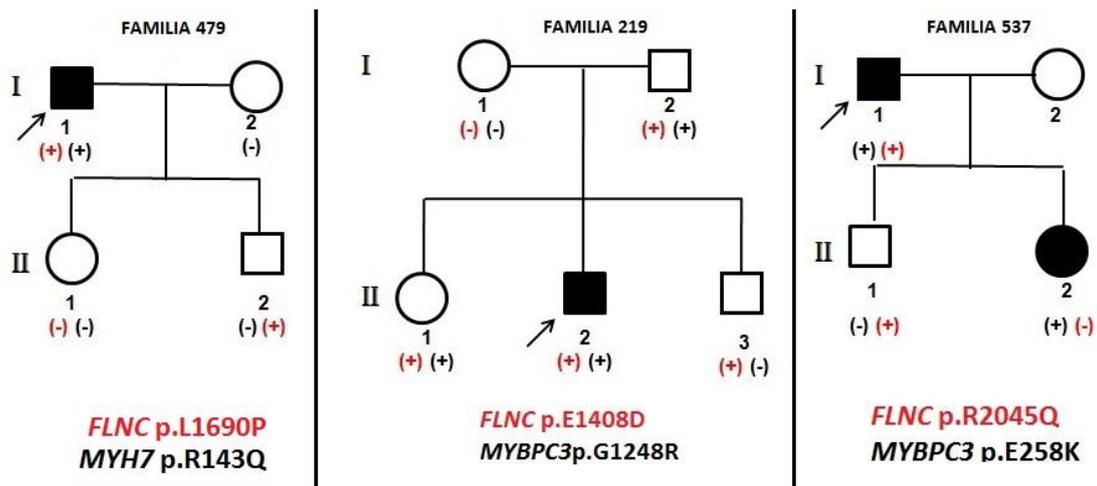


Figura 18: Árboles familiares de las variantes p.L1690F, p.E1408D, p.R2045R, cuyos casos índice también eran portadores de las variantes p.R143Q en *MYH7*, y p.G1248R, y p.E258K en *MYBPC3* respectivamente. En rojo las variantes en *FLNC*.

Características de los portadores de variantes en FLNC.

En las 11 familias con variantes sólo en *FLNC* y al menos dos afectados había un total de 36 portadores, 27 de ellos con signos de MCH (excluyendo aquellos con septos en el límite). Podemos concluir que estas variantes en *FLNC* se caracterizarían por una penetrancia incompleta. Cabe destacar que de los 6 portadores aparentemente sanos, 4 eran menores de 40 años por lo que un desarrollo tardío de la enfermedad no puede ser excluido en estos sujetos. Además, todos los afectados en éstas familias eran portadores de la correspondiente variante en *FLNC*, no habiendo ningún afectado que fuera negativo para la misma, lo que podemos tomar como una evidencia adicional del papel de este gen en la MCH.

Las principales características clínicas de los casos índices con variantes candidatas en *FLNC* están resumidas en la **tabla 10**. Los casos con variantes finalmente consideradas como probablemente benignas no se incluyen en el análisis. La mayoría de los casos con variantes candidatas en *FLNC* tenían manifestaciones clínicas leves, lo que sugiere un fenotipo relativamente benigno. Éste carácter poco maligno explicaría la penetrancia reducida, lo cual está en concordancia con la ausencia de historia familiar de MCH en la mayoría de los casos. La edad media de diagnóstico fue de 38 años, con una desviación típica de ± 12 años y un rango de 20-64 años. Como síntomas al diagnóstico, 8 presentaban disnea de esfuerzo en alguno de sus grados, 3 habían sufrido un síncope, y otros 3 describían dolor torácico. La media del tamaño del septo fue de 18,6 mm (± 5 mm, rango 15-35 mm). Ninguno de los casos índice había sufrido episodio de MSC, y dos de ellos habían recibido un desfibrilador auto-implantable en prevención primaria, aunque sólo uno de ellos tenía un riesgo alto de muerte súbita de acuerdo con los criterios establecidos por las guías de 2014[10]. Un paciente con diagnóstico inicial de MCH había evolucionado hacia una cardiopatía restrictiva. Tan sólo 5 de los casos índices presentaban antecedentes familiares conocidos de MCH; es decir, al menos un familiar también diagnosticado en el momento de su inclusión en el estudio.

Las características clínicas de los familiares portadores de variantes en *FLNC* están reflejadas en la **tabla suplementaria 2**.

Tabla 10: Resumen de las principales características clínicas de los pacientes portadores de variantes candidatas en *FLNC* (excluyendo las clasificadas como probablemente benignas).

0=No. 1=Sí. IC: Insuficiencia cardiaca. OTSVI: Obstrucción al tracto de salida del ventrículo izquierdo.

FA: Fibrilación auricular. TVNS: Taquicardia ventricular no sostenida. *Paciente con trasplante cardiaco.

ID	FLNC	Clasificación	Género	Edad inicio	Historia familiar MCH/MSC	Disnea	Dolor torácico	Síncope	IC	OTSVI	FA	Holter	Septum (mm)	Riesgo MSC
176	E108X	Posiblemente	Hombre	21	0/0	0	0	0	0	0	0	0	15	Bajo
84	V123A	Probablemente	Hombre	46	0/0	I/IV	1	0	0	1	1	0	20	Bajo
195	N290K	Incierto	Mujer	64	0/1	I/IV	0	0	0	1	0	0	18	Bajo
2	A1539T	Probablemente	Mujer	31	1/1	II/IV	0	0	0	1	1	TVNS	35	Alto
304	A1539T	Probablemente	Hombre	30	1/0	II/IV	0	0	0	0	0	0	15	Bajo
441	T1681M	Posiblemente	Hombre	36	0/0	0	0	1	0	0	0	0	18	Bajo
479	L1690F	Incierto	Hombre	40	0/0	0	0	0	0	0	0	0	20	Bajo
104	R2133H	Probablemente	Mujer	37	1/0	0	0	1	0	0	0	TVNS	18	Interm
393	R2140Q	Probablemente	Hombre	44	0/0	0	0	1	0	0	0	0	18	Bajo
242*	G2151S	Incierto	Mujer	20	0/0	II/IV	0	0	1	0	0	0	Traspl	-
451	P2298S	Probablemente	Mujer	26	0/0	0	0	0	0	0	0	0	16	Bajo
M-S12	P2301A	Posiblemente	Hombre	36	1/1	III/IV	0	0	0	0	1	0	17	Bajo
125	H2315N	Probablemente	Hombre	51	1/0	0	1	0	0	0	0	0	15	Bajo
549	V2375F	Incierto	Hombre	50	0/0	I/IV	0	0	0	0	0	TVNS	17	Bajo
240	A2430V	Incierto	Hombre	29	0/0	0	1	0	0	0	0	TVNS	19	Interm
M-S8	A2430V	Incierto	Mujer	51	0/0	II/IV	0	0	0	0	0	0	18	Bajo

Realizamos una comparación de las variables género, edad de inclusión en el estudio, edad de diagnóstico, historia familiar de MCH, historia familiar de muerte súbita en primer grado, y grosor del septo entre los portadores/no portadores de variantes en los principales genes sarcoméricos y los portadores de variantes posiblemente/probablemente patogénicas en *FLNC*. Ninguna de las variables mostró diferencias significativas entre los dos grupos (**Tabla 11**). Sin embargo, al analizar dichas variables entre las cohortes de pacientes portadores de variantes en los 9 genes sarcoméricos y los no portadores en ninguno de estos genes si observamos diferencias estadísticamente significativas en la edad de inclusión, la edad al diagnóstico, la historia de MCH, y la historia de muerte súbita. Estos resultados están en consonancia con otros estudios, en los cuales se encuentran más variantes en los genes sarcoméricos en los pacientes con una historia familiar de MCH frente a los que no la tienen.

Tabla 11: Comparación de las variables género, edad de inclusión media, edad de inicio media, historia familiar de MCH, historia familiar de MSC, y tamaño del *septum* entre las cohortes de sarcomérico negativo vs sarcomérico positivo, y sarcomérico positivo/negativo vs portadores de variantes probable/posiblemente patogénicas en *FLNC*. Se utilizaron los estadísticos Test ANOVA de un factor, test chi-cuadrado, y test de probabilidad exacta de Fisher. Nivel de significación <0,05. *: diferencias estadísticamente significativas. ns: no significativo.

Pacientes MCH	Sarcomérico negativo (n=279)	Sarcomérico positivo (n=169)	p valor	FLNC probable/posiblemente patogénica (n=10)	p valor
Género (Hombres %)	46%	43%	ns	60%	ns
Edad de inclusión media	59 ± 17	54 ± 16	0,001*	49 ± 16	ns
Edad de inicio media	51 ± 17	44 ± 16	<0,001*	36 ± 9	ns
Historias familiar de MCH	23%	47%	<0,001*	50%	ns
Historia familiar de MSC	7%	12%	0,029*	20%	ns
Tamaño septum medio	19.7 ± 5	20.9 ± 6	ns	18.7 ± 6	ns

Topografía de las variantes en FLNC, relativa a los dominios de la proteína.

Claramente, las variantes candidatas en *FLNC* no están distribuidas de manera homogénea a lo largo del gen (**Figura 18**). Así, 5 de las 9 variantes clasificadas como posible o probablemente patogénicas se hallan en sólo dos exones, 39 y 41, cerca del dominio C-terminal de la proteína, lo cual sugiere que esta zona puede tener un papel importante en el desarrollo de la MCH. Dichos exones constan de 41 y 90 aminoácidos, lo que supone únicamente un 3,3% de la proteína filamina C. Al realizar un test chi-cuadrado comprobamos que esta distribución de cambios no sería al azar ($p < 0,001$). Resulta llamativo que 2 de las 5 variantes clasificadas como de significado incierto debido a que no había familiares disponibles para su estudio, se localizaban también en dichos exones. Además, tan sólo se identificó una variante en los controles en alguno de los dos exones, y este cambio había sido también hallado en la cohorte de MCHs, y por lo clasificado como polimorfismo. Así mismo, ninguna de las variantes descritas asociada a miopatía se encuentra en dichos exones.

