

Facultad de Ciencias
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS A CANALOPATÍAS HEREDITARIAS MEDIANTE ANÁLISIS EXÓMICO

JOSEPH ALAPE ARIZA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, D.C., Colombia

2023

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS A CANALOPATÍAS HEREDITARIAS MEDIANTE ANÁLISIS EXÓMICO

JOSEPH ALAPE ARIZA

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias - Biología

Directora:

Clara Isabel Santana Bermúdez Ph.D.

Codirector:

Rodrigo Cabrera Ph.D.

Línea de Investigación:

Nombrar la línea de investigación en la que se enmarca la tesis o trabajo de investigación

Grupo de Investigación:

Grupo RNómica teórica y computacional, Departamento de Biología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, D.C., Colombia

2023

(Dedicatoria o lema)

A mi esposa Catalina Castaño Toro que me ha apoyado en esta aventura, sin permitir que desfallezca.

A mi Jerónimo Alape Castaño que, con sus abrazos y besos, alegraba aquellas tardes y noches de largo trabajo y cansancio.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre Joseph Alape Ariza

Fecha 31/01/2023

VI Identificación de mutaciones en genes asociados a canalopatías hereditarias mediante análisis exómico

Macroproceso: FORMACIÓN

Proceso:

Título: ACTA DE SUSTENTACIÓN PÚBLICA DE TESIS



ACTA DE SUSTENTACIÓN PÚBLICA TESIS No. 015 DE 2023

En la ciudad de Bogotá, el día 25 del mes de mayo del año 2023, el Coordinador de la sustentación pública de tesis del Programa Curricular de Biología del Doctorado en Ciencias Biología, sesión híbrida, levanta la presente acta en la Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia, para efectos del respectivo registro de calificación en el Sistema de Información Académica y de conformidad con la siguiente información:

ESTUDIANTE	JOSEPH ALAPE ARIZA		
DNI	80435872	PLAN	Doctorado
PROGRAMA	Doctorado en Ciencias Biología		

TÍTULO DE LA TESIS	IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS A CANALOPATÍAS HEREDITARIAS MEDIANTE ANÁLISIS EXÓMICO
ACTO(S) ACADÉMICO(S) DE APROBACIÓN	Acta_X_ Oficio__ Resolución _____. Consejo de Facultad en sesión del 18 de febrero de 2016, Acta 05

DIRECTOR TESIS	Clara Isabel Bermúdez
ACTO(S) ACADÉMICO(S) DE APROBACIÓN	Acta_X_ Oficio__ Resolución _____. Consejo de Facultad en sesión del 18 de febrero de 2016, Acta 05

CODIRECTOR	Rodrigo Cabrera (Fundación Cardio – Infantil)
ACTO(S) ACADÉMICO(S) DE APROBACIÓN	Acta_X_ Oficio__ Resolución _____. Consejo de Facultad en sesión del 21 de abril de 2016, Acta 09

JURADO DE TESIS NOMBRE COMPLETO	TIPO DNI	NÚMER O DNI	ASISTENCIA		TIPO DE VINCULACIÓN		NOMBRE DE LA UNIVERSIDAD
			Presencial	Videoconferencia	UN	Externo	
Maria Claudia Lattig						X	Universidad de los Andes
Jorge Alexander Duitama Castellanos						X	Universidad de los Andes
Manuel Ignacio Zarante						X	Universidad Javeriana

ACTO(S) ACADÉMICO(S) DE DESIGNACIÓN Acta_X_ Oficio__ Resolución _____. Especifique número y fecha Consejo de Facultad en sesión del 02 de marzo de 2023, ACTA 05

Terminadas las respectivas deliberaciones y dando cumplimiento a la normatividad establecida, los jurados emiten la siguiente calificación a la tesis:

1. CALIFICACIÓN: APROBADO (AP): REPROBADO: NO HAY ACUERDO*:

* Pasa a Consejo de Facultad o al Comité Académico Administrativo para nombramiento de jurado para dirimir.

En caso de haber sido aprobada, y una vez considerados los criterios establecidos por el Consejo de Facultad o Comité Académico Administrativo (Distinción Meritoria) y el Consejo Académico (Distinción Laureada), en nuestra calidad de jurados y de manera unánime recomendamos otorgar la siguiente distinción:

2. DISTINCIÓN: NINGUNA: MERITORIA**: LAUREADA***:

** Los Consejos de Facultad podrán otorgar la distinción MERITORIA a las tesis de Maestrías o Doctorados que hayan sido propuestos unánimemente por los jurados y cumplan con los criterios establecidos por la Facultad. Los jurados deben remitir al Consejo de Facultad para su estudio, la solicitud por escrito, motivada y unánime con la justificación o argumentación que de soporte a la recomendación de esta distinción (Art. 57 literal d del Acuerdo 008 de 2008 del Consejo Superior Universitario), en el formato "ANEXO POSTULACIÓN DISTINCIÓN DE TESIS MERITORIA O LAUREADA".
*** Solicitud de otorgamiento debe ser unánime y formulada por los jurados de manera individual o conjunta ante el Consejo de Facultad (Art. 57 literal e del Acuerdo 008 de 2008 del Consejo Superior Universitario, Numeral 2 del Artículo 2 del Acuerdo 054 de 2012 del Consejo Académico, Circular de Consejo Académico 002 de 2015), en el formato "ANEXO POSTULACIÓN DISTINCIÓN DE TESIS MERITORIA O LAUREADA" para su respectivo trámite.

Nota: La recomendación de los jurados no garantiza el otorgamiento de la distinción. El Consejo de Facultad, el Comité Académico Administrativo o el Consejo Académico respectivamente, evaluarán y, otorgarán o negarán la solicitud.

Macroproceso: FORMACIÓN
Proceso:
Título: ACTA DE SUSTENTACIÓN PÚBLICA DE TESIS



En constancia de lo anterior firman:

JURADOS	
NOMBRE DEL JURADO	FIRMA
María Claudia Lattig	
Jorge Alexander Duitama Castellanos	
Manuel Ignacio Zarante	

COORDINADOR DE LA SUSTENTACIÓN:

NOMBRE COMPLETO:

_ Felipe Sarmiento Salazar _

FIRMA:

Agradecimientos

A la profesora Clara Isabel Bermúdez Santana, por su orientación, apoyo y por sus constantes consejos para que pudiese terminar la tesis, que hubo momentos en los cuales no se le veía rumbo.

Al doctor Rodrigo Cabrea de la Fundación Cardio Infantil de Bogotá, por su orientación y apoyo.

Al doctor Arbey Hernán Medina, por su gran colaboración y dedicación en la revisión de los protocolos de necropsia y cortes histológicos, fue un trabajo extenuante y adicional para él.

A Andrea Pinzón Reyes, por su valiosa colaboración, orientación en el manejo del equipo de secuenciación y acompañamiento durante la construcción de librerías.

Al grupo de patología forense, quienes facilitaron el acceso a los protocolos de necropsia para la realización del presente trabajo.

A la Subdirección de Investigación Forense del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, que gestiono los recursos para conseguir los kits del exoma clínico.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, por la gestión tanto administrativa como económica, para conseguir kits de genes de cardio y así lograr terminar la parte experimental de esta tesis.

A mis compañeros del Grupo de Genética Forense de la Dirección Regional Bogotá, por su constante apoyo y siempre estar pendiente de los avances experimentales en el laboratorio.

Al Centro de Investigación de la Subdirección de Investigación, que siempre estuvieron pendientes del adelanto de la tesis durante todo el tiempo.

Resumen

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS A CANALOPATÍAS HEREDITARIAS MEDIANTE ANÁLISIS EXÓMICO

El estudio de muerte súbita cardiaca es muy importante, dada la alta incidencia a nivel mundial, y en los países industrializados se ha convertido un problema de salud pública. Sin embargo, el abordaje de este tipo de muerte no es fácil, debido al componente genético de predisposición y sobre todo en muertes causadas por mutaciones en genes que codifican para proteínas que constituyen los canales iónicos (canalopatías). Con el descubrimiento en los últimos años de genes asociados a este tipo de muerte, se ha recomendado realizar estudios moleculares que permitan conocer cuáles son las bases moleculares y los factores de riesgo genético de la muerte súbita cardiaca, con fines de llegar a la medicina preventiva con un apropiado consejo genético. En Colombia el estudio de muerte súbita cardiaca se ha enfocado a los estudios convencionales de patología forense, sin embargo, en algunas muertes no es fácil diagnosticar la causa de muerte y permanecen en estudio. Lo anterior lleva a realizar un estudio molecular, para conocer los genes y mutaciones de estos genes que ayuden a explicar la causa probable de muerte súbita por canalopatías cardiacas. Se analizan mutaciones en los genes que codifican proteínas para canales iónicos cardíacos, mediante el análisis exómico utilizando la secuenciación de nueva generación (NGS). Así mismo se realiza un análisis de cambios estructurales en proteínas causadas por dichas mutaciones. Adicionalmente, se analiza cual es la incidencia de mutaciones de canales iónicos en una muestra de casos cuya muerte por patología está por determinar.

Palabras clave: Muerte Súbita, Canalopatías cardiacas, Análisis exómico, NGS, Variantes.

Abstract

IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN GENES ASSOCIATED WITH HEREDITARY CHANNEL DISEASES THROUGH EXOMIC ANALYSIS

The study of sudden cardiac death is very important, given the high incidence worldwide, and in industrialized countries it has become a public health problem. However, the approach to this type of death is not easy, due to the genetic component of predisposition and especially in deaths caused by mutations in genes that code for proteins that constitute ion channels (channelopathies). With the discovery in recent years of genes associated with this type of death, it has been recommended to carry out molecular studies that allow us to know what are the molecular bases and genetic risk factors of sudden cardiac death, in order to arrive at preventive medicine with an appropriate genetic advice. In Colombia, the study of sudden cardiac death has focused on conventional studies of forensic pathology, however, in some deaths it is not easy to diagnose the cause of death and they remain under study. This leads to a molecular study, to know the genes and mutations of these genes that help explain the probable cause of sudden death due to cardiac channelopathies. Mutations in genes encoding proteins for cardiac ion channels are analyzed by exome analysis using next-generation sequencing (NGS). Likewise, an analysis of structural changes in proteins caused by these mutations is performed. Additionally, it analyzes the incidence of ion channel mutations in a sample of cases whose death by pathology is to be determined.

Keywords: Sudden death, Cardiac channelopathies, Exomic analysis, NGS, Variants.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Productos de esta tesis	XIX
Introducción	1
1. Apoyo al diagnóstico molecular en forense, (genómica y exómica)	7
1.1 Introducción.....	7
1.2 Objetivo del capítulo	11
1.3 Materiales y métodos	12
1.3.1 Selección de Casos para Muerte súbita	12
1.3.2 Extracción y cuantificación de ADN	12
1.3.3 Secuenciación dirigida Illumina.....	12
1.3.4 Preparación de librerías	13
1.3.5 Secuenciación.	15
1.4 Análisis integral de los datos	15
1.4.1 Análisis en el Miseq	15
1.4.2 Calidad de archivos FASTQ.....	16
1.4.3 Algoritmos de alineamiento.....	17
1.4.4 Llamada de variantes	18
1.4.5 Visualización de los datos.....	19
1.4.6 Anotación de las variantes	19
1.5 Resultados	19
1.5.1 Control de calidad.....	20
1.5.2 Análisis de salida de secuencia	25
1.5.3 Importancia de aplicar más de un algoritmo de alineación y llamado de variantes	27
1.5.4 Visualización de archivos vcf con el software IGV	28
1.5.5 Anotación de variantes y selección de genes asociados a muerte súbita cardíaca	29
1.5.6 Variantes detectadas	30
1.5.7 Interpretación de variantes en contexto de los casos y su información complementaria clínica-forense.....	33
1.4 Discusión	45

2. Análisis <i>in silico</i> de genes asociados a canalopatías cardíacas y miocardiopatías usando la base de datos de mil genomas	51
2.1 Introducción	51
2.2 Objetivo	52
2.3 Metodología	52
2.4 Resultados	54
2.5 Discusión	58
3. Prevalencia de variantes asociadas a canalopatías cardíacas en una muestra poblacional	62
3.1 Introducción	62
3.2 Objetivo	64
3.3 Metodología	64
3.4 Resultados y Discusión	64
4. Análisis funcional de variantes encontradas	80
4.1 Introducción	80
4.2 Objetivo	81
4.3 Metodología	81
4.3.1 Predicción de Patogenicidad de Variantes	81
4.3.2 Predicción del impacto SNP en la estabilidad de la proteína	82
4.3.3 Análisis de especificidad genómica por ShinyGO	83
4.3.4 Efecto de la mutación en la estructura 3D de la proteína	83
4.3.5 Análisis de Interacción proteína-proteína y redes funcionales	84
4.4 Resultados y Discusión	84
4.4.1 Predicción del impacto de SNP en la estabilidad de proteínas	87
4.4.2 Análisis de interacción proteína-proteína	104
5. Conclusiones	109
5.1 Conclusiones Apoyo al diagnóstico molecular forense	109
5.2 Conclusiones del Análisis <i>in silico</i>	110
5.3 Conclusiones Prevalencia de variantes asociadas a canalopatías cardíacas y miocardiopatías	111
5.4 Conclusiones del análisis funcional	112
6. Limitantes en el estudio, perspectivas futuras y consideraciones éticas	113
6.1 Limitantes en el estudio	113
6.2 Perspectivas futuras	114
6.3 Consideraciones éticas	115
Bibliografía	116
Anexos	157
.....	158

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1 Flujo de trabajo del panel TruSigt One Sequencing.....	13
Figura 1.2. Resultados Sequence Analysis viewer	20
Figura 1.3. Revisión de calidad de los datos crudos con el software FasQC	21
Figura 1.4. Contenido de guanina, citocina y niveles de duplicación por secuencia	22
Figura 1.5. Análisis de duplicación con fastp	23
Figura 1.6. Estimación del tamaño del inserto con fastp.....	24
Figura 1.7. Calidad del <i>red</i> antes y después del filtro con fastp	24
Figura 1.8. Contenido de bases del <i>red1</i> antes y después del filtro con fastp.....	25
Figura 1.9. Calidad del <i>red2</i> antes y después del filtro con fastp	26
Figura 1.10. Contenido de bases del <i>red2</i> antes y después del filtro con fastp.....	27
Figura 1.11. Cobertura con los algoritmos de alineamiento ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 1.12. Diagrama de venn de comparación del llamado de variantes por cada uno de los algoritmos de alineamiento	28
Figura 1.13. Diagrama de venn comparación de Algoritmos de alineamiento utilizados durante el análisis de los datos	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1.14. Vista de las secuencias de genes con IGV	29
Figura 2.1 <i>Pipeline</i> utilizado para el análisis de la información de la base de datos de mil genomas.	53
Figura 2.2. Numero de individuos con variantes por gen en las poblaciones de los 1000 genomas	55
Figura 2.3. Variantes asociadas a diferentes enfermedades, eje Y: muestra las miocardiopatías y canalopatías, en el eje X: las variantes asociadas a las enfermedades en cada una de las poblaciones.	56
Figura 2.4 Predicción <i>in silico</i> , para la patogenicidad. En el eje Y se muestra el nivel de patogenicidad y en el eje X el número de variantes con cada uno de los predictores de patogenicidad.....	57
Figura 3.1 Rango de edades por genero de las muestras analizadas	64
Figura 3.2 Perdida alélica de las variantes analizadas, el color negro denota perdida alélica.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3.3 Distribución de las variantes tipificadas para cada uno de los individuos analizados.....	65
Figura 3.4 Estimación del desequilibrio de ligamiento mediante el software TASSEL v5	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3.5 Porcentaje de significancia clínica de las variantes tipificadas que pasaron los filtros	72

Figura 3.6 Fenotipos de las diferentes variantes encontradas en la presente tesis.	75
Figura 3.7 Numero de variantes detectadas por gen	76
Figura 3.8 Comparación de frecuencias genotípicas entre los resultados obtenidos del análisis <i>in silico</i> y las obtenidas en la presente tesis.	78
Figura 4.1 Comparación de los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNA1C, CACNB2, CASQ2, CAV3, CTNNA3, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP, SNTA1, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPMP4 y TTN con el resto de genes del genoma. Se ejecutaron pruebas de chi-cuadrado y t de Student para ver si los genes tienen características especiales en comparación con todos los demás genes: a) distribución de las longitudes de UTRs, b) distribución de los genes estudiados, en comparacion con el genoma.....	97
Figura 4.2 Enriquecimiento procesos biológicos en terminos de GO para los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNA1C, CACNB2, CASQ2, CAV3, CTNNA3, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP, SNTA1, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPMP4 y TTN ($p \leq 0.05$), a) el gradiente de color representa los valores ajustados y las diferencias en el tamaño de las burbujas se correlacionan con el factor de enriquecimiento; b) árbol de agrupamiento jerárquico, los términos GO relacionados se agrupan según la cantidad de genes que comparten. Los puntos más grandes indican valores de p más significativos.....	98
Figura 4.3 Redes de interacción de los genes estudiados a) componente biológico, b) componente celular y c) componente molecular.....	99
Figura 4.4. Figura 2.3 Ruta KEGG significativa para a) miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC), b) miocardiopatía dilatada (DM), c) miocardiopatía hipertrófica (HCM) y d) contracción del musculo cardiaco. Los genes de interés están resaltados en rojo.....	100
Figura 4.5 Primer plano para las variantes patogénicas de los genes TTN, MYPC3, TRPM4, KCND3, CTNA3 y KCNH2 genes. La proteína es gris, las cadenas laterales de los residuos de tipo salvaje color verde y mutantes de color rojo.....	102
Figura 4.6 Red funcional de los genes TRDN, TTN, CAV3, DSP, DSG2, TRPM4, AKAP9, ANK3, ANK2, CACNA1C, MYBPC3, KCND3 y KCNH2 con tres clústeres: clúster 1 (rojo), clúster 2 (verde) y clúster 3 (azul).....	105
Figura 4.7 Red de interacción los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNA1C, CACNB2, CASQ2, CAV3, CTNNA3, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP, SNTA1, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPMP4 y TTN, con otros genes.....	106

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 1. Reporte análisis con Fastp	23
Tabla 1.2. Variantes seleccionadas para análisis acorde a las frecuencias poblacionales con $MAF \leq 0.05$	30
Tabla 1.3. Significado clínico de las variantes encontradas en cada uno de los casos. ...	31
Tabla 1.4. Lista de SNPS analizados por <i>SIFT</i> , <i>PolyPhen2</i> , <i>Mutation Taster</i> , <i>LRT</i> , <i>Mutation Assesor</i> , <i>FATHMM</i> , <i>MetaSVM</i> , <i>RadialSVM</i> , <i>LR</i> , <i>CADD</i> , <i>GERP++</i> , <i>PhyloP</i> y <i>SiPhy</i>	32
Tabla 2 1. Numero de variantes encontradas en los genes asociados a cardiomiopatías y canalopatías en la base de datos de los mil genomas.....	54
Tabla 2.2. Significancia clínica de las variantes priorizadas.....	58
Tabla 2.3. Variantes patogénicas con frecuencias menores a las mínimas por super población.....	59
Tabla 3.2. Estimación de haplotipos para las variantes: rs1814964, rs3741315, rs7124127, rs743547, mediante la librería haplo.em en R.....	66
Tabla 3.3. Variantes seleccionadas para análisis acorde a las frecuencias poblacionales con $MAF \leq 0.05$	69
Tabla 3.4. Significado clínico de las variantes encontradas en cada uno de los casos. ...	70
Tabla 3.5. Predicción de patogenicidad con los predictores por <i>SIFT</i> , <i>PolyPhen2</i> , <i>Mutation Taster</i> , <i>LRT</i> , <i>Mutation Assesor</i> , <i>FATHMM</i> , <i>MetaSVM</i> , <i>RadialSVM</i> , <i>LR</i> , <i>CADD</i> , <i>GERP++</i> , <i>PhyloP</i> y <i>SiPhy</i>	71
Tabla 4 1. Lista de variantes analizadas por <i>SIFT</i> , <i>PolyPhen2</i> , <i>Mutation Taster</i> , <i>LRT</i> , <i>Mutation Assesor</i> , <i>FATHMM</i> , <i>MetaSVM</i> , <i>RadialSVM</i> , <i>LR</i> , <i>CADD</i> , <i>GERP++</i> , <i>PhyloP</i> y <i>SiPhy</i>	86
Tabla 4 2. Estabilidad proteica de los SNP por I-Mutant 3.0 y Mupro: MUpro: predice que la mutación podría desestabilizar relativamente la proteína o no. Puntuación menor que cero, significa que la sustitución disminuye la estabilidad de la proteína. Por el contrario, la puntuación >0 significa que la mutación aumenta la estabilidad de la proteína. I-Mutante: predice si una mutación puntual estabiliza o desestabiliza la estructura de la proteína nativa en función del cambio de energía libre ($\Delta\Delta G$).	87

Tabla 4 3. Predicción estabilidad de las proteínas con MutPred2 para las variantes de los genes KCNH2, ANK3, TTN, CTDSP2 y CAV3.....	90
Tabla 4 4. Enriquecimiento biológico ShinyGO.....	95
Tabla 4 5. Enriquecimiento molecular ShinyGO.	96

Productos de esta tesis

- Joseph Alape Ariza, Arbey Hernán Medina Rocha, Rodrigo Cabrera Pérez, Clara Isabel Bermudez-Santana, Next-generation sequencing of postmortem molecular markers to support for medicolegal autopsy, *Forensic Science International: Reports*, Volume 6, 2022, 100300, ISSN 2665-9107, <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2022.100300>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665910722000469>).
- Presentación “Apoyo de la NGS en autopsias médico legales en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Colombia) en el marco de las XII Jornadas Latinoamericanas de Genética Forense. Tecnológico de Antioquia. Medellín, 21 de septiembre de 2022.
- Alape JA, et al. Retrospective Molecular Analysis in Five Cases Probably Associated with Sudden Death the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences of Colombia. *Int J Forens Sci* 2023, 8(2): 000304. DOI: 10.23880/ijfsc-16000304
- International Research Awards of Science, Health and Engineering SHE 2022 Awards Certificate of Excellence ID No. 8429. Best Researcher Award. 2nd Dec 2022. Science Father is a trademark of Scifax company (reg. No. 1306116), Approved and Registered by Ministry of Corporate Affairs (MCA), Govt. of India.
- Pasantía internacional de investigación desde el 1 de noviembre de 2017 al 3 de mayo de 2018 en la Unidad de Bioinformática del Instituto Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, bajo la dirección del Dr. Hugo Naya email: blakngu@gmail.com

XX Identificación de mutaciones en genes asociados a canalopatías hereditarias mediante análisis exómico

Introducción

La muerte súbita (MS), se considera a aquella muerte natural, que tiene lugar de manera rápida e inesperada en individuos aparentemente sanos, la pérdida de las funciones vitales puede ocurrir en un intervalo de tiempo corto o de forma instantánea desde que se presentan los síntomas y que pueden ir de 15 minutos a 24 horas, aunque el intervalo más utilizado es el de 1 hora y 6 horas (Anderson Re, et al. 1994; Shen W et al.,1995; Liberthson RR., 1996; Neuspiel DR and Kuller LH., 1996).

En la práctica clínica, la causa más frecuente de MS es la de origen cardiovascular (muerte súbita cardíaca (MSC)), es una de las mayores causas de mortalidad en la población general, representa alrededor de un 20% de causa de muerte en países industrializados (Markwert et al., 2020), lo que la ha convertido un problema de salud pública dada la alta incidencia a nivel mundial en personas jóvenes (O'Mahony C. et al., 2019), por tal motivo se han realizado diferentes investigaciones para desarrollar métodos de estratificación del riesgo, dirigidos a identificar los individuos con mayor riesgo de MSC y encontrar intervenciones terapéutica y de prevención. Hasta el momento, la estratificación del riesgo ha girado principalmente en torno a los indicadores clínicos para mayor riesgo (Brudaga et al., 1998; Schwartz PJ, et al., 2001; Fadel S., et al. 2020; Wie J., et al. 2021).

Si bien, en los últimos años el abordaje de la MS ha contado con el desarrollo protocolos patológicos estandarizados, encaminados a determinar la correcta causa de la muerte, que incluye el análisis de datos clínicos antemortem, la inspección de la escena en que se produjo la muerte, autopsia con disección de los órganos más importantes (cerebro, corazón, pulmones, hígado y riñones), ensayos toxicológicos, cultivos microbiológicos y pruebas de detección metabólica en recién nacidos (Yingying T., et al., 2014), y teniendo cuenta que, aunque la mayoría de los episodios arrítmicos se presentan en corazones con anomalías estructurales, se ha identificado que de un 15 al 20% de los casos de MSC ocurre en corazones estructuralmente normales (Chung SS, et al., 2008; Bezzina et al., 2015; Fadel S. et al., 2020).

Pese a los protocolos estandarizados, en algunos casos no se puede llegar a determinar la causa de la muerte, lo que sugiere que estas muertes tienen una alta probabilidad de haber sido causada por una arritmia cardíaca de tipo canalopatía (Ackerman, MJ et al., 2011) que no puede ser detectada durante la autopsia.

Con la introducción de metodologías de genética y biología molecular en los últimos 30 años, se han logrado avances significativos en el conocimiento de los factores genéticos que predisponen a la MSC, encontrando múltiples mutaciones causantes de trastornos arrítmicos, que podrían desencadenar la MS en corazones estructuralmente normales (canalopatías), como en corazones con anomalía estructural (Bezzina et al., 2015, Fadel S. et al., 2020).

Con los estudios genéticos de MSC, se ha logrado identificar mutaciones en genes codificantes en cuatro familias de proteínas: sarcoméricas (asociada a cardiomiopatía hipertrófica (Geisterfer-Lowrance AA.T., et al., 1999)), citoesqueléticas (asociada a miocardiopatía dilatada (Burkett EL, Hershberger RE. 2005)), desmosómicas (asociadas a displasia arritmogénica de ventrículo derecho (Tomé, EM., et al., 2004)) y canales iónicos (asociadas a enfermedades eléctricas, como el síndrome QT largo (SQTL (Zipes et al., 2006)), Síndrome QT corto (SQTC Priori, SG., et al., 2005), síndrome de Brugada (SBr (Brugada P. and Brugada J. 1992)), Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC (Priori SG., et al., 2001) y Síndrome de Repolarización Precoz y Fibrilación Ventricular Idiopática (SRPyFVI (Valdivia CR., et al., 2010)), en el avance inicial del estudio de estas enfermedades se logró establecer la base genética de herencia mendeliana.

Con referencia, a mutaciones en los canales iónicos (canalopatías), presentan un patrón de herencia mendeliana con diversos grados de penetrancia y expresividad variable de la enfermedad (Priori SG, et al., 2013), convirtiéndolas en enfermedades complejas, incentivando el avance en pruebas moleculares que permitan comprender la amplitud y profundidad de las enfermedades cardíacas. Estos descubrimientos han afectado directamente el abordaje de las autopsias súbitas por parte de los patólogos (Ackerman, MJ et al., 2011; O'Mahony C. et al., 2019).