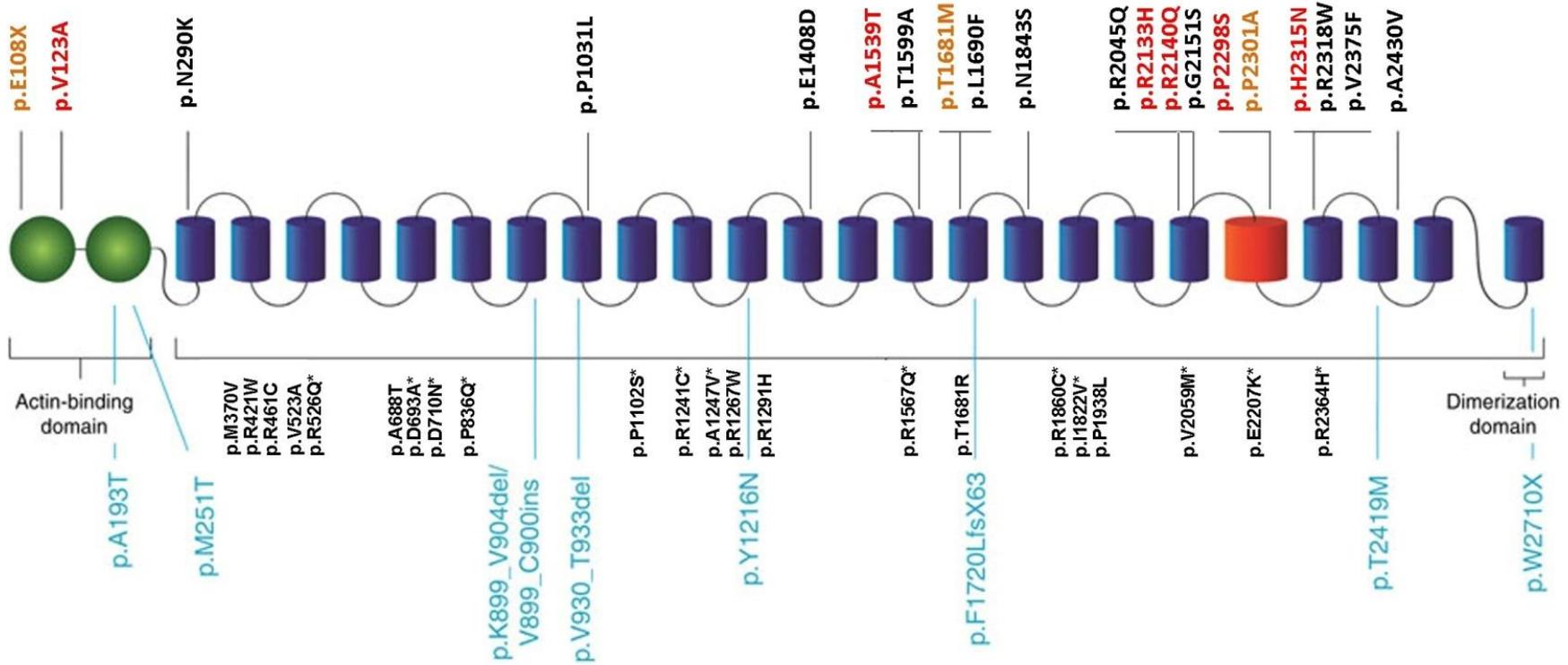


Figura 18: Representación esquemática del gen FLNC. Arriba, las variantes candidatas encontradas en la cohorte de MCHs. En rojo las variantes clasificadas como probablemente patogénicas, en naranja las variantes clasificadas como posiblemente patogénicas. Abajo, en azul las variantes asociadas a miopatía. En negro, las variantes encontradas en la cohorte de controles RENASTUR. Marcado con un asterisco aquellas encontradas también en la cohorte de MCHs.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Desarrollo de un protocolo de NGS para la MCH.

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es la enfermedad cardíaca hereditaria más común, con una incidencia estimada de 1/500 (0,2%)[5]. Se trata de una enfermedad primaria o esencial, a diferencia de la forma de hipertrofia del VI secundaria a otras causas. La “lesión” responsable de la MCH reside fundamentalmente en el sarcómero cardíaco, con una incapacidad intrínseca para funcionar correctamente debido a variantes patológicas en una serie de genes que codifican proteínas implicadas en la contracción del músculo cardíaco[2]. Los dos genes más relevantes son *MYH7* y *MYBPC3*, que sumarían entre los dos alrededor del 50% de los casos en los que se encuentra la variante causal [2]. Pero hay muchos otros genes que han sido relacionados con la MCH, la mayoría con una frecuencia mutacional <1%, por lo que un estudio genético completo exige analizar un tamaño importante del genoma. Tradicionalmente, podríamos plantearnos limitar el estudio mediante secuenciación Sanger a los genes más frecuentemente mutados y detenerlo cuando hayamos identificado alguna posible variante patogénica, pero esto puede resultar incompleto por varios motivos; principalmente la posibilidad de que la variante identificada no sea realmente la variante causal, y ésta se encuentre en un gen minoritario, a lo que hay que unir que un paciente puede tener más de una variante de riesgo en el mismo o en diferentes genes[51-52].

La secuenciación masiva o de nueva generación (NGS) ha revolucionado el campo de la Genética [36]. Con estas técnicas se ha conseguido un descenso drástico del coste de estudiar muchos genes en cada paciente, tanto en material como en tiempo de trabajo. En la MCH se estudian paneles de genes sarcoméricos claramente relacionados con la enfermedad, fundamentalmente los 9 que incluimos en nuestro estudio: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, y *TNNC1* [63]. Algunos laboratorios disponen de paneles genéricos de genes de enfermedades cardíacas que incluyen no sólo la MCH, sino otras cardiopatías estructurales y canalopatías (como los Síndromes de QT largo y Brugada). Podríamos decir que la NGS ha “democratizado” el diagnóstico genético al hacerlo accesible a casi toda la población que requiera esta asistencia dado su historial clínico o sus antecedentes familiares [37]. Con todo, la aplicación de cualquiera de los procedimientos de NGS a una enfermedad concreta requiere su validación en una serie grande de pacientes, para definir entre otras las tasas de falsos positivos y falsos negativos inherentes a la técnica.

Uno de nuestros objetivos ha sido desarrollar y validar un procedimiento de NGS para los principales genes de la MCH mediante tecnología de chips semiconductores, para los que no había (en el momento de iniciar nuestro estudio) ningún trabajo publicado sobre su fiabilidad. En este trabajo describimos el diseño e implantación de un protocolo de secuenciación masiva mediante mezclas de ADN en un equipo *Ion Torrent* PGM, para la identificación de variantes en los principales genes asociados a la MCH [64].

Los procedimientos de secuenciación masiva se basan en la amplificación de los genes en sujetos aislados, que son “marcados” mediante un cebador “código de barras” que va a permitir diferenciar cada caso cuando se secuencian varias muestras en un mismo chip [65]. En nuestro estudio partimos de una muestra de 300 pacientes, por lo que el procesamiento de cada muestra de forma individual representaba una carga de trabajo inasumible en tiempo y dinero. Por ello, nos planteamos reducir el número de reacciones iniciales mediante la secuenciación de mezclas de ADN de varios sujetos. De esta forma, para mezclas de 10 ADNs, podríamos reducir por diez el coste de la secuenciación [64, 66-68]. Este hecho haría especialmente atractivo nuestro protocolo para la secuenciación de grandes muestras de pacientes, a escala poblacional. El uso de mezclas de ADN para la secuenciación masiva de muestras grandes de pacientes ya había descrito para otras enfermedades mendelianas, aunque no en el contexto de la NGS con chips semiconductores [69-70]. Existen dos limitaciones principales a considerar en el protocolo de secuenciación NGS de mezclas de ADN. Por un lado, la necesidad de resecuenciar mediante Sanger todas las variantes candidatas en todos los casos incluidos en una mezcla, especialmente limitante en cuanto a tiempo y coste si el número de variantes candidatas fuese muy elevado. Este no ha sido el caso de nuestros pacientes. Por otro lado, la posibilidad de que alguno de los pacientes no amplifique correctamente y sus variantes no fuesen así identificadas en la NGS de la mezcla. Para reducir este riesgo realizamos una cuantificación precisa de todos los ADNs mediante ensayos con sondas Taqman, para asegurarnos que todos amplificaban correctamente y se incluían cantidades equimoleculares de cada uno en la mezcla correspondiente.

Como primer paso en la NGS de los 9 genes sarcoméricos diseñamos un panel de genes o *Ampliseq* a través de la herramienta on-line *Ion Ampliseq Designer* (www.ampliseq.com), de forma que pudiéramos amplificar en sólo dos tubos todos los exones codificantes y al menos 5 bases intrónicas flanqueantes de los genes *MYH7*,

MYBPC3, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, y *TNNC1*. El diseño de cebadores nos daba una cobertura teórica del 99% de la secuencia diana (aprox. 15 kb). Tras llevar a cabo la NGS en el PGM comprobamos que sólo los exones 12 de *MYBPC3*, 1 de *TPM1*, y 6 de *ACTC1* no daban lecturas para el análisis de los datos en todas las "carreras", por lo que dichos exones debían de ser secuenciados mediante secuenciación Sanger como parte del protocolo de cribado de los genes sarcoméricos en la MCH.

Para validar el procedimiento se incluyeron en la NGS casos previamente secuenciados mediante Sanger para los 9 genes, empleando los cambios ya conocidos como variantes control. Todas ellas se identificaron en las mezclas de ADN correspondiente en las subsiguientes carreras en el equipo PGM, incluidas una inserción y una delección [64]. A pesar del éxito aparentemente total de nuestra aproximación, como señalamos anteriormente hay algunos aspectos del método que conllevan cierto margen de error, siendo el más crítico que el alelo raro no sea detectado por fallo total en la amplificación del fragmento que lo contiene en la muestra portadora, o que amplifique a un nivel que se diluya dentro de la mezcla de ADNs por debajo del límite de detección (número de lecturas por base) fijado para identificar las variantes. Sin embargo, el hecho de que hayamos sido capaces de identificar todos los cambios control implica que este margen de error sería muy bajo. De hecho, aplicamos la misma aproximación para caracterizar la variación en otros genes de enfermedades tanto dominantes como recesivas, con una capacidad de detección de mutaciones >99% en todos los casos. Entre otras, La poliquistosis renal autosómica recesiva, el síndrome de Gitelman (una enfermedad recesiva túbulo-renal), la neuropatía CADASIL, o los síndromes de QT largo y Brugada [66, 71-72].

En nuestro protocolo para la MCH hemos fijado un número de lecturas del alelo raro vs normal del 25%. Es decir, para un heterocigoto asumimos que al menos una de cada 4 lecturas correspondería a la variante, por lo que si estuviese presente como alelo único en una mezcla de 10 muestras (20 alelos) sería considerada válida cualquier variante con al menos 2/100 lecturas (2% del total de lecturas, frente al 5% teórico). Se puede argumentar que este nivel conllevaría un aumento considerable del número de falsos positivos, con la consiguiente reducción de la especificidad y un número inasumible de variantes a desdoblarse mediante Sanger. Para minimizar este riesgo todas las variantes se

inspeccionaron visualmente mediante el software *Integrative Genome Viewer* (IGV; Broad Institute), y aquellas que no tenían lecturas en las dos hebras del ADN o en las que la calidad del mapeo no cubría unos mínimos se descartaron y no fueron validadas. Comprobamos mediante Sanger cómo varios cambios que no cumplían estos criterios eran realmente falsos positivos, lo que daría más validez al procedimiento [64].

La secuenciación en chips semiconductores podría ser más propensa a errores de lectura en regiones de homopolímeros nucleotídicos, con un mayor riesgo de falsos positivos y falsos negativos [73]. Todas las *indels* identificadas en dichas zonas deberían ser validadas mediante Sanger aunque no cumplan los criterios expuestos a fin de evitar los falsos negativos, lo que conlleva una reducción de la especificidad. Sin embargo, hemos comprobado que la mejora en la química de la secuenciación con la comercialización de los reactivos Hi-Q ha reducido el número de errores de este tipo. Con todas las limitaciones que queramos asumir, siempre debemos tener en cuenta que no hay ningún método de secuenciación masiva exento de riesgos de no detectar cambios reales. Incluso mediante secuenciación Sanger podríamos tener falsos negativos en situaciones como que los cebadores de la PCR se localicen sobre regiones con cambios no descritos en desequilibrio con la mutación, cuya hebra no sería así amplificada.

Como conclusión de este apartado de nuestro trabajo, el protocolo de NGS de mezclas de ADN mediante chips semiconductores en un equipo *Ion Torrent* PGM sería válido para determinar el espectro de variación de paneles de genes en cohortes grandes. Más aún, se puede aplicar al análisis de múltiples genes en poblaciones control para identificar toda la variación “rara” en la misma población de la que procedan los pacientes, un requisito fundamental a la hora de calibrar el peso de nuevos genes en las enfermedades mendelianas.

¿Nuevos genes en la MCH?: secuenciación del exoma

A lo largo de los años se han acumulado datos genéticos de miles de pacientes con MCH, definiendo el espectro mutacional de esta enfermedad. Los estudios básicos se basan en los principales genes sarcoméricos, bien caracterizados a nivel funcional, y se ha elaborado un mapa genético con el peso de cada uno en esta enfermedad. Hay varias conclusiones en este apartado, entre otras:

1. *MYH7* y *MYBPC3* son los más frecuentemente mutados, representando en conjunto alrededor del 50% de los casos con mutación identificada. Otros genes están mutados en alrededor del 5% de estos casos positivos, y algunos genes son

una causa muy rara de MCH. Salvo para alguna mutación, no se pueden sacar conclusiones claras de la relación entre estas y un fenotipo maligno o benigno [53-54]. Tampoco hay una relación de todo o nada entre un gen concreto y el fenotipo, a pesar de que en un principio se postuló que *MYH7* era en general un gen “maligno” comparado con *MYBPC3*. En los últimos años hemos tenido que reevaluar el carácter patogénico de muchas variantes en estos genes, previamente clasificadas como mutaciones por su presencia en algún paciente y ausencia en grupos de controles sanos [32, 47, 74]. El motivo principal es su aparición en alguno de los miles de sujetos aparentemente sanos cuyos exomas se han secuenciado. Con todo, la presencia en uno o unos pocos de estos controles no es causa excluyente del carácter patogénico, lo que coloca a estas variantes en una especie de “purgatorio” o limbo genético e imposibilita en muchos casos su empleo como predictor del riesgo a nivel familiar [75].

2. Alrededor de un 5% de los pacientes tendrían más de una mutación, en el mismo o en diferentes genes. Esto complica el diagnóstico genético ya que nos obliga a completar el estudio de todos los genes básicos para definir el genotipo con precisión. Más aún si consideramos que la presencia de dos mutaciones es un criterio de mal pronóstico y útil a la hora de tomar decisiones clínicas [51-52].
3. Es más probable hallar alguna mutación en casos con una historia familiar de MCH, comparados con casos esporádicos [2, 30, 74]. En los últimos años no se han publicado descubrimientos de nuevos genes en base a familias con muchos afectados, en las que el locus implicado podría ser mapeado por ligamiento.
4. Un porcentaje alto de pacientes, hasta un 50% en algunas series, no muestran mutaciones en los principales genes sarcoméricos, por lo que podemos asumir que hay otros genes en la MCH que permanecen por descubrir. En nuestro trabajo nos hemos centrado en estos casos, buscando genes nuevos mediante una secuenciación del exoma.

La secuenciación del exoma ha demostrado ser una herramienta muy útil a la hora de identificar nuevos genes asociados a patologías mendelianas [40]. Mediante esta aproximación se han descubierto muchos genes sin necesidad de recurrir a un ligamiento previo, que en las herencias dominantes requiere familias con muchos afectados. En nuestro estudio, en el 62% de los pacientes no identificamos ninguna variante candidata en los nueve genes sarcoméricos básicos. No podemos excluir que

algunos tengan variaciones en otros genes que se han relacionado (muy raramente) con la MCH, como *CSRP3*, *MYOZ2*, o *CASQ2* entre otros. La mayoría de estos pacientes negativos eran esporádicos o con un solo familiar afectado que muchas veces no estaba disponible para estudio genético, o en los que la propia MCH no pudo ser confirmada por el cardiólogo. Para buscar nuevos genes candidatos nos basamos en 6 casos con al menos otro familiar disponible para estudio genético. Tras secuenciar sus exomas identificamos variantes “sospechosas” en 4 genes candidatos, considerando para ello su papel en la fisiopatología cardíaca. Algunos genes candidatos se excluyeron al no compartir los afectados la variante candidata: es decir, ligamiento negativo en la familia. Entre estos genes se hallaba la titina (*TTN*), un gen por otro lado difícil de manejar por su tamaño, y la imposibilidad de clasificar muchos cambios de aminoácidos, dado el grado de variación “rara” descrita en las bases del exoma.

En una segunda fase validamos los genes *FLNC* y *MYO3B* en una muestra de 93 pacientes, y sólo en el primero encontramos varios casos con variantes candidatas. A partir de aquí centramos nuestro estudio en el gen de la filamina C, *FLNC*. Además de la evidencia genética, frecuencia muy baja o ausencia de las variantes en las bases del exoma y una segregación básica en las familias portadoras, el estudio se completó con datos funcionales. Por un lado, en el tejido cardíaco de varios portadores observamos agregados de filamina C (variantes p.A1539T, y p.G2151S) comparados con donantes sin MCH. Por otro, los estudios *in vitro* en células cardíacas transfectadas con alguna de estas variantes mostraron agregados proteicos en la fracción insoluble, y las variantes p.A1539T y p.2133H formaban agregados con la actina. Todo esto apuntaba a *FLNC* como una causa de MCH en una frecuencia que podría ser >5%. Obviamente, el grado de confianza es reducido si nos limitamos a estos datos con un número tan reducido de casos, la ausencia de ligamiento claro en familias grandes multigeneracionales, y sin disponer de datos de la variación en *FLNC* en la población general de la misma región y etnia que los pacientes de MCH.

FLNC: ¿un nuevo gen en la MCH?

Para afinar el papel de *FLNC* en la MCH extendimos su secuenciación a un total de 448 pacientes no emparentados, y a 450 controles sanos. Identificamos un total de 38 variantes con posible efecto funcional en la cohorte de MCHs, todas cambios de aminoácido salvo un codón de parada prematuro (p.E108X), frente a 22 cambios de aminoácido entre los controles. Dos variantes se encontraron en más de un paciente,

p.A1539T, no descrita, y p.A2430V, descrita con baja frecuencia en las bases de datos ESP y ExAC. Comparamos la frecuencia de variantes halladas sólo en pacientes (n=25; 5,6%) frente a aquellas identificadas sólo en controles (n=9; 2%), siendo la diferencia estadísticamente significativa (p=0,005). Más aún, el 3,1% de los pacientes frente al 0,2% de los controles eran portadores de variantes nuevas no descritas en las bases del exoma, lo que representa una evidencia poblacional del papel de *FLNC* en la MCH (p=0,007).