Adicionalmente, la MSC presenta una alta heterogeneidad genética y pleiotropismo por ello, el diagnóstico molecular se ha convertido en especial utilidad en la investigación de MSC, no solo para dilucidar la causa de muerte, si no, para identificar factores de riesgo debido a que este tipo de enfermedades tienen una base familiar, de origen genético que pueden ser monogénicas y autosómicas dominantes, recesivas, ligadas al sexo, etc., y la autopsia puede ser la única posibilidad de que una familia pueda ser remitida a un hospital de cardiología para que reciba el apropiado consejo genético (Basso C., et al., 2008; Priori SG., et al., 2009; Tester DJ and Akerman MJ, 2011; Priori SG., et al., 2013; O'Mahony C. et al., 2019).

Otro factor importante que ha resultado de los estudios realizados a la fecha, es que los canales iónicos pueden funcionar como partes de grandes complejos de macromoléculas que desempeñan papeles cruciales de transcripción, traducción, modificación postraduccional, degradación de todos los canales iónicos cardiacos, entre otros, y por ello la comprensión de la estructura y señalización dinámica de los ensamblajes multiproteínicos son vitales para comprender la función del corazón durante los procesos de la enfermedad (Hugues A., et al., 2015; Tsao CW, et al 2022) y el análisis del exóma puede ayudar a dilucidar algunos de estos aspectos que pueden modificar dominios en las proteínas de estos canales que puedan ocasionar cierta patogenicidad.

Sin embargo, también se encontraron con enfermedades a las cuales no se les podía descifrar su base genética, convirtiéndolas en enfermedades de herencia compleja, por lo cual, en los últimos 10 años con el desarrollado de la secuenciación masiva (NGS), que permite secuenciar el genoma completo y el exóma, para este último, es decir analizar la totalidad de los genes de un individuo, resulta ser una metodología muy importante para el análisis de enfermedades complejas como la diabetes, el cáncer, las enfermedades de origen cardiaco (canalopatías) asociadas a MSC, entre otras.

Teniendo en cuenta el Manual para la practica de autopsias médico-legales del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses del año 2000. Se presentan cuatro tipos de muertes:

Casos tipo I. Muertes sin historia de intervención de agente externo: natural

En algunos casos se requiere estudiar aspectos del diagnóstico, evolución o tratamiento del paciente, por lo que resulta conveniente efectuar una autopsia clínica.

En las muertes súbitas, habitualmente se solicita necropsia médico-legal ante la imposibilidad de certificación médica o porque las circunstancias puedan ser sospechosas.

Casos tipo II. Muertes con historia de intervención no intencional de un agente externo: accidental.

Casos tipo III. Muertes potencial o ciertamente intencionales, con historia de intervención de un ser humano, cuando el responsable es también la víctima: suicidio.

Casos tipo IV. Muertes potencial o ciertamente intencionales, con historia de intervención de un ser humano, cuando el responsable es un tercero: casos sospechosos o ciertamente homicidios.

Se considera manera de muerte aún no clasificada, cuando a pesar de una completa investigación de las circunstancias alrededor de ella, del examen postmortem y de pruebas de laboratorio apropiadas, no hay información suficiente para clasificarla como homicidio, suicidio, accidental o natural.

En Colombia las autopsias médico-legales están reglamentadas por el decreto numero 0786 de 1990: Por el cual se reglamenta parcialmente el titulo IX de la ley 09 de 1979, en cuanto a la practica de autopsias clinicas y medico -legales, asi como viscerotomias y se dictan otras disposiciones.

En el capitulo III (de las autopsias medico-legales, compilado en el articulo 2.8.9.5 del Decreto Reglamentario 780 de 2016 (articulo 4.1.1): objetivos de Autopsias Medico Legales: a) Establecer las causas de la muerte, la existencia de patologías asociadas y otras particularidades del individuo y su medio ambiente.

En Colombia, no hay reportes de estudios de epidemiología genética sobre la incidencia de las enfermedades cardiacas tipo canalopatías y su asociación en con los casos de MSC que llegan al Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses, esto deja un gran vacío en el conocimiento de cuáles y en qué proporción se presentan las mutaciones en genes candidatos asociados a canalopatías en la población colombiana.

Hipotesis de trabajo:

- Colombia al estar constituida por varios grupos étnicos presenta una alta variación genética por lo cual, es posible encontrar mediante el análisis exómico nuevas

variantes o genes candidatos que incrementen la susceptibilidad a presentar MSC en la población.

- Si se asume el modelo de variante-común enfermedad-común, en el que las variantes genéticas frecuentes en la población constituyen factores de riesgo del desarrollo canalopatías, variantes comunes en genes reportados en otras poblaciones, podrían constituir factores de susceptibilidad de la enfermedad en la población colombiana.

Teniendo en cuenta lo anterior, esta tesis doctoral:

El primer capítulo, tiene como objetivo identificar grupos de genes que posiblemente estén asociados a canalopatías, mediante el análisis completo del exóma en personas fallecidas por muerte súbita con resultados toxicológicos negativos, esto revisando, analizando y seleccionando los protocolos de necropsia de los casos, con la colaboración del grupo de patología forense del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

El segundo capítulo, el objetivo es analizar genes asociados a miocardiopatías y canalopatías cardíacas en la base de datos de los mil genomas (<http://www.internationalgenome.org/>), describir las frecuencias de variantes en los diferentes grupos poblacionales, incluyendo la población colombiana, e investigar el patrón de patogenicidad que pueden tener.

El tercer capítulo, el objetivo consistirá en determinar de forma indirecta la prevalencia genética de canalopatías a partir de casos de muerte súbita mediante el análisis de distribución de variantes identificadas por el estudio exómico, así como las reportadas en otras poblaciones.

El cuarto capítulo, el objetivo es caracterizar funcionalmente las mutaciones de los genes que se encuentren en el análisis exómico de personas fallecidas por muerte súbita cardíaca.

1. Apoyo al diagnóstico molecular en forense, (genómica y exómica)

1.1 Introducción

La MSC es aquella que ocurre dentro de la primera hora del inicio de los síntomas, que ocurre en pacientes encontrados muertos dentro de las 24 horas de estar asintomáticos y presumiblemente debido a una arritmia cardíaca o una catástrofe hemodinámica (Morini et al., 2015; Al-Khatib S. et al. 2018). Para el año 2022 American Heart Association, reporta que en Estados Unidos se presentan alrededor de 356 mil paros cardíacos por año y que en un 90% de ellos son fatales y que después de ser dados de alta la tasa de supervivencia es del 10% (Tsao CW, et al 2022).

La MSC, puede ser de origen estructural (Ackerman, MJ et al., 2011) o debido a arritmias por alteraciones funcionales de los canales iónicos o proteínas asociadas a estos, en las células cardíacas (Kaltman JR, et al., 2011; Tester DJ, et al., 2011)

Se ha reportado que las causas de MSC de origen estructural varía en los diferentes cortes de edad; Para personas mayores la enfermedad de arterias coronarias y cardiomiopatías (miocardiopatía hipertrófica (MCH), la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC), la miocardiopatía restrictiva (RCM), la miocardiopatía dilatada (DCM) y la no compactación del ventrículo izquierdo (LVNC)) representan más del 85%, mientras que para menores de 35 años representan el 40% con respecto al total de la población. (Ackerman, MJ et al., 2011; O'Mahony C. et al., 2019; Markwert et al., 2020).

El componente genético de estas enfermedades cubre un gran espectro de genes causales establecidos, genes causales probables y genes asociados con la enfermedad (Marian and Braunwal, 2017).

En diferentes estudios de cohorte de casos se han identificado variantes patogénicas en los genes: TRIM63 y TTN (titina) (Chen et al., 2012, Friedrich et al., 2012; Kimura 2016), MYH7 (β -miosina), MYBP3 (miosina proteína c), TNNT2 (troponina T cardíaca), TNNT13 (troponina cardíaca I), TPM1 (α -tropomiosina), ACTC1 (α -actina cardíaca), MYL2 (cadena ligera de miosina reguladora), MYL3 (cadena ligera de miosina esencial), CSRP3 (proteína 3 rica en cisteína y glicina) (Thierfelder et al., 1994; Poetter et al., 1996; Kimura et al., 1997; Mogensen et al., 1999; Erdmann et al., 2003; Richar et al., 2003; Geier et al., 2008; Kaski et al., 2009; Millat et al., 2010).

La heredabilidad de estas cardiopatías causadas por variantes comunes (Nikpay et al., 2015) y variantes raras se estima que oscila entre el 38 % y el 50 % a través de múltiples estudios (Won et al., 2015).

La MSC por mecanismos arritmogénicos (trastornos eléctricos primarios), se presentan en personas menores de 40 años y se estima una prevalencia en $5 <$ en 10.000, son hereditarios de penetrancia incompleta y pueden provocar arritmias potencialmente letales (Campuzano O., et al. 2015; Fadel S., et al. 2020; Wie J., et al. 2021). Los más comunes son: el síndrome de QT largo (SQTL), el síndrome de QT corto (SQTS), el síndrome de Brugada (BrS) y la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), son los más comunes, que se caracterizan por sus anomalías específicas del ECG (Bezzina et al., 2015, Fadel S. et al., 2020).

El SQTL, se identifica con frecuencia en la infancia, que se caracteriza por la prolongación del intervalo QT asociada con el síncope, lo que resulta en MSC. Se han asociado 15 genes con el SQTL, se cree que se heredan principalmente en patrones autosómicos dominantes.

Variantes patogénicas de pérdida de función (LoF) en los genes KCNQ1 (Wang et al., 1996) KCNH2 (Curan et al., 1995); otros genes relacionados a las subunidades de los canales iónicos: KCNE1, KCNJ5, HCNE2, SCN4B y a factores reguladores: incluidos NOS1AP, AKAP9, CAV3, ANKB, SNT1, CALM1 y CALM2 (Crotti et al., 2009; CroBoczek N, et al., 2013; Moira JG et al., 2014; Bezzina et al., 2015).

El SQTS, generalmente tiene un intervalo QT corto en el ECG. La distribución extrema del intervalo QT (podría ser más largo o más corto) resalta el hecho de que el trastorno es arritmogénico. Se han encontrado variantes patogénicas en los genes *KCNH2*, *KCNQ1* y *KCNJ2* son de ganancia de función, que lleva a una repolarización cardiaca más corta (Bellocq et al., 2004; Brugada et al., 2004; Priori et al., 2005). Otras subunidades en los canales de calcio (CaV1.2 L) *CACNA1C* y *CACNB2* (Deo et al., 2013) también se han asociado al SQTS. Estos genes de calcio también están relacionados con el SBr.

El SBr es otro trastorno eléctrico, se asocia con el síncope y paro cardiaco y generalmente ocurre durante el sueño o el reposo (Watanabe et al., 2008; Priori et al., 2013). Además de los genes de calcio, están asociados algunos canales de sodio y proteínas asociadas a los canales de calcio: *SCN1B*, *SCN3B* y *GPD1L* (Van Norstrand et al., 2007; Watanabe et al., 2008), proteínas del canal de potasio: *KCND3*, *KCNE3* y *KCNJ8* (Samuel Ch., et al., 2017)

La CPVT, un síndrome de arritmia hereditaria altamente maligna, las mutaciones en los genes *RYR2* y *Calsequestrin 2 (CASQ2)* explican la mayoría de los casos (Laitinen et al., 2001, Priori et al., 2001). *RYR2* de herencia autosómica dominante, mientras que *CASQ2* es autosómica recesiva menos común pero más grave de CPVT (Lahat et al., 2001).

Los diferentes tipos y la ubicación de las variantes patogénicas están muy correlacionados con la gravedad del defecto, lo que afecta la gravedad de la enfermedad en estos síndromes (Fadel S. et al., 2020).

Las muertes súbitas no cardíacas (SNCD) también representan al menos el 20% de los casos de muerte súbita en total. Los genes que están asociados con SUDEP provienen principalmente de vías de canales dependientes de voltaje de sodio y potasio. Estos genes incluyen *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN5A*, *SCN8A*, *KCNA1*, *KCNQ1*, *KCNH2* y *DEPDC6* (Leu et al., 2015, Coll et al., 2019; Manolis et al., 2019). Las variantes patogénicas en *SCN5A* también causan DCM, una causa principal de MSC. Se observan patrones genéticos poligénicos en estos casos de SUDEP, lo que indica que los efectos de combinación gen-gen pueden agravar el riesgo de SUDEP (Coll et al., 2019).

La secuenciación de próxima generación (NGS) se ha utilizado ampliamente para comprender los factores genéticos de las enfermedades graves del desarrollo, como el

cáncer, las malformaciones congénitas y los trastornos neurológicos, como el trastorno del espectro autista (TEA) (Luthra et al., 2015, Byers et al., 2016, Surrey et al., 2019).

Sin embargo, el uso de la tecnología NGS para investigar el riesgo de muerte súbita es insuficiente. Una revisión reciente señaló que los datos publicados sobre los métodos NGS y el diagnóstico de muerte súbita cardíaca aún son limitados (Morini et al., 2015). Esto podría deberse a la complejidad de la interacción genética y el entorno de muerte súbita, lo que hace que una sola prueba genética no pueda dar una imagen completa de la misma.

Los paneles de genes para el estudio de estas enfermedades, pueden variar de decenas a miles de genes y son la prueba preferida cuando se sospecha una afección específica o un grupo de enfermedades. De hecho, los paneles de genes generalmente se seleccionan entre genes previamente asociados con un fenotipo particular ("lista de genes de enfermedades centrales"). Este enfoque tiene como objetivo maximizar la sensibilidad, la especificidad y la cobertura de los genes seleccionados (Adams D.R. and Eng C.M. 2018).

En el caso de un fenotipo menos claro, como en SUDEP, los paneles de genes son amplios, y con WES puede mostrar un mayor rendimiento diagnóstico. La decisión sobre qué genes incluir en el panel es potestad de cada laboratorio (Adams D.R. and Eng C.M. 2018). Los estudios de MSC comúnmente incluyen genes asociados con canalopatías y cardiomiopatías, con un panel de genes menor (Lahrouchi N., et al. 2017).

La implementación de la NGS para el análisis de casos asociados a MSC fue realizado por Bagnall et al, analizó 28 casos de jóvenes e identificó 6 variantes para SQTL (Bagnall et al., 2014).

En 2016 Hata et al., empleo un panel de 70 genes en 25 casos de SUDEP con corazones normales o anomalías estructurales no diagnosticadas, logró identificar 5 variantes conocidas y 10 variantes nuevas en los genes RYR2, CACNA1C y ANK2 a las cuales después de hacer los análisis *in silico* las clasifiqué como potencialmente patogénicas, 3 variantes en genes asociados a HCM o DCM (MYH7, LDB3 y PRKAG2), 5 variantes en genes relacionados con ACM (PKP2, JUP, DSG2, DSP y TMEM43) y 2 genes del factor de transcripción cardíaca (TBX5 y GATA4). Adicionalmente encontró variantes raras

heterocigóticas combinadas en 3 de los 25 casos, y 2 sujetos portaban 3 o más variantes (Hata et al., 2016).

En otros estudios de casos de SUDEP encontraron genes asociados a cardiomiopatías en un 47% y en canalopatías en un 53%, variantes asociadas a probables efectos funcionales en un 29% (Nunn LM., et al. 2016; Hertz CL., 2016), estos resultados indican que las cardiomiopatías a veces pueden presentarse con MSC antes del desarrollo de un fenotipo diagnóstico, también que no se deben descartar las canalopatías en presencia de cambios estructurales mínimos detectados en la autopsia.

Recientemente, otros casos de MSC analizados por NGS con un mayor número de genes asociados a MSC (194 a 380), el inconveniente es que al utilizar un número mayor de genes también aumenta el número de variantes de significado incierto, por lo cual los autores recomiendan periódicamente realizar la clasificación de estas variantes (Hellenthal N., et al. 2017; Neubauer J. et al. 2018; Sanchez O., et al. 2016, Campuzano O., 2018, Shanks GW. Et al. 2018; Mak CM., et al. 2019).

Como se puede observar, la implementación de la autopsia molecular, es de suma importancia para poder dar respuestas de la causa de muerte en aquellos casos clasificados como de muerte indeterminada.

1.2 Objetivo del capítulo

En este capítulo se utilizará el secuenciamiento de última generación de exómas (exoma clínico), para identificar grupos de genes que posiblemente estén asociados a canalopatías cardíacas. El protocolo de trabajo iniciará desde la selección de casos de personas fallecidas por muerte súbita con resultados toxicológicos negativos hasta la identificación de variantes genes asociados a las canalopatías cardíacas.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Selección de Casos para Muerte súbita

Para el análisis del exóma clínico se realizó un análisis retrospectivo de casos asociados a muerte súbita desde el año 2015 y cuyas muestras de sangre reposaban en la central de evidencias del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

Se seleccionaron seis (6) casos asociados posiblemente a muerte súbita cardíaca y cinco (5) controles, acompañados de la correspondiente revisión de los protocolos de necropsia, teniendo en cuenta las circunstancias de la muerte, antecedentes clínicos, los estudios macro y microscópicos durante la necropsia médico legal, así como resultados de los análisis toxicológicos, histológicos y de virología, según correspondiera para cada caso.

El filtro de las muestras, fueron negativos en enfermedades coronarias estructurales del corazón, microscópicamente cardiomiocitos normales, negativos para toxicología y virología.

1.3.2 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN a partir de sangre se realizó utilizando el kit QIAamp®DNA Blood Midi/Maxi, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La cuantificación del ADN y las librerías se realizó mediante el kit Quantitating dsDNA usando el instrumento Quantus™ Fluorometer y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

1.3.3 Secuenciación dirigida Illumina

Se realizó la secuenciación NGS paired-end de 2x150 pb con el equipo MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA. USA) usando MiSeq Reagent V3 (150 cycles), según el protocolo de la casa comercial. El secuenciamiento fue realizado por parte del autor de la tesis in situ y

no por servicio usando las instalaciones del equipo ubicado en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Para ello se empleó distintos sistemas de enriquecimiento del Kit de Illumina.

TruSight™One: Panel de secuenciación que contiene las regiones exónicas e intrónicas adyacentes de 4834 genes clínicamente relevantes y que están incluidas en las bases de datos: Base de datos de mutaciones genéticas humanas (HGMD), Catálogo de Herencia en el Hombre (OMIM), Gene Test.org. Este panel cubre 12MB de contenido genómico.

Nextera XT: Permite la marcación del ADN genómico mediante un transposoma, que fragmenta de manera simultánea el ADN genómico y añade secuencias de adaptadores a los extremos, permitiendo la posterior amplificación por PCR. Adicionalmente permite determinar regiones genómicas de interés cuando estas no son muy grandes. El flujo de trabajo general seguido en el procesamiento se presenta en la siguiente figura:

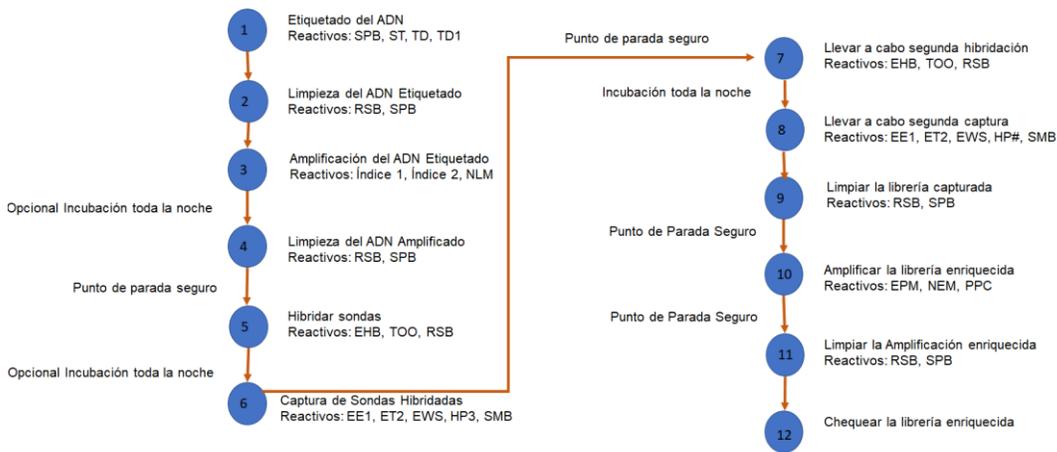


Figura 1.1 Flujo de trabajo del panel TruSigt One Sequencing

1.3.4 Preparación de librerías

La preparación de las librerías de cada una de las muestras con el *TruSight One Sequencing Panel Series (Illumina)*, en las instalaciones del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. El panel se compone de 4834 genes relevantes que han sido

validados para enfermedades humanas. El ADN extraído se cuantificó y normalizó a una concentración 10 ng/μL gDNA, el cual se diluyó a una concentración de 5 ng/μl en un volumen de 10 μl para una concentración final de 50ng de ADN.

Posteriormente se realizó la tagmentación del DNA, proceso que consistió en la fragmentación del ADN en tamaños de 300 pb. Para su etiquetado se utilizaron secuencias adaptadoras en un solo paso, con ayuda del complejo enzimático llamado transposoma (transposasa acoplada a un transposón). Una vez finalizado este proceso se colocó la muestra en una placa midi de 96 pocillos para la purificación del DNA tagmentado utilizando etanol al 80% y perlas de purificación SPB (del inglés Sample Purification Beads, Illumina) las cuales se unen al DNA por diferencia de cargas.

El DNA fue eluído en 22.5 μL de buffer RSB (Resuspension Buffer, Illumina) con ayuda de una placa magnética. Se realizó una PCR para la amplificación del DNA tagmentado y para la adición de secuencias índices (i5 y i7), secuencias adaptadoras (P5 y P7) y secuencias complementarias a los *primers* de secuenciación. Se realizó la correspondiente purificación del ADN amplificado y la cuantificación de las librerías.

Posteriormente se realizaron dos pasos de hibridación de las muestras con buffer de enriquecimiento de hibridación (Enrichment Hybridization Buffer (EHB)) y los oligos (TruSight One Oligos (TOO)). La captura de regiones de interés específicas, se realizó con perlas de estreptavidina y se realizaron dos lavados para eliminar uniones no específicas de las perlas. La biblioteca enriquecida se eluyó desde las perlas y se prepararon para una segunda hibridación. La purificación se realizó a 50 grados dentro de una placa midi, una gradilla magnética y solución de lavado de enriquecimiento.

Posteriormente se realizó un enriquecimiento de la librería utilizando PPC (PCR Primer Cocktail) y NEM (Enrichment Amp Mix).

La biblioteca final se cuantificó con kit Quantitating dsDNA usando el instrumento Quantus™ Fluorometer. Se realizó el cálculo para convertir la concentración de ng/μl a nM utilizando el tamaño promedio de la biblioteca y el peso molecular de un par de bases Ecuación 1.

$$\frac{\text{concentración en } \frac{ng}{\mu l}}{(660 \text{ g/mol} * \text{tamaño promedio de la biblioteca})}$$

La biblioteca se diluyó a una concentración de 4 nM, utilizando buffer RSB.

1.3.5 Secuenciación.

Se descongeló el cartucho de secuenciación que contenía los reactivos (Reagent Cartridge) usando un baño de agua a temperatura ambiente, se sumergió la base del cartucho por 90 a 120 minutos. A la biblioteca concentrada a 4 nM se le realizaron dos diluciones seriadas a 20 pM y 12 pM usando buffer HT1 (Hybridization Buffer). Finalmente se preparó la muestra a secuenciar en un volumen de 600 con concentración de 12 pM.

Se cargó esta última muestra en el cartucho. Se realizó el lavado de la celda de flujo con agua destilada estéril y etanol al 80%. Se colocó la celda de flujo, el cartucho y el buffer PR2 (Incorporation Buffer) en el equipo MiSeq para comenzar la secuenciación pair-end de 150 pb.

1.4 Análisis integral de los datos

1.4.1 Análisis en el Miseq

El secuenciador Miseq realiza un control de calidad interno consistente en detectar errores del propio aparato los cuales fueron revisados. Para ello se utilizaron dos análisis, uno primario en tiempo real mediante el software nativo de Illumina Sequencing Analysis Viewer (SAV), que genera archivos de datos que incluyen métricas de análisis (Clústeres que pasan el filtro; puntajes de calidad de llamada de bases, valores de fase y prefase) que son utilizadas por MiSeq Reporter en el siguiente análisis o análisis secundario. En este análisis se realizan una serie de procedimientos como son:

Demultiplexación: Se realiza para todos los flujos de trabajo, identifica índices y enumera varias muestras para las bibliotecas que contienen 1 o 2 índices, separa los datos de las muestras agrupadas en función del indexar secuencias de diferentes bibliotecas.

Generación de archivos FASTQ: Los archivos FASTQ son la entrada principal para los pasos computacionales requeridos en etapas posteriores. Estos archivos contienen lecturas no indexadas para cada muestra, se excluye lecturas que no pasaron el filtro,

Alineamiento: Identifica coincidencias óptimas entre las secuencias leídas y la secuencia del genoma de referencia (GRCh37/hg19) asignándoles una puntuación en función de su similitud con la referencia. Los resultados de alineación se escriben en archivos de alineación/mapa binario BAM, que son la entrada primaria para el llamado de variantes.

Llamada de variantes: La llamada de variantes registra Variantes y los *indeles* cortos, mediante la llamada de variantes somática que identifica las variantes presentes a baja frecuencia en la muestra de ADN y minimiza los falsos positivos, esto lo realiza en tres pasos: 1) identifica cada posición en el genoma de referencia por separado, 2) cuenta las bases en la posición dada para lecturas alineadas que se superponen a la posición y 3) calcula una puntuación variante que mide la calidad de la llamada, estas puntuaciones se calculan utilizando un modelo de Poisson que excluye las variantes con un nivel de calidad inferior al Q20.

Adicionalmente el modelo solo llama variantes para bases que son cubiertas a 300x o más para un solo amplicón. Las variantes se llaman primero para cada grupo por separado. Las variantes de los 2 grupos son comparadas y combinadas en un solo archivo de salida. Si una variante cumple los siguientes criterios, la variante se marca como PASS en el archivo de variantes: (Debe estar presente en ambos grupos) y acumulativamente tiene una profundidad de 1000 o una profundidad promedio de 500x por grupo, tener una frecuencia de variante de 3% o mayor según lo informado en la llamada de variante fusionada, estas variantes se guardan en un archivo VCF.

1.4.2 Calidad de archivos FASTQ

Para el análisis computacional de la metainformación secuenciada para cada caso se inició un protocolo a partir de los archivos FASTQ generados por el secuenciador MiSeq. Se utilizó complementariamente la herramienta bioinformática FastQC (Andrews S, 2010) que ofrece una visualización rápida de calidad de los archivos FASTQ, permite exportar los resultados en un fichero HTML, junto a tablas y gráficas que resumen el estado de los

datos. Adicionalmente se utilizó el software FASTP (Shifu Chen, et al 2018), que permite realizar en un solo paso el control de calidad, recorte de adaptadores, filtrado de calidad, poda de calidad por lectura y muchas otras operaciones de los datos FASTQ. Como paso final se genera un archivo HTML donde se muestran el resumen de los datos.