De todas las variantes candidatas seleccionamos un total de 20 para su segregación familiar. Para esta selección utilizamos criterios como su ausencia o frecuencia $\leq 0,0001$ (un orden de magnitud inferior a la frecuencia alélica de la incidencia de la enfermedad, $1/1000=0,001$) en las bases de datos del exoma (ESP y ExAC, que acumulan aproximadamente 65.000 exomas). En los portadores de 15 de estas variantes (n=16) pudimos realizar estudios familiares. En 11 de éstas familias, sin variantes en los principales genes sarcoméricos, disponíamos de al menos un segundo familiar afectado y todos ellos eran portadores de la correspondiente variante en *FLNC*. En total, en las 11 familias identificamos un total de 36 portadores en *FLNC*, y de estos 27 tenían signos de MCH, 3 tenían septos limítrofes, y 6 estaban asintomáticos y con septos dentro de la normalidad. Cabe destacar que de estos últimos, 4 eran menores de 40 años por lo que no podemos descartar un desarrollo tardío de la enfermedad. Por lo tanto, esto sugiere que, de ser patogénicas, la mayoría de las variantes candidatas en *FLNC* darían formas poco severas de MCH y con una penetrancia reducida.

En base a la frecuencia poblacional, los predictores bioinformáticos, los estudios de co-segregación, y los estudios funcionales clasificamos a las variantes candidatas como probablemente patogénicas (n=6), posiblemente patogénicas (n=3), de significado incierto (n=7), y probablemente benignas (n=4). Para considerarlas como probablemente patogénicas fijamos un mínimo de 3 afectados portadores en la familia, o 2 afectados portadores y evidencias funcionales de la patogenicidad; para clasificar a una variante como posiblemente patogénica, al menos 2 afectados portadores. Se puede argumentar que estos criterios no son los establecidos por las guías del Colegio Americano de Genómica y Medicina Genética en 2014, si bien como la propia guía indica, éstos sólo serían válidos para genes bien caracterizados en la MCH y no para genes candidatos, como es el caso de *FLNC* [55]. Si clasificáramos las variantes según los criterios de dichas guías tan sólo p.A1539T y p.V123A serían variantes

probablemente patogénicas, descendiendo las demás a variantes de significado incierto (VSI).

La existencia de portadores *FLNC* sin signos de MCH a edad avanzada indica que, o bien las variantes no son patogénicas, o si lo son están asociadas a una penetrancia reducida por su limitada severidad. Esta circunstancia es bastante común en la MCH, incluso para los genes validados y variantes claramente patogénicas. Por ejemplo, p.G263X es la mutación más frecuente en Asturias, donde representaría el 5% de los casos/familias con MCH. A pesar de ser claramente patogénica, se relaciona con una forma poco severa de la enfermedad con algunos portadores asintomáticos a edad avanzada [76]. Respecto a las variantes en *FLNC* identificadas en portadores de alguna otra variante sarcomérica, ninguna cumplía los requisitos de probable patogenicidad. Sin embargo, el número de variantes *FLNC* identificadas en este grupo sarcomérico era significativamente menor comparado con los casos sin mutación en ninguno de los 9 genes ($p=0,03$). Es decir, sería más probable hallar alguna variante candidata en *FLNC* en pacientes sin causa genética identificada, algo compatible con que el gen candidato juega un papel en el riesgo de desarrollar la enfermedad. De lo contrario, esperaríamos una distribución similar entre ambos grupos, con y sin variante sarcomérica.

Las variantes en *FLNC* habían sido previamente halladas en pacientes/familias con miopatía miofibrilar [77-79]. En algunos de los casos se describieron también signos de patología cardíaca, en muchos casos sin especificar, pero en ningún caso cardiopatía pura sin afectación muscular [78]. Ninguna de las variantes candidatas de nuestros pacientes ha sido relacionada con la miopatía [80]. Ninguno de nuestros portadores presentaba síntomas musculares, y en algunos pudimos confirmar la ausencia de afectación musculo-esquelética en muestras de biopsias. Las biopsias musculares realizadas a dos de los portadores confirmaron este hecho. Se han descrito casos similares para los genes *DES*, *LDB3*, *BAG3*, y *FHL1*, asociados tanto a afección muscular como cardíaca [43-44, 81-82]. En el caso de la MCH, uno de los pocos genes nuevos identificados mediante secuenciación del exoma es *FHL1*, localizado en el cromosoma X y con una herencia ligada al sexo. Dicho gen había sido previamente asociado a miopatía muscular, y se han descrito algunas variantes que pueden causar MCH pura (sin miopatía), y formas mixtas de miopatía y MCH [83]. Cabe destacar que incluso un gen tan claramente asociado al desarrollo de cardiopatías estructurales como *MYH7* puede causar una forma rara de miopatía distal de inicio temprano, la enfermedad de Laing [84]. Por lo tanto, cada vez hay más evidencias de los diferentes

fenotipos, tanto musculares, cardíacos o mezcla de ambos, que pueden tener su origen en genes que codifican proteínas estructurales o reguladoras de la contracción muscular. La clásica idea de que un gen concreto está relacionado con una enfermedad concreta debería ser sustituida por un escenario en el que una región o incluso una variante concreta diferencie el tipo de manifestación clínica. En este marco resulta llamativo que 5 de las 9 variantes clasificadas como posible o probablemente patogénicas se localicen en los exones 39 y 41 de *FLNC*. Por otro lado, en los controles sólo hallamos un polimorfismo raro en esos exones, presente también en los pacientes. Ninguna de las variantes asociadas a la miopatía se localizó en esta región de *FLNC*. Todo ello apunta a que los cambios de aminoácido en este dominio C-terminal podrían condicionar un fenotipo de MCH frente al de miopatía fibrilar pura. Serían necesarios estudios funcionales para confirmar este extremo, ya que en nuestro caso sólo pudimos estudiar la formación de agregados de filamina C en la variante p.R2133H, localizada en el exón 39[80].

FLNC más allá de la MCH: ¿un nuevo gen de cardiopatías estructurales?

En los últimos meses se han publicado varios estudios relacionando las variantes en *FLNC* con la Miocardiopatía Dilatada (MCD) y la Restrictiva (MCR) [85-87]. Brodehl y cols, secuenciaron el exoma dos familias con varios afectados por MCR y sin causa genética identificada. Hallaron dos variantes en *FLNC*, p.S1624L y p.I2160F, que segregaban con la enfermedad. Demostraron que p.S1624L formaba agregados proteicos citoplasmáticos en el tejido cardíaco[85]. Sin embargo, p.I2160F (localizada en el exón 39), presentaba una segregación familiar completa aunque no daba agregados proteicos, un hecho similar al de p.A1539T en nuestros pacientes. Esto sugiere que no todas las variantes en *FLNC* tendrían el mismo modo de actuación. A este respecto, mecanismos de agregación proteica, ganancia de función, o haploinsuficiencia podrían explicar la patogenicidad de las variantes de *FLNC*, como ocurre en el caso de las variantes relacionadas con las miopatías musculares [79].

Otros estudios han descrito variantes probablemente patogénicas en *FLNC* en familias con MCD. Reinstein y cols.hallaron una familia con MCD y portadores de dos variantes en *FLNC* [86]. Por tanto, un mecanismo recesivo podría explicar algunos casos de MCD. Resulta muy ilustrativo el estudio de Ortiz-Genga y cols., en el que secuenciaron *FLNC* en una serie de 2877 pacientes con diversas cardiopatías estructurales hereditarias, incluidos 1078 con MCH [88]. En el estudio se centraron en los cambios

“truncantes”, que producen una alteración drástica de la secuencia de la proteína, bien por introducir codones de parada (*nonsense*), cambiar la pauta de lectura (*frameshifting*), o a través del ajuste exón-exón (*splicing*). Identificaron 23 cambios de este tipo en 28 pacientes no relacionados: 20 de 508 pacientes con MCD (3,9%), 7 de 219 con cardiomiopatía arritmogénica (3,21%), y 1 de 45 con MCR (2,2%). Dichos portadores no presentan síntomas clínicos de miopatía muscular, aunque no se les realizaron pruebas diagnósticas de imagen ni biopsias musculares para descartar la afectación muscular. Tras los estudios familiares los autores concluyeron que un 74% de los portadores de las variantes truncantes en *FLNC* presentaban alteraciones cardíacas, lo que apoya una penetrancia incompleta incluso entre los portadores de estos cambios muy probablemente patogénicos. El porcentaje de portadores sintomáticos aumentaba al 97% entre los mayores de 40 años.

En su estudio, Ortiz-Genga y cols. no hallaron mutaciones truncantes entre los pacientes con MCH, y no describieron las variantes *missense* y su posible relación con la enfermedad. En estas, la interpretación de la patogenicidad es menos evidente y puede requerir estudios familiares que demuestren estadísticamente la segregación, y estudios funcionales adicionales que prueben la patogenicidad de las mismas. A su vez, Begay y cols., identificaron 2 variantes de cambio de ajuste en 3 pacientes con MCD no relacionados. Mediante ensayos en el pez cebra (*zebrafish*) demostraron que estas variantes provocaban alteraciones en el tejido cardíaco [89]. En ausencia de más datos, podríamos concluir que las variantes de tipo truncante se relacionarían con formas penetrantes de MCD, mientras que los cambios de aminoácido podrían ser menos “malignos” y darían formas menos severas de cardiopatía estructural, al menos en el caso de la MCH, lo cual dificultaría la interpretación y clasificación de estas variantes en *FLNC*.

Como ocurre en otros genes bien caracterizados en la MCH, nuestros datos sugieren que no todas las variantes de cambio de aminoácido halladas en *FLNC* van a estar relacionadas con la cardiopatía, aunque sean identificadas en pacientes con MCH sin miopatía y no estén descritas en las bases de datos. La interpretación de estos cambios de aminoácido va a ser difícil, especialmente en pacientes sin historia familiar de MCH o sin varios afectados disponibles para comprobar la segregación con de significación estadística. La mayoría de estas variantes podrían acabar así clasificadas como VSI, limitando el uso de las mismas para la práctica clínica y el consejo genético. Con todo,

los datos de nuestro estudio y otros recientemente publicados indican que *FLNC* juega un papel importante en el desarrollo de diversas cardiopatías estructurales.