1.4.3 Algoritmos de alineamiento

Se utilizaron cuatro algoritmos de alineamiento de las secuencias en formato FASTQ y tres herramientas de análisis de llamado de variantes. El *pipeline* del protocolo se presenta en el anexo (Anexo A.)

La versión del genoma de referencia para realizar cada uno de los alineamientos fue la versión GRCH37/hg19.

El proceso de alineación de lecturas de ADN consistió en encontrar la coincidencia más probable de cada base de cada lectura pareada usando como blanco de alineamiento un genoma de referencia (Pacheco, González, & Algreto, 2015).

El problema de la alineación es complejo debido al análisis de metainformación y la gran cantidad de lecturas con la que se debe trabajar. Algunas bases de las lecturas cortas deben alinearse de forma inexacta al genoma referencia debido a varios factores como pequeños errores que se pueden presentar durante la secuenciación y a diferencias biológicas entre las muestras y el genoma en si de referencia como: los SNP u otras variaciones biológicas como inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos (Mullaney, Mills, Pittard, & Devine, 2010).

Se han desarrollado diferentes programas para tratar de resolver estos problemas, como los basados en Programación Dinámica (PD). Sin embargo, a pesar de ser muy exactos requieren demasiado tiempo de procesamiento (complejidad temporal) y elevados requisitos de almacenamiento (complejidad espacial) (Salavert, Tárraga, Medina, Dopazo, & Blanquer, 2015). Al mismo tiempo, se han desarrollado heurísticas para disminuir el tiempo de cómputo, sin afectar la calidad del alineamiento. Estos métodos, se clasifican en dos categorías: Algoritmos basados en tablas hash, que resuelven la complejidad temporal (Langmead, Trapnell, Pop, & Salzberg, 2009). Algoritmos basados en la comprensión ordenada por bloques (Burrows-Wheeler transform) (TBW) (Burrows & Wheeler, 1994), la

cual junto con otras estructuras de datos particulares forman los índices de FM (Ferragina & Manzini, 2000), que representan índices eficientes, para la realización de búsquedas exactas con bajo uso de memoria.

Opcionalmente, se pueden combinar estas técnicas para acelerar la alineación de lecturas, usando el menor espacio de memoria y en el menor tiempo posible. Una de las estrategias para la alineación es utilizar un acercamiento basado en dos pasos: la siembra y la extensión.

Durante la siembra, se encuentra una sub-cadena de la lectura corta de ADN que se alinee exactamente en uno o más lugares respecto a la cadena de referencia y para la extensión, la lectura completa es alineada de forma inexacta a una región alrededor de la siembra previamente localizada.

Muchos alineadores implementan la técnica de siembra y de extensión, tal es el caso de Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012), BWA-MEM (Li H., 2013), y NovoAlign (Novocraft, 2014) que se emplearon en esta tesis. Para la construcción de la siembra, dichos alineadores realizan un pre-cálculo para obtener los índices de búsqueda mediante los algoritmos basados en Tablas Hash o la TBW. Posteriormente, para la extensión implementan algoritmos basados en PD, tales como el Smith-Waterman (Smith & Waterman, 1981), Needleman-Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970) o el algoritmo de extensión usado en BLAST-like (Kent, 2002).

Adicionalmente, el software de alineación de nucleótidos genómicos de lectura corta (GSNAP) (T. D. Wu and S. Nacu, 2010), permite alinear lecturas desde 14 nt hasta longitudes arbitrariamente largas, para detectar empalmes Inter cromosómicos en lecturas individuales utilizando modelos probabilísticos o una base de datos de sitios de empalme conocidos.

1.4.4 Llamada de variantes

Para el análisis de llamado de variantes se utilizó kit de herramientas de análisis genómico HaplotypeCaller (GATK-HC), Samtools mpileup y Freebayes, con los cuales se generaron los archivos de variantes VCF de los datos procedentes de la secuenciación y que fueron comparados para tener un solo archivo de variantes VCF por cada muestra analizada.

En particular, FreeBayes es un detector de variantes genéticas usando modelos bayesianos diseñado para encontrar SNP (polimorfismos de un solo nucleótido), indels (inserciones y deleciones), MNP (polimorfismos de múltiples nucleótidos) y eventos complejos (eventos de inserción y sustitución compuestos), se basa en haplotipos, es decir, que llama variantes basadas en las secuencias literales de lecturas alineadas con un objetivo en particular, no en su alineación precisa. Este modelo es una generalización sencilla a diferencia de samtools y GATK que detectan o informan variantes basadas en alineaciones.

La implementación del cómputo para uso de los alineadores y el llamado de variantes se realizó mediante un *script* utilizando el lenguaje de programación bash.

1.4.5 Visualización de los datos

Para la visualización de los datos se empleó la herramienta interactiva IGV (*Integrative Genomics Viewer, Versión 2.8.0*) (James T. Robinson, et al, 2011; Helga Thorvalsdottir, et al., 2013)

1.4.6 Anotación de las variantes

La anotación de variantes detectadas se llevó a cabo mediante las herramientas bioinformáticas SnpEff (Cingolani P., et al., 2012) que permite predecir efectos en las variaciones genéticas y las alteraciones a nivel de aminoácidos, se buscaron alteraciones a nivel de nucleótidos, aminoácidos, que realiza una anotación genética y la predicción del efecto funcional en los genes y proteínas; y la herramienta ANNOVAR (Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H., 2010; Yang, H., & Wang, K., 2015) que incluye información adicional relevante y realiza la anotación funcional mediante distintas bases de datos públicas.

1.5 Resultados

Si bien el secuenciador *MiSeq* emplea *pipelines* internos (*Sequence Analysis Viewer* y *MiSeq Reporter*) hasta obtener los archivos de variantes VCF, se desarrolló un *pipeline ad hoc* para reanalizar los datos crudos del secuenciamiento implementando otras herramientas bioinformáticas comentadas en Materiales y métodos (algoritmos de alineamiento).

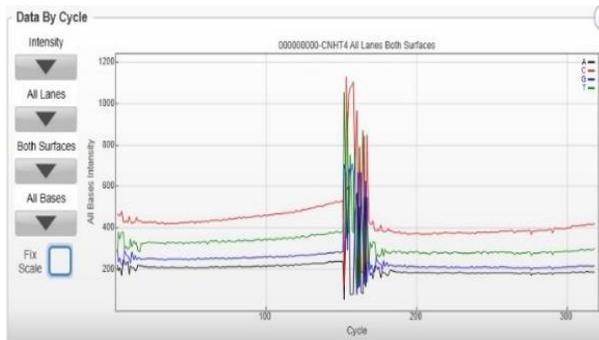
1.5.1 Control de calidad

Para el control de calidad de los datos se utilizaron softwares *Sequence Analysis Viewer*, FastQC y FASTP.

Sequence Analysis Viewer: el software proporcionó información acerca del proceso de secuenciación resumido en cuatro gráficos (figura 1.2).

En la figura 1.2-a) se observa que las líneas de intensidades son paralelas a lo largo de todos los ciclos excepto cuando se leen los índices, y que están dentro de los rangos establecidos por el fabricante, sin embargo, muestra un patrón inusual en los ciclos para ambos.

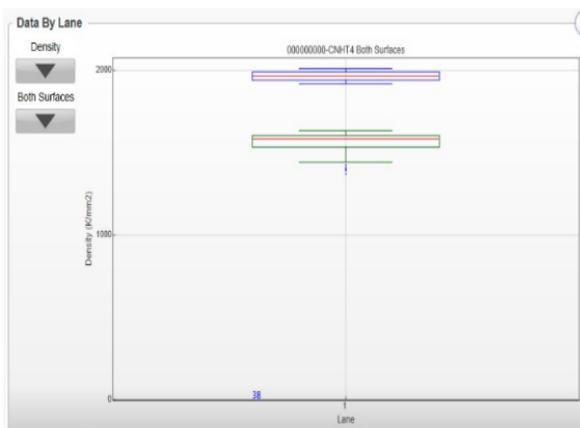
En la figura 1.2-b) se observa que el porcentaje de bases >Q30 es del 88.5%, el cual es un buen porcentaje de calidad según las especificaciones del fabricante, sin embargo, hay presencia de bases que están por debajo de este límite y el histograma muestra que un número significativo de bases con baja calidad.



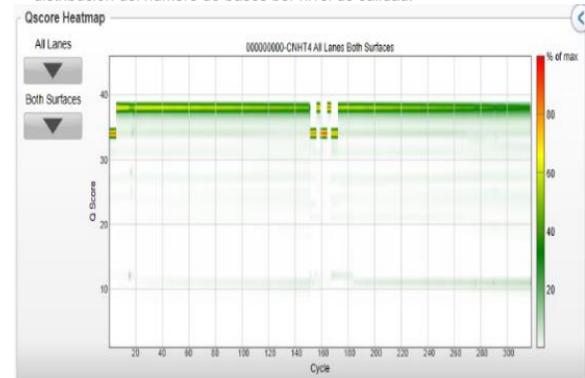
a) **Data By Cycle:** Muestra la progresión de la intensidad de las señales correspondientes a los cuatro nucleótidos a lo largo del corrido.



b) **Qscore Distribution:** la gráfica permite ver en forma de histograma la distribución del número de bases por nivel de calidad.



c) **Data By Lane:** esta grafica permite visualizar la densidad de



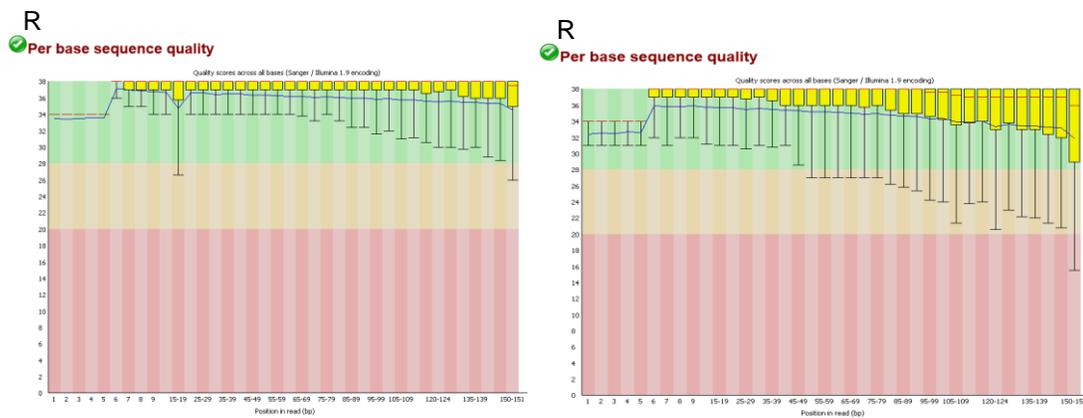
d) **Qscore Heatmap:** la gráfica permite ver el Q-score de las bases secuenciadas por ciclo

Figura 1.2. Resultados Sequence Analysis viewer

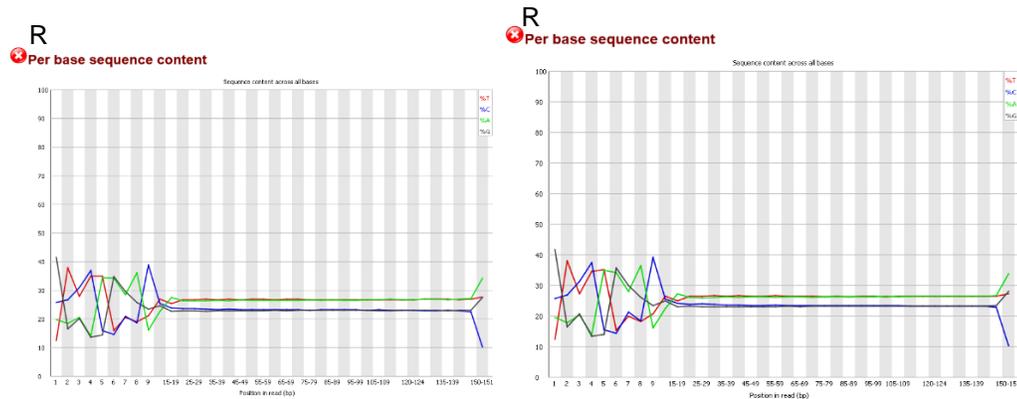
En la figura 1.2-c) el histograma azul representa la densidad del *clúster* en bruto, mientras que el histograma verde representa a aquellos *clústeres* que pasaron el filtro de calidad. En las especificaciones de Illumina, la densidad de *clúster* bruta debe estar entre 1200-1400 K/mm². Para nuestro caso la densidad de *clúster* es la esperada para una celda V3, es decir que se está empleando toda la superficie de la celda.

Y en la figura 1.2-d) muestra que la distribución de calidades se realiza de forma óptima a lo largo de las lecturas en ambos *reads*, que permite deducir que se realizó una buena indexación de las lecturas en ambos *reads*.

- **FastQC:** Las estadísticas del programa FastQC mostraron desviaciones semejantes en todas las muestras, se puede observar los resultados de uno de los casos en la figura 1.3.



a) Gráfico de calidad de secuencia por

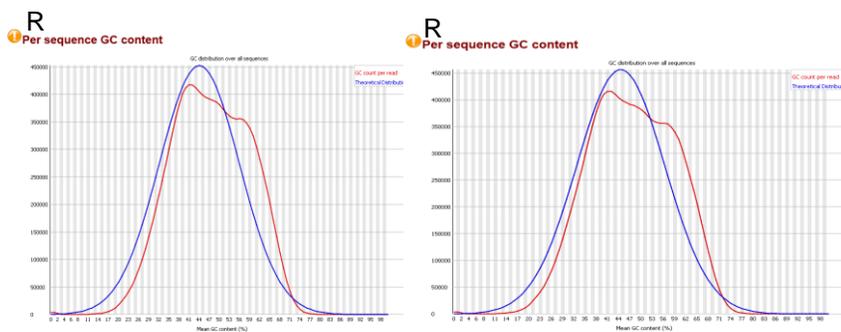


b) Gráfico contenido de bases por secuencia (A, G, T, C)

Figura 1.3. Revisión de calidad de los datos crudos con el software FasQC

En la figura 1.3-a) se observa la distribución de los valores de calidad en casa posición, la barra amarilla representa los valores de los Inter cuantiles (25-75%), los brazos hacia debajo de la caja amarilla representan el 90% de los datos para esa posición, la línea azul corresponde a la media y la roja a la mediana. La calidad de las bases secuenciadas en el Red1y Red2 están por encima de $Q > 30$, que es un buen valor de calidad.

En la figura 1.3-b) se observa que en todas ellas se observa un enriquecimiento de citocina en las primeras posiciones de lectura. Por medio de esta grafica también se pueden observar la presencia de adaptadores u otros artefactos.



a) Gráfico del contenido de guanina y citocina por secuencia

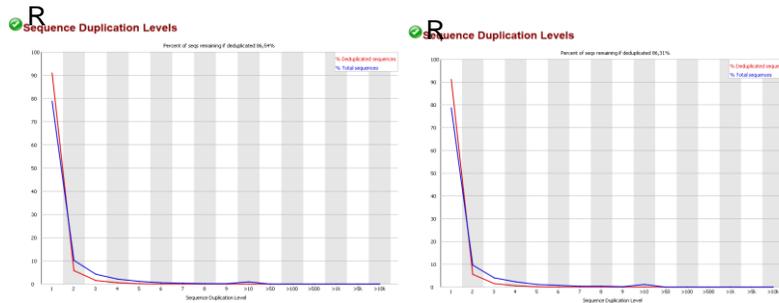


Figura 1.4. Contenido de guanina, citocina y niveles de duplicación por secuencia

- Contenido de GC por secuencia.

El contenido de guanina citocina en la figura 4 a) es mayor al esperado, esto debido al secuenciamiento realizado sobre el exoma que es habitualmente rico en contenido de GC.

En cuanto a los niveles de duplicación de secuencias este alrededor del 12.72% en los dos reds, por debajo del límite aceptable (20%), figura 4 b).

- **Fastp:** arroja un reporte general antes y después de realizar los filtros sobre los archivos *fastq* que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 1. Reporte análisis con Fastp

iniciación:	paired end (151 cycles + 151 cycles)
Longitud media antes del filtro:	139bp, 139bp
Longitud media después del filtro:	139bp, 139bp
Tasa de duplicación:	1033644%
Inserto del tamaño del pico:	150
Antes del filtro	
Total reads:	25.878850 M
Total bases:	3.618581 G
bases Q20:	3.478764 G (96.136147%)
bases Q30:	3.261247 G (90.125028%)
contenido GC:	46644244%
Después del filtro	
Total reads:	25.300776 M
Total de bases:	3.524553 G
bases Q20:	3.414347 G (96.873188%)
bases Q30:	3.215039 G (91.218342%)
contenido GC:	46655056%
Resultado del filtro	
reads que pasaron el filtro:	25.300776 M (97.766230%)
reads con baja calidad:	577.868000 K (2.232974%)
reads con demasiadas N:	50 (0.000193%)
reads demasiado cortas:	156 (0.000603%)

En la tabla 1.1, se observa que antes y después de realizar el análisis con *fastp* se sigue manteniendo el 96% de bases con una calidad de Q20 y 90% con Q30.

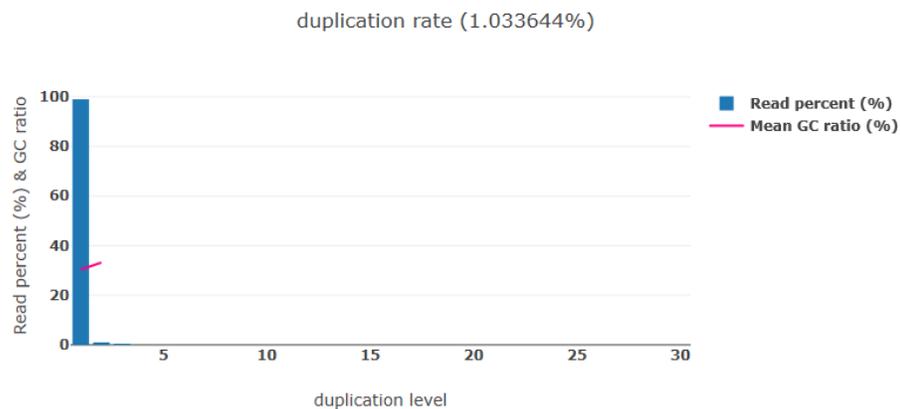


Figura 1.5. Análisis de duplicación con fastp

La tasa de duplicación que muestra en la figura 1.5, está en un 1% que es muy óptima para la calidad de la secuenciación.

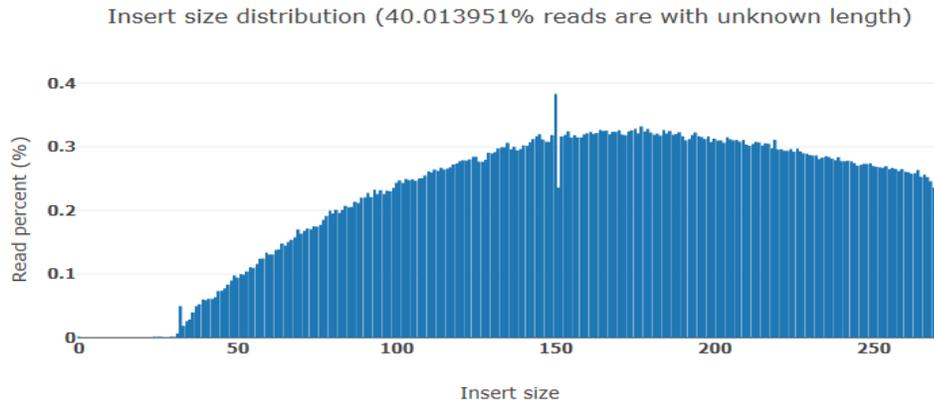


Figura 1.6. Estimación del tamaño del inserto con fastp

En figura 1.6, se muestra la estimación del tamaño del inserto, la cual se basa en un análisis de superposición de extremos emparejados y hay un 40,013951% de lecturas que no se superponen. Los pares de lectura no superpuestos pueden tener un tamaño de inserción <30 o >272, o contener demasiados errores de secuenciación para ser detectados como superpuestos.

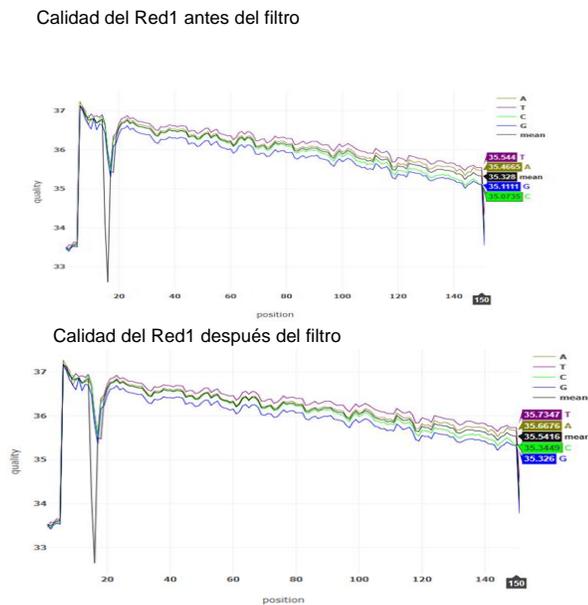


Figura 1.7. Calidad del *red* antes y después del filtro con fastp

1.5.2 Análisis de salida de secuencia

En la figura 1.8, se muestra la calidad de lectura1 antes y después del filtro, se observa que hay una mejoría en la calidad de lectura1 después del filtro.

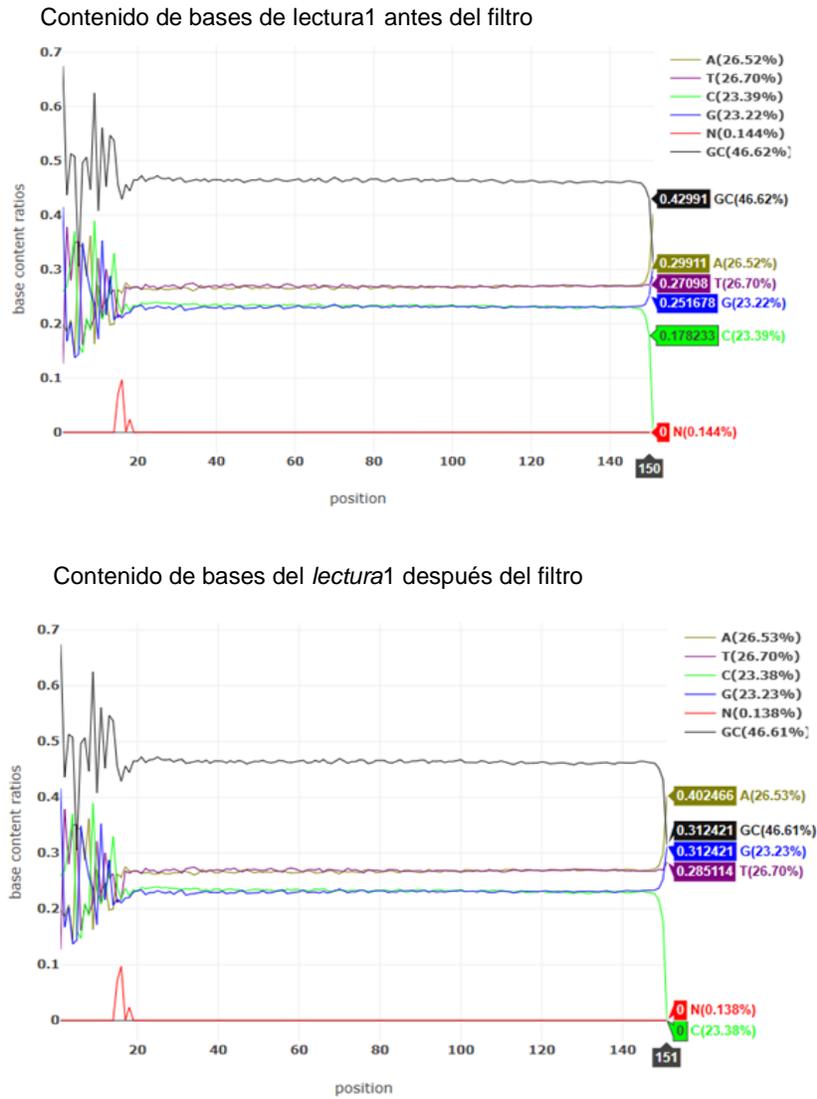


Figura 1.8. Contenido de bases del *lectura1* antes y después del filtro con fastp

En la figura 1.9, se muestra el contenido de bases del *lectura2* antes y después del filtro y no se observan cambios significantes.

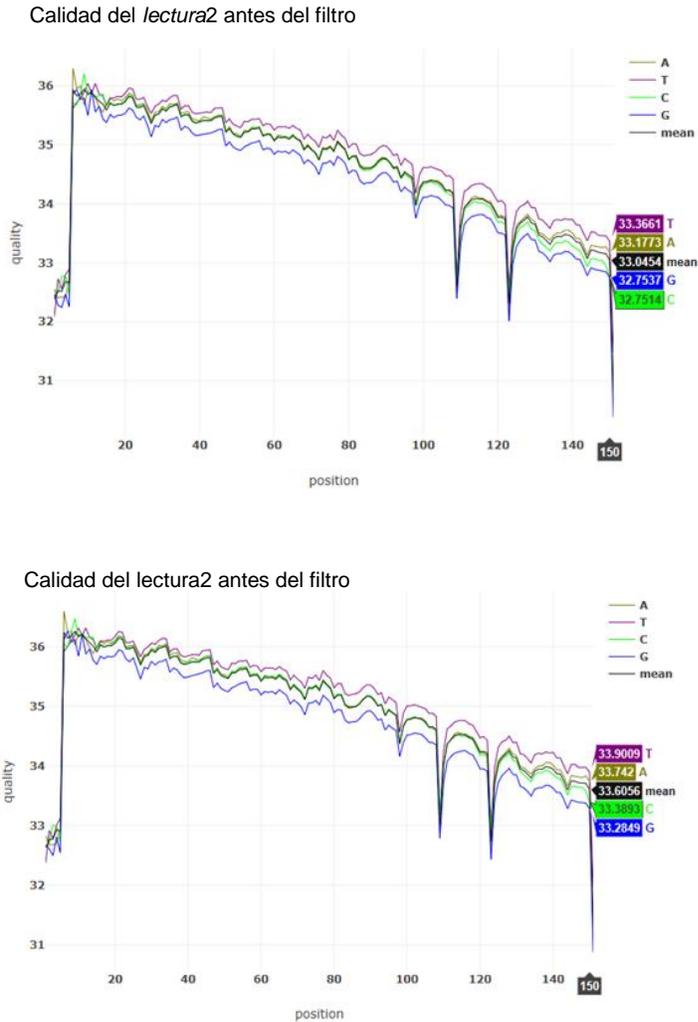
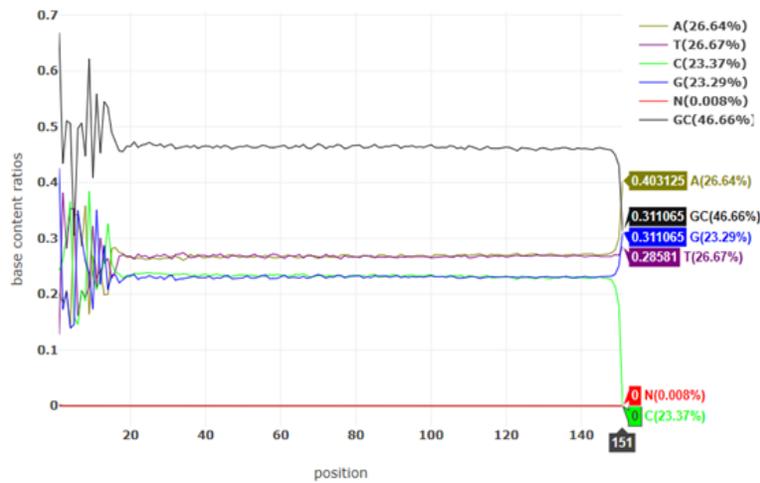


Figura 1.9. Calidad de *lectura2* antes y después del filtro con fastp

En la figura 1.9, respecto a la calidad del *lectura2* antes y después del filtro no se observan diferencias significativas; igualmente sucede lo mismo respecto al contenido de bases de la misma lectura en la figura 1.10.