Por último, aunque nuestro estudio sugiere que *FLNC* juega un papel relevante en la MCH, la penetrancia reducida de las variantes candidatas haría difícil calibrar el “peso” de este gen en la enfermedad. Claramente, son necesarios estudios con más cohortes de pacientes para definir el porcentaje de casos con variantes candidatas en *FLNC*, y de forma ideal demostrar la cosegregación en familias con varios afectados para confirmar la relación de este gen con la MCH. A partir de nuestra experiencia podríamos concluir que dadas las particularidades de la MCH y de los casos sin causa genética identificada, lo que permanece oculto (genes nuevos) va a ser difícil de descubrir.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El protocolo de secuenciación masiva (NGS) de mezclas de ADN mediante chips semiconductores en un equipo *Ion Torrent* PGM es válido para el cribado de los principales genes asociados a la Miocardiopatía Hipertrófica. Representa una reducción del tiempo de trabajo y del coste material para el cribado de varios genes en series grandes de pacientes.
2. Describimos el espectro de variación de los principales genes sarcoméricos en una serie grande de pacientes con MCH, identificando varias familias susceptibles de análisis para buscar nuevos genes candidatos.
3. La secuenciación del exoma de varios pacientes nos permitió identificar varios genes candidatos, y tras secuenciarlos en las familias y en una serie grande de pacientes, hallamos evidencias de que el gen *FLNC* (filamina C) podría estar implicado en la MCH pura (sin miopatía asociada).
4. Los estudios funcionales con las variantes p.V123A, p.A1539T, p.R2133H, p.G2151S, y p.A2430V de *FLNC* mostraron la presencia de agregados proteicos de filamina C.
5. La secuenciación masiva de *FLNC* en una cohorte grande de pacientes con MCH identificó variantes candidatas (posiblemente patogénicas) en un 2,2% de los casos. La mayoría de estas se localizaron en el extremo C terminal de la proteína, lo que apunta a un mecanismo patogénico que diferencia a la MCH de la miopatía pura causada por mutaciones en este gen.
6. Las características clínicas y familiares de los portadores de las variantes en *FLNC* sugieren que este gen se relacionaría con formas no severas de MCH y penetrancia reducida, lo que haría difícil confirmar su carácter patogénico mediante segregación familiar, limitando su empleo en el consejo genético.
7. Nuestra experiencia en la búsqueda de nuevos genes en la MCH sugiere que esta puede ser difícil al basarse en casos aparentemente esporádicos o con pocos familiares afectados. Esta limitación es más acentuada si las variantes en el gen candidato son cambios de aminoácido, ya que muchos terminarán siendo clasificados como de significado incierto.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Teare, D., *Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults*. Br Heart J, 1958. **20**(1): p. 1-8.
2. Maron, B.J. and M.S. Maron, *Hypertrophic cardiomyopathy*. Lancet, 2013. **381**(9862): p. 242-55.
3. Crawford, M.H. and R.A. O'Rourke, *The athlete's heart*. Adv Intern Med, 1979. **24**: p. 311-29.
4. Sankaranarayanan, R., J.F. E, and J.G. C, *Mimics of Hypertrophic Cardiomyopathy - Diagnostic Clues to Aid Early Identification of Phenocopies*. Arrhythm Electrophysiol Rev, 2013. **2**(1): p. 36-40.
5. Maron, B.J., et al., *Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults*. Circulation, 1995. **92**(4): p. 785-9.
6. Dimitrow, P.P., et al., *Sex-based comparison of survival in referred patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Am J Med, 2004. **117**(1): p. 65-6.
7. Elliott, P.M., et al., *Historical trends in reported survival rates in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Heart, 2006. **92**(6): p. 785-91.
8. Maron, B.J., *Historical perspectives on the implantable cardioverter-defibrillator and prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy*. Card Electrophysiol Clin, 2015. **7**(2): p. 165-71.
9. Maron, B.J., et al., *Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles*. JAMA, 1996. **276**(3): p. 199-204.
10. Elliott, P.M., et al., *2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2014. **35**(39): p. 2733-79.
11. Harvey, P.A. and L.A. Leinwand, *The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy*. J Cell Biol, 2011. **194**(3): p. 355-65.
12. Frey, N., M. Luedde, and H.A. Katus, *Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy*. Nat Rev Cardiol, 2012. **9**(2): p. 91-100.
13. Thierfelder, L., et al., *Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere*. Cell, 1994. **77**(5): p. 701-12.
14. Sata, M. and M. Ikebe, *Functional analysis of the mutations in the human cardiac beta-myosin that are responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. Implication for the clinical outcome*. J Clin Invest, 1996. **98**(12): p. 2866-73.
15. Lowey, S., *Functional consequences of mutations in the myosin heavy chain at sites implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(8): p. 348-54.
16. Knollmann, B.C., et al., *Familial hypertrophic cardiomyopathy-linked mutant troponin T causes stress-induced ventricular tachycardia and Ca²⁺-dependent action potential remodeling*. Circ Res, 2003. **92**(4): p. 428-36.
17. Bottinelli, R., et al., *A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity*. Circ Res, 1998. **82**(1): p. 106-15.

18. Robinson, P., et al., *Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments*. *Circ Res*, 2007. **101**(12): p. 1266-73.
19. Sweeney, H.L., et al., *Functional analyses of troponin T mutations that cause hypertrophic cardiomyopathy: insights into disease pathogenesis and troponin function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(24): p. 14406-10.
20. Spindler, M., et al., *Diastolic dysfunction and altered energetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(8): p. 1775-83.
21. Javadpour, M.M., et al., *Decreased energetics in murine hearts bearing the R92Q mutation in cardiac troponin T*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(5): p. 768-75.
22. O'Hanlon, R., et al., *Prognostic significance of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **56**(11): p. 867-74.
23. Konno, T., et al., *Heterogeneous myocyte enhancer factor-2 (Mef2) activation in myocytes predicts focal scarring in hypertrophic cardiomyopathy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(42): p. 18097-102.
24. Teekakirikul, P., et al., *Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(10): p. 3520-9.
25. Gautel, M., *The sarcomere and the nucleus: functional links to hypertrophy, atrophy and sarcopenia*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. **642**: p. 176-91.
26. Knoll, R., et al., *The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy*. *Cell*, 2002. **111**(7): p. 943-55.
27. Frey, N., et al., *Mice lacking caldesmon-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress*. *Nat Med*, 2004. **10**(12): p. 1336-43.
28. Bos, J.M., et al., *Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin*. *Mol Genet Metab*, 2006. **88**(1): p. 78-85.
29. Siegert, R., et al., *A myomesin mutation associated with hypertrophic cardiomyopathy deteriorates dimerisation properties*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **405**(3): p. 473-9.
30. Konno, T., et al., *Genetics of hypertrophic cardiomyopathy*. *Curr Opin Cardiol*, 2010. **25**(3): p. 205-9.
31. Van Driest, S.L., et al., *Yield of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy*. *Mayo Clin Proc*, 2005. **80**(6): p. 739-44.
32. Maron, B.J., M.S. Maron, and C. Semsarian, *Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(8): p. 705-15.
33. Geisterfer-Lowrance, A.A., et al., *A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation*. *Cell*, 1990. **62**(5): p. 999-1006.
34. Chiu, C., et al., *Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(3): p. 337-43.
35. Merante, F., et al., *Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA(glycine) gene*. *Am J Hum Genet*, 1994. **55**(3): p. 437-46.
36. van Dijk, E.L., et al., *Ten years of next-generation sequencing technology*. *Trends Genet*, 2014. **30**(9): p. 418-26.

37. Wheeler, M., et al., *A new era in clinical genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy*. J Cardiovasc Transl Res, 2009. **2**(4): p. 381-91.
38. Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-80.
39. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 348-52.
40. Gilissen, C., et al., *Unlocking Mendelian disease using exome sequencing*. Genome Biol, 2011. **12**(9): p. 228.
41. Puente, X.S., et al., *Exome sequencing and functional analysis identifies BANFI mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(5): p. 650-6.
42. Norton, N., et al., *Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(3): p. 273-82.
43. Hartmannova, H., et al., *Isolated X-linked hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel mutation of the four-and-a-half LIM domain 1 gene*. Circ Cardiovasc Genet, 2013. **6**(6): p. 543-51.
44. Friedrich, F.W., et al., *Evidence for FHL1 as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(14): p. 3237-54.
45. Gossios, T.D., L.R. Lopes, and P.M. Elliott, *Left ventricular hypertrophy caused by a novel nonsense mutation in FHL1*. Eur J Med Genet, 2013. **56**(5): p. 251-5.
46. D'Arcy, C., et al., *X-linked Recessive Distal Myopathy With Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by a Novel Mutation in the FHL1 Gene*. J Child Neurol, 2015. **30**(9): p. 1211-7.
47. Lopes, L.R., et al., *Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing*. J Med Genet, 2013. **50**(4): p. 228-39.
48. Ng, D., et al., *Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort*. Circ Cardiovasc Genet, 2013. **6**(4): p. 337-46.
49. Teekakirikul, P., et al., *Inherited cardiomyopathies: molecular genetics and clinical genetic testing in the postgenomic era*. J Mol Diagn, 2013. **15**(2): p. 158-70.
50. Ripoll-Vera, T., et al., *Clinical and Prognostic Profiles of Cardiomyopathies Caused by Mutations in the Troponin T Gene*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2016. **69**(2): p. 149-58.
51. Ingles, J., et al., *Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling*. J Med Genet, 2005. **42**(10): p. e59.
52. Maron, B.J., M.S. Maron, and C. Semsarian, *Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors*. Heart Rhythm, 2012. **9**(1): p. 57-63.
53. Landstrom, A.P. and M.J. Ackerman, *Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy*. Circulation, 2010. **122**(23): p. 2441-9; discussion 2450.
54. Ho, C.Y., *Genetics and clinical destiny: improving care in hypertrophic cardiomyopathy*. Circulation, 2010. **122**(23): p. 2430-40; discussion 2440.
55. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.