Contenido de bases del lectura2



Contenido de bases del lectura2 antes del filtro

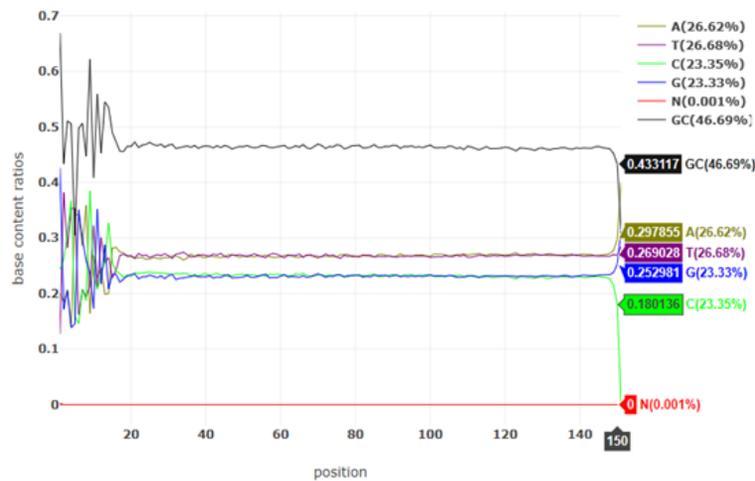


Figura 1.10. Contenido de bases de lectura2 antes y después del filtro con fastp

1.5.3 Importancia de aplicar más de un algoritmo de alineación y llamado de variantes

Después de realizar el análisis de calidad de cada uno de los archivos *Fastq*, se realizó el mapeo de las lecturas contra la secuencia del genoma de referencia conocido, previamente procesado e indexado según los requerimientos de cada alineador para acelerar las búsquedas de los algoritmos de alineamiento mejor adecuado.

Si bien *MiSeq Reporter*, emplea el alineador de secuencias BWA-Bactrack, para el *pipeline ad hoc* se utilizaron otros cuatro algoritmos de alineamiento: Bowtie2, BWA-MEM, GSNAP y NOVOALING.

Se planteo el uso de varios algoritmos ya que si se utiliza uno solo podría llevar a la pérdida de variante de potencial interés no detectadas.

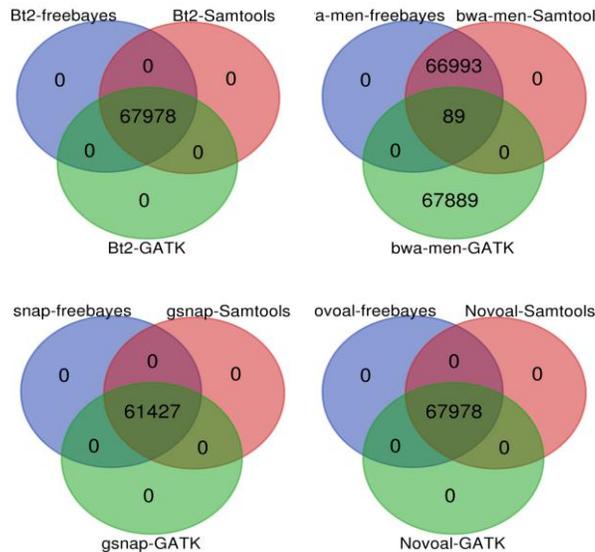


Figura 1.11. Diagrama de venn de comparación del llamado de variantes por cada uno de los algoritmos de alineamiento

En la figura 1.11, se observa que con *Bowtie2*, *GSNAP* y *Novoaling* el llamado de variantes con *GATK*, *Freebayes* y *Samtools* coincidieron con el llamado de variantes, en cuanto a *BWA-MEN* solo coincidieron en 89 variantes, entre *freebayes* y *Samtools* 66993 variantes, en *GATK* únicamente 67889 variantes.

1.5.4 Visualización de archivos vcf con el software IGV

La visualización de los archivos *vcf* con *IGV*, resulta de suma importancia, ya que en algunos casos permite inspección manual observar variantes o en algunos casos deleciones o variantes que no han sido detectadas en el llamado de variantes. En la figura 1-8, se observa al inicio una vista general de las secuencias alineadas al genoma de referencia donde se puede ver cuál ha sido su profundidad, luego observamos en más detalle que bases son las que están presentes, en el ejemplo observamos un cambio de una C por una T en la posición 2794937 del cromosoma 2 en el gen *CACNA1C*.



Figura 1.12. Vista de las secuencias de genes con IGV

1.5.5 Anotación de variantes y selección de genes asociados a muerte súbita cardiaca

La anotación de variantes se llevó a cabo con la combinación del software *SnpEff*, *ANNOVAR* y posteriormente se realizó un filtro de 84 genes asociados a muerte súbita cardiaca por canalopatías, seguido de un filtro por frecuencias mínimas del EXAC, genomAD, Exome AD y proyecto de 1000g; y finalmente el filtro de variantes no sinónimas, esto permitió reducir la selección de variantes de interés para la investigación (Tabla 1.2).

Al realizar la anotación de variantes con la herramienta *ANNOVAR* se pueden utilizar diferentes bases de datos como *RefSeq* que proporciona información sobre el gen en el que se encuentra la variante y su localización (exón, intrón, *splicing*, UTR), diferentes transcritos en que aparece, tipo de variante (sinónima, no sinónima), el cambio de aminoácido que produce; *GenomicSuperDups* que permite anotación por región al detectar presencia de duplicaciones entre otras coordenadas cromosómicas; anotación por filtro mediante *dbSNP*, *ExAC* (*Exome Aggregation Consortium*), proyecto de mil genomas, *genome and exome ID*, *ClinVar*, entre otras, adicionalmente permite utilizar predictores *in silico* como: *SIFT*, *PolyPhen2*, *LRT*, *Mutation Taster*, *MutationAssesor*, *FATHMM*, *MetaSVM* y de la conservación de residuos entre especies (*GERP++*, *PhyloP*, *SiPhy*), Tabla 1.4.

1.5.6 Variantes detectadas

Una vez realizado los diferentes filtros teniendo en cuenta un $MAF \leq 0.05$, para frecuencias poblacionales en las bases de datos de *EXAC*, mil genomas, *Exome-AD* y *Genome-AD*, y siguiendo las recomendaciones para clasificar las variantes detectadas según la ACMG/AMP (2018). Adicionalmente, se verificó que ninguna de las variantes asociadas a enfermedades cardiovasculares se encontrara en los controles. Se hallaron un total de 21 variantes en 13 genes en los seis casos, que se presentan en la tabla 1.2. En el gen *TTN* se encontraron 8 variantes, seguido por el gen *ANK3* con 3 variantes. Se encontraron variantes homocigotas en los genes *CAV3*: p.Y62C; *ANK2*: p.G2212S y *KCNH2*: p.R92P. Las demás variantes fueron heterocigotas.

Tabla 1.2. Variantes seleccionadas para análisis acorde a las frecuencias poblacionales con $MAF \leq 0.05$

Caso	Gen	rsID	Func	Variante Genética	Cambio AA	Zigotidad	MAF ≤ 0.05			
							ExAC	1000g	Exome	Genome
1	TRDN	rs372169818	exon2	c.G196A	p.V66I	het	0,04971	0.000199681	0,06909	Ausente
	TTN	rs746749916	exon154	c.G48780T	p.W16260C	het	0,008302	Ausente	0,01633	Ausente
	TTN	.	exon186	c.T73979C	p.I24660T	het	Ausente	Ausente	0,004069	3.23e-05
	CAV3	rs753990961	exon2	c.A185G	p.Y62C	hom	0,008264	Ausente	0,004063	Ausente
1, 2	DSP	rs78652302	exon24	c.A3701T	p.E1234V	het	0.0095	0.00399361	0.0095	0.0112
2	TTN	rs776534823	exon27	c.G5905A	p.A1969T	het	0,008243	Ausente	0,008139	3.23e-05
	TTN	rs181189778	exon64	c.T16495A	p.S5499T	het	0.0003	0.000199681	0.0003	0.0003
3, 5	DSG2	rs142841727	exon15	c.T2759G	p.V920G	het	0.0032	0.00319489	0.0036	0.0033
3	TRPM4	rs138603244	exon17	c.A2365G	p.S789G	het	0.0009	0.00319489	0.0005	0.0020
	AKAP9	rs2230768	exon18	c.G4841A	p.R1614Q	het	0.0023	0.00898562	0.0018	0.0084
	ANK3	rs201547988	exon37	c.C11159T	p.T3720M	het	0.0002	0.000199681	0.0002	0.0002
	ANK3	rs41274676	exon37	c.C4465T	p.P1489S	het	0.0019	0.000798722	0.0017	0.0019
	TTN	rs759415579	exon168	c.C67100T	p.P22367L	het	0,008287	Ausente	0,03257	Ausente
4	ANK2	rs61734478	exon38	c.G6634A	p.G2212S	hom	0.0047	0.0219649	0.0037	0.0140
	CACNA1C	rs185788586	exon43	c.C5689T	p.R1897C	het	0.0075	0.00858626	0.0101	0.0018
5	TTN	rs75686037	exon27	c.C5093T	p.P1698L	het	0.0063	0.00698882	0.0072	0.0026
6	MYBPC3	rs11570112	exon27	c.C2992G	p.Q998E	het	0.0052	0.0061901	0.0072	0.0021
	KCND3	rs186194682	exon7	c.G1712A	p.R571H	het	0,04701	0.000399361	0,04917	0,03232
	TTN	rs541464855	exon154	c.C49424A	p.P16475Q	het	Ausente	0.000199681	Ausente	0,03236
	KCNH2	.	exon2	c.G275C	p.R92P	hom	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	ANK3	rs140463162	exon37	c.G6955A	p.D2319N	het	0.0028	0.00139776	0.0033	0.0033

En la tabla 1.3, se observa el significado clínico de cada una de las variantes. Se encontraron 7 variantes asociadas a daños estructurales del corazón como son las miocardiopatías, se encontraron 4 variantes asociadas a canalopatías cardíacas como son: síndrome QT largo, Síndrome de Brugada y Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, adicionalmente se observa que tres variantes (DSP : p.E1234V; DSG2:

p.V920G y MYBPC3: p.Q998E) presentan conflicto de interpretación de patogenicidad, estas variantes asociadas a Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho, Miocardiopatía hipertrófica y Miocardiopatía dilatada 1G . Adicionalmente, se encontró nueve variantes de significado incierto.

Por otra parte, se encontró en el gen KCNH2: p.R92P, que es una variante de interacción estructural, en los genes MYBPC3: p.Q998E y KCND3: p.R571H variantes *missense* y de la región de *splicing*, las demás variantes fueron de tipo *missense*.

Tabla 1.3. Significado clínico de las variantes encontradas en cada uno de los casos.

Casos	Change AA	CLNDN	CLNSIG	Consecuencia
1	p.V66I	CPVT	Significado incierto	missense_variant
	p.W16260C	-----	Significado incierto	missense_variant
	p.I24660T	-----	Significado incierto	missense_variant
	p.Y62C	-----	Significado incierto	missense_variant
1, 2	p.E1234V	ARVC	Conflicto de interpretación de	missense_variant
2	p.A1969T	DCM	Significado incierto	missense_variant
	p.S5499T	DCM	Significado incierto	missense_variant
3, 5	p.V920G	ARVC	Conflicto de interpretación de	missense_variant
3	p.S789G	Bloqueo cardíaco familiar	Benigna	missense_variant
	p.R1614Q	LSQT, Romano-Ward-S	Benigna, Ligeramente benigna	missense_variant
	p.T3720M	-----	Significado incierto	missense_variant
	p.P1489S	-----	Significado incierto	missense_variant
	p.P22367L	-----	Significado incierto	missense_variant
4	p.G2212S	LSQT	Benigna	missense_variant
	p.R1897C	LSQT, BrS	Benigna, Ligeramente benigna	missense_variant
5	p.P1698L	HCM, DCM	Benigna, Ligeramente benigna	missense_variant
6	p.Q998E	HCM, DCM	Conflicto de interpretación de	missense variant &
	p.R571H	-----	Significado incierto	missense variant
	p.P16475Q	-----	Significado incierto	missense_variant
	p.R92P	-----	Significado incierto	structural interaction
	p.D2319N	-----	Ligeramente benigna	missense variant

En la tabla 1.4, se observa que la predicción *in silico* de las variantes analizadas, con cada uno de los algoritmos *SIFT*, *PolyPhen2*, *Mutation Taster*, *LRT*, *Mutation Assesor*, *FATHMM*, *MetaSVM*, *RadialSVM*, *LR*, *CADD*, *GERP++*, *PhyloP* y *SiPhy* en algunos casos es muy heterogénea (Tabla 1.4) debido al tipo de algoritmo que maneja cada predictor.