56. Riobello, C., et al., *KCNQ1 gene variants in the risk for type 2 diabetes and impaired renal function in the Spanish Renastur cohort*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **427**: p. 86-91.
57. Coto, E., et al., *Effect of the FTO rs9930506 Polymorphism on the Main Comorbidities of the Cardiorenal Metabolic Syndrome in an Elderly Spanish Cohort*. Cardiorenal Med, 2014. **4**(2): p. 82-7.
58. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
59. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
60. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
61. Gonzalez-Perez, A. and N. Lopez-Bigas, *Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(4): p. 440-9.
62. Kircher, M., et al., *A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants*. Nat Genet, 2014. **46**(3): p. 310-5.
63. Bos, J.M., et al., *Characterization of a phenotype-based genetic test prediction score for unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Mayo Clin Proc, 2014. **89**(6): p. 727-37.
64. Gomez, J., et al., *Mutation analysis of the main hypertrophic cardiomyopathy genes using multiplex amplification and semiconductor next-generation sequencing*. Circ J, 2014. **78**(12): p. 2963-71.
65. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.
66. Gomez, J., et al., *Non optical semi-conductor next generation sequencing of the main cardiac QT-interval duration genes in pooled DNA samples*. J Cardiovasc Transl Res, 2014. **7**(1): p. 133-7.
67. Gomez, J., et al., *Primary distal renal tubular acidosis: novel findings in patients studied by next-generation sequencing*. Pediatr Res, 2016. **79**(3): p. 496-501.
68. Gomez, J., et al., *A Semiconductor Chip-Based Next Generation Sequencing Procedure for the Main Pulmonary Hypertension Genes*. Lung, 2015. **193**(4): p. 571-4.
69. Harakalova, M., et al., *Genomic DNA pooling strategy for next-generation sequencing-based rare variant discovery in abdominal aortic aneurysm regions of interest-challenges and limitations*. J Cardiovasc Transl Res, 2011. **4**(3): p. 271-80.
70. Jin, S.C., et al., *Pooled-DNA sequencing identifies novel causative variants in PSEN1, GRN and MAPT in a clinical early-onset and familial Alzheimer's disease Ibero-American cohort*. Alzheimers Res Ther, 2012. **4**(4): p. 34.
71. Fernandez, A., et al., *A Next-Generation Sequencing of the NOTCH3 and HTRA1 Genes in CADASIL Patients*. J Mol Neurosci, 2015. **56**(3): p. 613-6.
72. Tavira, B., et al., *A labor and cost effective next generation sequencing of PKHD1 in autosomal recessive polycystic kidney disease patients*. Gene, 2015. **561**(1): p. 165-9.
73. Bragg, L.M., et al., *Shining a light on dark sequencing: characterising errors in Ion Torrent PGM data*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(4): p. e1003031.

74. Lopes, L.R., M.S. Rahman, and P.M. Elliott, *A systematic review and meta-analysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations*. Heart, 2013. **99**(24): p. 1800-11.
75. Ackerman, M.J., *Genetic purgatory and the cardiac channelopathies: Exposing the variants of uncertain/unknown significance issue*. Heart Rhythm, 2015. **12**(11): p. 2325-31.
76. Reguero, J.R., et al., *The G263X MYBPC3 mutation is a common and low-penetrant mutation for hypertrophic cardiomyopathy in the region of Asturias (Northern Spain)*. Int J Cardiol, 2013. **168**(4): p. 4555-6.
77. Shatunov, A., et al., *In-frame deletion in the seventh immunoglobulin-like repeat of filamin C in a family with myofibrillar myopathy*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(5): p. 656-63.
78. Kley, R.A., et al., *Clinical and morphological phenotype of the filamin myopathy: a study of 31 German patients*. Brain, 2007. **130**(Pt 12): p. 3250-64.
79. Furst, D.O., et al., *Filamin C-related myopathies: pathology and mechanisms*. Acta Neuropathol, 2013. **125**(1): p. 33-46.
80. Valdes-Mas, R., et al., *Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5326.
81. Schreiber, K.H. and B.K. Kennedy, *When lamins go bad: nuclear structure and disease*. Cell, 2013. **152**(6): p. 1365-75.
82. Konersman, C.G., et al., *BAG3 myofibrillar myopathy presenting with cardiomyopathy*. Neuromuscul Disord, 2015. **25**(5): p. 418-22.
83. Gallego-Delgado, M., et al., *Adverse clinical course and poor prognosis of hypertrophic cardiomyopathy due to mutations in FHLL1*. Int J Cardiol, 2015. **191**: p. 194-7.
84. Meredith, C., et al., *Mutations in the slow skeletal muscle fiber myosin heavy chain gene (MYH7) cause laing early-onset distal myopathy (MPD1)*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(4): p. 703-8.
85. Brodehl, A., et al., *Mutations in FLNC are Associated with Familial Restrictive Cardiomyopathy*. Hum Mutat, 2016. **37**(3): p. 269-79.
86. Reinstein, E., et al., *Congenital dilated cardiomyopathy caused by biallelic mutations in Filamin C*. Eur J Hum Genet, 2016. **24**(12): p. 1792-1796.
87. Cuenca, S., et al., *Genetic basis of familial dilated cardiomyopathy patients undergoing heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2016. **35**(5): p. 625-35.
88. Ortiz-Genga, M.F., et al., *Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(22): p. 2440-2451.
89. Begay, R.L., et al., *FLNC Gene Splice Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy*. JACC Basic Transl Sci, 2016. **1**(5): p. 344-359.

ANEXOS

ANEXOS

La presente Tesis Doctoral, está fundamentada en los siguientes artículos científicos:

Circ J. 2014;78(12):2963-71. Epub 2014 Oct 22.

Mutation analysis of the main hypertrophic cardiomyopathy genes using multiplex amplification and semiconductor next-generation sequencing.

Gómez J¹, Reguero JR, Morís C, Martín M, Alvarez V, Alonso B, Iglesias S, Coto E.

Nat Commun. 2014 Oct 29;5:5326. doi: 10.1038/ncomms6326.

Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy.

Valdés-Mas R¹, Gutiérrez-Fernández A¹, **Gómez J²**, Coto E³, Astudillo A⁴, Puente DA¹, Reguero JR⁵, Álvarez V², Morís C⁶, León D⁵, Martín M⁵, Puente XS¹, López-Otín C¹.

J Cardiovasc Transl Res. 2014 Feb;7(1):133-7. doi: 10.1007/s12265-013-9516-6. Epub 2013 Nov 5.

Non optical semi-conductor next generation sequencing of the main cardiac QT-interval duration genes in pooled DNA samples.

Gómez J¹, Reguero JR, Morís C, Alvarez V, Coto E.

Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):4555-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.06.085. Epub 2013 Jul 17.

The G263X MYBPC3 mutation is a common and low-penetrant mutation for hypertrophic cardiomyopathy in the region of Asturias (Northern Spain).

Reguero JR¹, **Gómez J**, Martín M, Flórez JP, Morís C, Iglesias S, Alonso B, Alvarez V, Coto E.

Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2016 Jan;69(1):61-8. doi: 10.1016/j.rec.2015.10.001. Epub 2015 Dec 5.

The Ups and Downs of Genetic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy.

Gómez J¹, Reguero JR², Coto E³.

Gene. 2015 Apr 25;561(1):165-9. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.040. Epub 2015 Feb 17.

A labor and cost effective next generation sequencing of PKHD1 in autosomal recessive polycystic kidney disease patients.

Tavira B¹, **Gómez J¹**, Málaga S², Santos F², Fernández-Aracama J¹, Alonso B¹, Iglesias S¹, Benavides A¹, Hernando I¹, Plasencia A¹, Alvarez V¹, Coto E³

Lung. 2015 Aug;193(4):571-4. doi: 10.1007/s00408-015-9736-4. Epub 2015 Apr 28.

A Semiconductor Chip-Based Next Generation Sequencing Procedure for the Main Pulmonary Hypertension Genes.

Gómez J¹, Reguero JR, Alvarez C, Junquera MR, Arango A, Morís C, Coto E.

J Mol Neurosci. 2015 Jul;56(3):613-6. doi: 10.1007/s12031-015-0560-3. Epub 2015 May 1.

A Next-Generation Sequencing of the NOTCH3 and HTRA1 Genes in CADASIL Patients.

Fernández A¹, **Gómez J**, Alonso B, Iglesias S, Coto E.

Tabla Suplementaria 1: Resumen de las variantes candidatas en los principales genes sarcoméricos (n=169), en la cohorte de MCH identificadas mediante secuenciación masiva. Cuatro de ellos son portadores de variantes candidatas en FLNC.

MCH ID	Gen	Efecto	ESP	ESP Eur	ExAC	ExAC Eur	Variante FLNC
1	<i>TNNI3</i>	p.R136Q	No	No	1/120380 (0.000008)	1/66462 (0.00002)	No
3	<i>MYH7</i>	p.R787C	1/13006 (0.00008)	1/8600 (0.0001)	7/121382 (0.00006)	6/66722 (0.00009)	No
8.3	<i>MYBPC3</i>	p.V342D	No	No	No	No	No
11	<i>MYBPC3</i>	p.Y749C	No	No	No	No	No
13.2	<i>TPM1</i>	p.D175N	No	No	No	No	No
14.3	<i>MYH7</i>	p.K542R	No	No	No	No	No
16.5	<i>MYBPC3</i>	p.V771M	2/11804 (0.0002)	1/7910 (0.0001)	1/17666 (0.0006)	No	No
21.2	<i>MYBPC3</i>	p.S406N	No	No	No	No	No
22.2	<i>MYL3+MYBPC3</i>	p.E143K + p.I539V	No+No	No+No	No+6/92042 (0.00007)	No+6/53912 (0.0001)	No
25	<i>TNNT2+MYBPC3</i>	p. R733H + p. R278C	No	No	4/117500 (0.00003)	4/65222 (0.00006)	No
26	<i>MYH7</i>	p.M822V	No	No	No	No	No
33	<i>MYBPC3</i>	p.G532FS	No	No	No	No	No
36	<i>MYH7</i>	p.L620P + p.K1459N	No + 1/13006 (0.00008)	No + 1/8600 (0.0001)	No + 37/121128 (0.0003)	No + 34/66566 (0.0005)	No
40	<i>MYBPC3</i>	p.R17Q	1/12502 (0.00008)	1/8408 (0.0001)	12/83926 (0.0001)	7/48036 (0.0001)	No
41.2	<i>MYBPC3</i>	p.A627Y	No	No	No	No	No
47	<i>MYBPC3</i>	p.R1138H	No	No	105/80556 (0.001)	30/40554 (0.0007)	No
68	<i>MYH7</i>	p.F247L	No	No	No	No	No
71	<i>MYH7</i>	p.R870H	No	No	No	No	No
74	<i>MYH7</i>	p.A583V	No	No	No	No	No
77.2	<i>MYBPC3</i>	p.A328fs	No	No	No	No	No
87	<i>MYBPC3</i>	p.M844fs	No	No	No	No	No
97	<i>MYH7</i>	p.S4L	No	No	2/120794 (0.00002)	2/66398 (0.00003)	No
98	<i>MYH7</i>	p.R1689H	No	No	2/121394 (0.00002)	1/66730 (0.00001)	p.N1843S
99	<i>MYBPC3</i>	p.R1022S	No	No	No	No	No
102	<i>TNNI3</i>	p.R199R	No	No	No	No	No
103	<i>MYBPC3</i>	p.R495W	No	No	No	No	No
105	<i>MYH7</i>	p.E924K	No	No	No	No	No

108	<i>ACTC1</i>	p.E101K	No	No	1/121402 (0.000008)	1/66730 (0.00001)	No
109	<i>MYBPC3</i>	IN 24+1G>A	No	No	No	No	No
113	<i>MYH7</i>	p.A583V	No	No	No	No	No
114	<i>MYBPC3</i>	p.S406N	No	No	No	No	No
115	<i>MYBPC3</i>	p.G263X	No	No	No	No	No
123	<i>MYBPC3</i>	p.G531R	No	No	2/115446 (0.00002)	2/64562 (0.00003)	No
126	<i>MYH7</i>	p.K1459N	1/13006 (0.00008)	1/8600 (0.0001)	37/121128 (0.0003)	34/66566 (0.0005)	No
131.2	<i>MYH7</i>	p.E1829G	No	No	No	No	No
133	<i>MYBPC3</i>	p.G263X	No	No	No	No	No
134	<i>MYBPC3</i>	p.Y237C	No	No	No	No	No
137	<i>MYBPC3</i>	p.D151N	No	No	1/24354 (0.00004)	1/11170 (0.00009)	No
138	<i>MYBPC3</i>	p.G263X	No	No	No	No	No
140.2	<i>TNNT2</i>	p.E163fs	No	No	No	No	No
141	<i>MYBPC3</i>	p.T1237P	No	No	No	No	No
143	<i>MYBPC3</i>	p.G263X	No	No	No	No	No
149	<i>MYBPC3</i>	p. R726C	No	No	4/110088 (0.00004)	1/61386 (0.00002)	No
158	<i>MYBPC3</i>	p.G263X	No	No	No	No	No
159	<i>MYH7</i>	p. I1927F	No	No	4/121328 (0.00003)	2/66694 (0.00003)	No
160	<i>MYH7+MYBPC3</i>	p.A100T + p.G263X	No+No	No+No	2/121406 (0.00002) + No	No + No	No
162	<i>MYBPC3</i>	p.Y749C	No	No	No	No	No
169	<i>MYBPC3</i>	p.I655T	No	No	No	No	No
183	<i>MYH7</i>	p.R723C	No	No	3/121400 (0.00002)	2/66738 (0.00003)	No
193	<i>MYH7</i>	p.P828S	No	No	No	No	No
205	<i>TNNI3</i>	p.A157V	No	No	No	No	No
206	<i>MYBPC3</i>	p.V342D	No	No	No	No	No
209	<i>MYBPC3</i>	p.V1115I	No	No	No	No	No
211	<i>MYH7</i>	p.K1459N	1/13006 (0.00008)	1/8600 (0.0001)	37/121128 (0.0003)	34/66566 (0.0005)	No
214	<i>MYBPC3</i>	p.R58Q	No	No	1/120720 (0.000008)	No	No
219	<i>MYBPC3</i>	p.G1248R	3/12234 (0.0002)	3/8288 (0.0004)	4/120334 (0.00003)	4/66442 (0.00006)	p.E1408D
220	<i>MYH7</i>	p.A216T	7/12556 (0.0006)	1/8408 (0.0002)	40/109458 (0.0004)	11/61462 (0.0002)	No
222	<i>MYH7</i>	p.R403Q	No	No	No	No	No

223	TNNI3	p.R136Q	No	No	1/120380 (0.000008)	1/66462 (0.00002)	No
224	MYBPC3	IN 21-2A>G	No	No	No	No	No
233	MYH7	p.K1459N	1/13006 (0.00008)	1/8600 (0.0001)	37/121128 (0.0003)	34/66566 (0.0005)	No
241	MYH7	p.R143Q	No	No	1/121400 (0.000008)	1/66732 (0.00001)	No
243	TNNI3	p.S199R	No	No	No	No	No
251	MYBPC3	p.M844fs	No	No	No	No	No
256	MYBPC3	p.D610H	1/12364 (0.00008)	1/8346 (0.0001)	3/51486 (0.00006)	2/28532 (0.00007)	No
257	MYH7	p.E1555K	No	No	No	No	No
258	MYBPC3	p.C566R	No	No	No	No	No
260	MYBPC3	p.E441K	5/12762 (0.0004)	2/8486 (0.0002)	18/110970 (0.0002)	10/62060 (0.0002)	No
263	MYBPC3	p.Q791X	No	No	No	No	No
264	MYBPC3	p.Q791X	No	No	No	No	No
265	MYBPC3	IN 24+1G>A	No	No	No	No	No
286	MYH7	p.R723G	No	No	No	No	No
290	MYBPC3	p.E258K + p.A216T	No + 7/12556 (0.0006)	No + 1/8408 (0.0002)	3/76868 (0.00004) +40/109458 (0.0004)	3/43348 (0.00007) +11/61462 (0.0002)	No
292	MYBPC3	p.R273C	No	No	No	No	No
301	TPM1	p.M281V	No	No	No	No	No
306	MYBPC3	p.Q789X	No	No	No	No	No
307	MYH7	p.T1019N	No	No	1/121412 (0.000008)	No	No
314	MYH7	p.E1578K	No	No	No	No	No
315	MYBPC3	p.Q791X	No	No	No	No	No
317	MYH7	p.G716R	No	No	No	No	No
318	MYBPC3	p.A859fs	No	No	No	No	No
321.2	TNNT2	p.R278C	6/13004 (0.0005)	5/8594 (0.0006)	40/93228 (0.0004)	33/53974 (0.0006)	No
322	MYBPC3	p.G263X	No	No	No	No	No
327	TNNT2	p.W287X	No	No	1/87244 (0.00001)	1/50840 (0.00002)	No
330	MYBPC3	p.Q791X	No	No	No	No	No
331	MYBPC3	p.Y749C	No	No	No	No	No
334	MYH7	p.T378I	No	No	No	No	No
344.1	MYBPC3	p.G5R	10/12252 (0.0008)	7/8318 (0.0004)	36/119710 (0.0003)	31/66370 (0.0005)	No
349	MYBPC3	p.L224fs + p.T227I	No	No	No	No	No

354	MYH7	p.S4L	No	No	2/120794 (0.00002)	2/66398 (0.00003)	No
355	MYBPC3	p.Q1044X	No	No	No	No	No
367	MYBPC3	p.R1271fs	No	No	No	No	No
371	MYBPC3	IN 24+1G>A	No	No	No	No	No
383	TPM1	p.E16Q	No	No	No	No	No
391	MYBPC3	p.D344E	No	No	No	No	No
396	MYBPC3	p.G263X + p.A1255G	No	No	No	No	No
397	TNNT2	p.R278C	6/13004 (0.0005)	5/8594 (0.0006)	40/93228 (0.0004)	33/53974 (0.0006)	No
399	MYL2	p.E22K	No	No	1/120944 (0.000008)	No	No
400	MYH7	p.R403Q	No	No	No	No	No
403	MYH7	p.R663C	No	No	No	No	No
407	MYBPC3	p.D770N	No	No	1/120498 (0.000008)	1/66582 (0.00001)	No
411	MYBPC3	p.E258K	No	No	3/76868 (0.00004)	3/43348 (0.00007)	No
413	MYH7	p.R870H	No	No	No	No	No
416	MYBPC3 + ACTC1	p.R1036H + p.T251A	2/12918 (0.0002)+ No	1/8540 (0.0001)+ No	7/120414 (0.00006)+ No	6/66506 (0.00009)+ No	No
418	MYBPC3	p.R1022S	No	No	No	No	No
419	MYH7	IN 8-3C>T	No	No	No	No	No
425	MYBPC3	p.E543K	No	No	No	No	No
433	MYBPC3	p.V1125M	No	No	2/87880 (0.00002)	2/49860 (0.00004)	No
436	MYBPC3	p.G507R	17/12874 (0.001)	3/8536 (0.0004)	82/120688 (0.0007)	9/66666 (0.0001)	No
437	MYBPC3	p.R335C	No	No	2/108234 (0.00002)	2/60264 (0.00003)	No
444	TNNT2+MYBPC3	p.R278C + p.A216T	6/13004 (0.0005)+ 7/12556 (0.0006)	5/8594 (0.0006)+ 1/8408 (0.0002)	40/93228 (0.0004)+ 40/109458 (0.0004)	33/53974 (0.0006)+ 11/61462 (0.0002)	No
445	MYBPC3	p.A216T	7/12556 (0.0006)	1/8408 (0.0002)	40/109458 (0.0004)	11/61462 (0.0002)	No
459	MYBPC3	p.Q642X	No	No	No	No	No
462	MYBPC3	p.G263X	No	No	No	No	No
464	MYBPC3	p.M844fs	No	No	No	No	No
466	MYBPC3+ MYL2	p.V671I + p.R120Q	No + No	No + No	No + 7/121404 (0.00006)	No + 2/66736 (0.00003)	No
467	MYH7	p.K1459N	1/13006 (0.00008)	1/8600 (0.0001)	37/121128 (0.0003)	34/66566 (0.0005)	No

471	MYBPC3	p.G263X	No	No	No	No	No
474	MYH7	p.I736T	No	No	No	No	No
477	MYBPC3	p.Y749C	No	No	No	No	No
479	MYH7	p.R143Q	No	No	No	No	p.L1690F
481	MYH7	p.I1927F	No	No	4/121328 (0.00003)	2/66694 (0.00003)	No
483	MYBPC3	p.G263X	No	No	No	No	No
484	MYH7	p.D239N	No	No	No	No	No
485	MYH7	p.A1051V	No	No	2/121398 (0.00002)	1/66740 (0.00001)	No
487.1	MYBPC3	p.R891fs	No	No	No	No	No
488	MYH7	p.K542R	No	No	No	No	No
489	MYBPC3	p.P1181A	No	No	No	No	No
491	MYBPC3	p.E258K + p.A216T	No+7/12556 (0.0006)	No+1/8408 (0.0002)	3/76868 (0.00004)+40/109458 (0.0004)	3/43348 (0.00007)+11/61462 (0.0002)	No
495	MYH7	p.A862P	No	No	No	No	No
496	MYL2	p.E22K	No	No	1/120944 (0.000008)	No	No
497	MYH7	p.R870H	No	No	No	No	No
498.1	MYBPC3	p.E441K	5/12762 (0.0004)	2/8486 (0.0002)	18/110970 (0.0002)	10/62060 (0.0002)	No
502	TNNI3	p.R162P	No	No	No	No	No
505	MYBPC3	IN 24+1G>A	No	No	No	No	No
509	MYBPC3	p.V342D	No	No	No	No	No
511	MYBPC3	p.Y237C	No	No	No	No	No
515	MYBPC3	IN 24+1G>A	No	No	No	No	No
516.1	MYBPC3	p.P955fs	No	No	No	No	No
517	TNNI3	p.R136Q	No	No	1/120380 (0.000008)	1/66462 (0.00002)	No
519	MYBPC3	p.W1098fs	No	No	No	No	No
522	TNNT2	p.R278C	6/13004 (0.0005)	5/8594 (0.0006)	40/93228 (0.0004)	33/53974 (0.0006)	No
528	MYH7	p.D1652Y	No	No	3/121192 (0.00002)	3/66658 (0.00005)	No
530	MYBPC3	p.E542Q	1/12613 (0.00008)	No	2/80474 0.00002)	1/47942 0.00002)	No
532	MYBPC3	p.R17Q	1/12502 (0.00008)	1/8408 (0.0001)	12/83926 (0.0001)	7/48036 (0.0001)	No
534	MYBPC3	p.E619K	8/12392 (0.0006)	8/8338 (0.0001)	43/54808 (0.0008)	41/30772 (0.001)	No

537	MYBPC3	p.E258K+ 216T	No + 7/12556 (0.0006)	No + 1/8408 (0.0002)	3/76868 (0.00004)+ 40/109458 (0.0004)	3/43348 (0.00007)+11/61462 (0.0002)	p.R2045Q
543	MYH7	p.R1818W	No	No	2/121392 (0.00002)	No	No
550	MYH7	p.F252Y	No	No	No	No	No
552	ACTC1	p.H90Y	No	No	1/121402 (0.000008)	1/66730 (0.00001)	No
559	MYBPC3	p.E258K + p.A216T + p.V771M +	No + 7/12556 (0.0006) + 2/11804 (0.0002)	No + 1/8408 (0.0002)+ 1/7910 (0.0001)	3/76868 (0.00004) + 40/109458 (0.0004) + No	3/43348 (0.00007)+11/61462 (0.0002)+No	No
561	MYH7	p.A797T	1/13006 (0.00008)	No	4/121372 (0.00003)	No	No
562	MYBPC3	p.E258K	No	No	3/76868 (0.00004)	3/43348 (0.00007)	No
566	MYBPC3	p.R733H	No	No	4/117500 (0.00003)	4/65222 (0.00006)	No
572	MYBPC3	IN 21- 2A>G	No	No	No	No	No
584	MYBPC3	p.L224fs + p.T227I	No	No	No	No	No
M-S11	TNNT2	p.R286H	1/13000 (0.00008)	1/8598 (0.0001)	7/88810 (0.00008)	1/51692 (0.00002)	No
M-S15	MYH7	p.R663H	1/13006 (0.00008)	1/8600 (0.0001)	2/121338 (0.00002)	2/66718 (0.00003)	No
M-S17	MYBPC3	p.W196X	No	No	No	No	No
M-S18	MYBPC3	p.Y749C	No	No	No	No	No
M-S19	MYBPC3	p.V931fs	No	No	No	No	No
M-S20	MYBPC3	p.V931fs	No	No	No	No	No
M-S23	MYBPC3	p.V931fs	No	No	No	No	No
M-S25	MYL2	p.K163G	No	No	No	No	No
M-S27	MYBPC3	p.E542Q	1/12613 (0.00008)	No	2/80474 0.00002)	1/47942 0.00002)	No
M-S28	MYBPC3	p.Q969X + p.Q998E	No	No	No + 144/27500 (0.005)	No + 3/13064 (0.0002)	No
M-S29	MYH7	p.N479S	No	No	No	No	No
M-S33	MYBPC3	p.R17Q	1/12502 (0.00008)	1/8408 (0.0001)	12/83926 (0.0001)	7/48036 (0.0001)	No
M-S34	TNNI3	p.R162W	1/12220 (0.00008)	1/8314 (0.0001)	4/120202 (0.00003)	3/66338 (0.00005)	No

Tabla suplementaria 2: Características clínicas de los portadores de variantes en *FLNC* (excluidos los portadores de variantes probablemente benignas).

ID	Variante FLNC	Variante sarcomérica	Género	Edad actual	Síntomas	Alteraciones en el Electro	Septum
176.1*	E108X	No	H	28	Asintomático	Yes	16 mm
176.3		No	H	57	Asintomático	No	Limítrofe
176.4		No	M	34	-	No	Normal
84.1*	V123A	No	H	63	Disnea-II; Dolor torácico	Yes	22 mm
84.2		No	H	35	Asintomático	Yes	16 mm
84.3		No	H	32	-	No	Normal
195.1*	N290K	No	M	70	Disnea-I; palpitaciones	Yes	18 mm
195.2		No	H	43	-	No	Normal
219.1*	E1408D	Sí	H	40	Asintomático	Yes	27
219.3		Sí	H	69	-	No	Normal
219.4		Sí	M	31	-	No	Normal
2.1*	A1539T	No	M	56	Disnea-II; fibrilación atrial permanente	Yes	35 mm
2.7		No	M	85	Valvulopatía	Yes	15 mm
2.9		No	M	74	Insuficiencia cardíaca	Yes	21 mm
2.12		No	H	69	Infarto de miocardio; valvulopatía	Yes	13 mm
304.1*	A1539T	No	H	33	Disnea-II	Yes	15 mm
304.2		No	M	59	Disnea-I	No	13 mm
304.3**		No	M	51	Trasplantado	Trasplantado	Trasplantado
304.4		No	M	36	Disnea-I	Yes	14mm
304.6		No	M	14	-	No	Normal
304.7		No	H	54	-	No	Normal
441.1*	T1681M	No	H	37	Síncope	Yes	18 mm
441.4		No	M	59	Asintomático	Yes	14 mm
479.1*	L1690F	Sí	H	41	Asintomático	Yes	20 mm
479.2		No	H	6	-	No	Nomal
98.1*	N1843S	Sí	H	44	Disnea-II	Yes	33 mm
104.1*	R2133H	No	M	57	Disnea-I	Yes	18 mm
104.4		No	M	54	Disnea-II	Yes	13 mm
393.1*	R2140Q	No	H	47	Síncope	Yes	18 mm
393.3		No	H	79	Síncope	Yes	16 mm

393.5		No	M	50	-	No	Normal
393.6		No	H	53	Asintomático	No	13 mm
242***	G2151S	No	M	33	Trasplantado	Trasplantado	Trasplantado
451.1*	P2298S	No	M	28	Síncope	Yes	16 mm
451.3		No	M	63	Síncope	Yes	15 mm
451.4		No	H	38	Síncope	Yes	15 mm
M-S12.1*	P2301A	No	H	66	Disnea-III	Yes	17 mm
M-S12.2		No	H	32	Disnea-I	Yes	15 mm
125.1*	H2315N	No	H	73	Dolor torácico	Yes	15 mm
125.2		No	H	70	Asintomático	Yes	16 mm
125.3		No	M	75	Asintomático	Yes	Limítrofe
125.4		No	H	32	-	No	Normal
585*	R2318W	No	M	71	Disnea-II	Yes	17 mm
549*	V2375F	No	H	67	Disnea-I	Yes	19 mm
240.1*	A2430V	No	H	34	Dolor torácico	Yes	22 mm
240.2		No	M	59	Asintomático	Yes	14 mm
240.4		No	M	32	Asintomático	No	Limítrofe
M-S8.1	A2430V	No	M	63	Disnea-II	Yes	18 mm

*: Casos índice; **: Miocardiopatía no compactada; ***: Miocardiopatía restrictiva