Tabla 1.4. Lista de SNPS analizados por *SIFT*, *PolyPhen2*, *Mutation Taster*, *LRT*, *Mutation Assesor*, *FATHMM*, *MetaSVM*, *RadialSVM*, *LR*, *CADD*, *GERP++*, *PhyloP* y *SiPhy*.

Caso	Gen	Cambio AA	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	Mutation Taster	Mutation Assesor	FATHMM
1	TRDN	p.V66I	T	D	D	D	D	L	T
	TTN	p.W16260C	D	D	D	.	D	H	D
	TTN	p.I24660T	D	P	P	.	D	L	T
	CAV3	p.Y62C	D	D	D	D	D	M	D
1, 2	DSP	p.E1234V	T	D	D	D	N	L	T
2	TTN	p.A1969T	D	D	D	.	D	L	T
	TTN	p.S5499T	D	D	D	.	D	M	T
3, 5	DSG2	p.V920G	T	P	B	N	N	L	T
3	TRPM4	p.S789G	T	D	P	D	D	M	T
	AKAP9	p.R1614Q	T	P	B	N	N	N	T
	ANK3	p.T3720M	D	D	P	N	D	L	T
	ANK3	p.P1489S	D	D	D	D	D	M	T
	TTN	p.P22367L	D	D	D	.	D	H	T
4	ANK2	p.G2212S	.	D	B	N	D	L	T
	CACNA1C	p.R1897C	T	D	P	N	N	N	T
5	TTN	p.P1698L	D	D	D	.	D	M	T
6	MYBPC3	p.Q998E	D	D	D	.	D	M	T
	KCND3	p.R571H	D	D	D	D	D	M	D
	TTN	p.P16475Q	D	D	D	.	D	H	T
	KCNH2	p.R92P	T	D	D	N	D	M	D
	ANK3	p.D2319N	T	D	P	D	D	M	T
Caso	Gen	Cambio AA	Radial SVM	LR	CADD phred	GERP++ RS	phyloP 46way placental	SiPhy 29way logOdds	Impacto
1	TRDN	p.V66I	T	T	19.57	5.82	2753	20097	Moderado
	TTN	p.W16260C	D	D	12.74	5.87	2770	20224	Moderado
	TTN	p.I24660T	T	T	14.53	5.59	2250	11170	Moderado
	CAV3	p.Y62C	D	D	17.36	3.44	758	9788	Moderado
1, 2	DSP	p.E1234V	T	T	20.4	5.2	1953	15091	Moderado
2	TTN	p.A1969T	T	T	12.34	5.12	2387	18559	Moderado
	TTN	p.S5499T	T	T	14.29	6.03	2308	16558	Moderado
3, 5	DSG2	p.V920G	T	T	13.78	2.5	438	6805	Moderado
3	TRPM4	p.S789G	T	T	16.5	5.09	2047	9337	Moderado
	AKAP9	p.R1614Q	T	T	19.25	1.43	319	7685	Moderado
	ANK3	p.T3720M	T	T	16.37	5.3	2468	18955	Moderado
	ANK3	p.P1489S	D	D	17.55	5.69	2684	19799	Moderado
	TTN	p.P22367L	D	D	19.08	6.03	2854	20567	Moderado
4	ANK2	p.G2212S	T	T	13.77	3.85	809	11304	Moderado
	CACNA1C	p.R1897C	T	T	17.08	4.26	2202	11012	Moderado
5	TTN	p.P1698L	T	T	11.85	5.05	2363	18391	Moderado
6	MYBPC3	p.Q998E	T	T	21.2	4.1	1311	14449	Moderado
	KCND3	p.R571H	D	D	28.7	5.63	2814	19639	Moderado
	TTN	p.P16475Q	D	D	18.28	5.55	2608	19497	Moderado
	KCNH2	p.R92P	D	D	20.7	3.49	811	11994	Alto
	ANK3	p.D2319N	T	T	23.8	5.94	2816	20359	Moderado

De las variantes reportadas, por ejemplo, se encontró que el análisis con *SIFT* (12) son perjudiciales, *Polyphen2* (18) probablemente patogénicos, lo mismo sucede con *Mutation*

Taster. En análisis con CADD con un punto de corte de 20, las variantes de los genes ANK3, KCNH2, KCND3, MYBPC3 y DSP se clasificaron como variantes dañinas. Para los algoritmos de predicción de conservación de la secuencia, se encontró que para *GEPP++RS* con punto de corte mayor a 4.4, se encontró que en siete variantes no hay conservación de la secuencia, en el resto si hay conservación de secuencia, y para *PhyloP* y *SiPhy* hay conservación de la secuencia en todas las variantes.

1.5.7 Interpretación de variantes en contexto de los casos y su información complementaria clínica-forense

Caso 1

Se trata de un adolescente de 13 años de edad, presenta una variante en DSP (c.A3701T p.E1234V), heterocigota, asociada a ARVC, sin embargo, en la significación clínica aparece con conflicto de interpretación de patogenicidad. DSP, cuya proteína desmosómica (desmoplaquina) interactúa con la desmina intermedia en los filamentos de los cardiomiocitos para formar fuertes adherencias entre las células (D. Garrod, M. Chidgey, 2008), lo que proporciona fuerza y estabilidad a los tejidos.

La óptima adhesión entre las células puede dar lugar a la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC), que se caracteriza por una sustitución fibro-grasa del miocardio que se va deteriorando con el tiempo, aumentando el riesgo de latidos cardíacos anormales (arritmia) y muerte súbita (Mcknally E., et al. 2005; D. Garrod, M. Chidgey, 2008; Poloni G., et al., 2016). El mecanismo de la enfermedad asociada con DSP es a través de haploinsuficiencia, por cambio en el marco de lectura y variantes sin sentido antes del exón final (Choi H-J., et al., 2002).

Aunque la ARVC puede no causar ningún síntoma en sus primeras etapas, las personas afectadas aún pueden estar en riesgo de muerte súbita, especialmente durante el ejercicio extenuante. Cuando se presentan síntomas, por lo general incluyen una sensación de aleteo o palpitaciones en el pecho, mareos y desmayos (síncope). Con el tiempo, la ARVC también puede causar dificultad para respirar e hinchazón anormal en las piernas o el

abdomen. Si el miocardio se daña gravemente en las últimas etapas de la enfermedad, puede provocar insuficiencia cardíaca (Quarta G., et al., 2016).

Una variante en TRDN (c.G196A: p.V66I), heterocigota, missense, de impacto moderado, asociada a taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC), de significado incierto. TRDN codifica una proteína de membrana integral que se encuentra en el músculo cardíaco y esquelético, juega un papel en el acoplamiento de excitación-contracción del músculo esquelético como parte del complejo de liberación de calcio y es necesaria para la fuerza muscular esquelética normal, variantes en este gen están asociadas a arritmias potencialmente mortales y paros cardíacos, predominantemente en personas jóvenes (Napolitano C., et al., 2004) las mutaciones se heredan con un patrón autosómico recesivo en forma homocigota o heterocigota compuesta (Hancox, J.C., et al., 2017).

El TRDN entre sus vías relacionadas se encuentran el transporte por canales iónicos y la conducción cardíaca. Contribuye a la regulación de la liberación luminal de Ca^{2+} a través de los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico RYR1 y RYR2, un paso clave para desencadenar la contracción del músculo esquelético y cardíaco. Requerido para la organización normal de la unión de la tríada, donde los túbulos T y las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico están en estrecho contacto (por similitud). Requerido para la fuerza muscular esquelética normal. Juega un papel en el acoplamiento de excitación-contracción en el corazón y en la regulación de la frecuencia de los latidos del corazón (Roux-Buisson N., et al., 2012).

Dos variantes en TTN (c.G48780T: p.W16260C y c.T73979C: p.I24660T), missense, heterocigotas, sin sentido y de impacto moderado. TTN codifica para la proteína titina, es una proteína sarcomérica que juega un papel importante en el músculo cardíaco y esquelético. Está codificada por un único gen, ubicado en el brazo largo del cromosoma 2, entre sus funciones esta proporcionar estructura, flexibilidad y estabilidad a los sarcómeros. La titina interactúa con otras proteínas musculares, incluidas la actina y la miosina, para mantener los componentes de los sarcómeros en su lugar mientras los músculos se contraen y relajan. La titina también contiene una región similar a un resorte que permite que los músculos se estiren (LeWinter MM, et al. 2007; Savarese M, et al., 2016).

La TTN al ser uno de los genes con mayor número de exones del genoma humano, alcanzando los 364 exones, sufre un intenso procesamiento alternativo, que da lugar a la producción de diversas isoformas de la proteína titina, complicando aún más el análisis del efecto de las diferentes variantes. Es así como las variantes sin sentido, variantes que alteran la pauta de lectura o en los sitios del procesamiento del ARN mensajero que alteran las principales isoformas son las que presentan más riesgo de provocar cardiomiopatía dilatada (Norton N, et al., 2013; Chauveau C. et al., 2014; Roberts AM, et al., 2015).

Una variante en CAV3 (c.A185G: p.Y62C), homocigota, missense y de significado incierto. CAV3, es una proteína responsable de la formación de las caveolas y de andamiaje, son grupos sarcolemales altamente organizados que influyen en la diferenciación muscular temprana, la señalización y la homeostasis del Ca^{2+} (Ullrich ND., et al., 2011), se encargan de organizar otras moléculas que son importantes para la señalización celular y el mantenimiento de la estructura celular (Gazzerro E., et al., 2010).

Estas moléculas incluyen las proteínas que forman los canales de sodio, que transportan átomos de sodio cargados positivamente (iones de sodio) a las células. Los canales de sodio juegan un papel clave en la capacidad de una célula para generar y transmitir señales eléctricas. En el músculo cardíaco, los canales de sodio están involucrados en el mantenimiento del ritmo normal del corazón (Vatta M. et al., 2006). Adicionalmente, interactúa directamente con las subunidades alfa de la proteína G y puede regular funcionalmente su actividad. También puede regular los canales de potasio activados por voltaje (Vaidyanathan R, et al., 2013).

Desempeña un papel en el mecanismo de reparación del sarcolema tanto del músculo esquelético como de los cardiomiocitos que permite volver a sellar rápidamente las membranas rotas por estrés mecánico. Variantes encontradas en esta proteína están asociadas a miocardiopatía hipertrófica familiar (CMH) (Hayashi et al. 2004), síndrome de QT largo 9 (LQT9) (Vatta et al. 2006), síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL) (Cronk et al. 2007).

Adicionalmente, se han definido quince tipos de síndrome de QT largo en función de su causa genética, y cardiomiopatías (Alders M, et al. 2003; Bohnen MS, et al. 2017; Modell SM, et al. 2012; Nakano Y, Shimizu W. 2016; Fernández-Falgueras A, et al. 2017; Magi,

S., et al. 2017; Song, J., et al. 2017). Algunos tipos de síndrome de QT prolongado implican otras anomalías cardíacas o problemas con sistemas corporales adicionales.

Como se puede observar las variantes patogénicas en este gen muestran diferentes características clínicas y modos de herencia, mutaciones de sentido erróneo pueden conducir a una afectación cardíaca como miocardiopatías y arritmias, es necesario realizar estudios en un mayor número de muestras para evaluar el papel de las variantes de CAV3 en la enfermedad cardíaca y realizar más estudios de la función de este gen para revelar los mecanismos patogénicos detrás de las características clínicas cardíacas de las caveolinopatías.

Revisando los antecedentes antemortem del joven, el cual presento bradicardia en proceso de reanimación post apendicetomía, encefalopatía isquémica y arritmia cardíaca durante intervención quirúrgica y que tres días posterior fallece, se propone que pueden correlacionarse con las variantes encontradas en el presente estudio, y que posiblemente ayudaron a desencadenar arritmias que terminaron con la muerte del joven.

Caso 2

Lactante masculino de dos meses de nacido, clasificado como muerte súbita del lactante. Presenta dos variantes en TTN (c.G5905A: p.A1969T y c.T16495A: p.S5499T), heterocigotas, nonsense, de impacto moderado, de significado incierto, asociadas a miocardiopatía diabética tipo 2 y miocardiopatía dilatada 1G. Adicionalmente, la variante DSP (c.A3701T p.E1234V), reportada también para el caso I, heterocigota, sin sentido, de impacto moderado, asociado a ARVC, miopatía diabética tipo 2 y fenotipo cardiovascular, presenta conflicto de interpretación de patogenicidad.

No se cuenta con antecedentes clínicos antemortem para poder realizar una correlación de las variantes encontradas en los dos genes con la causa de muerte, pero existe probabilidad que estas mutaciones coadyuvarán a la casusa de muerte, sobre todo por ser variantes de significado incierto y que por la predicción in silico son catalogadas como patogénicas (TTN) y en el caso de la encontrada en el DSP, que presenta conflicto de interpretación de patogenicidad.

Una variante en DSG2 (c.T2759G:p.V920G), heterocigota, missense, asociada a miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y presenta conflicto de interpretación

de patogenicidad. El gen DSG2, codifica un miembro de la familia de desmogleínas y la superfamilia de proteínas de moléculas de adhesión celular de cadherinas. Las desmogleínas son componentes de glicoproteína transmembrana que se unen al calcio de los desmosomas, uniones célula-célula de cardiomiocitos y células epiteliales (Patel DM, Gree KJ. 2014). Las mutaciones en este gen se han asociado con la displasia arritmogénica del ventrículo derecho (Awad MM, et al. 2006), Miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (Kulikova O, 2021).

Se ha encontrado que las mutaciones en DSG2 con pérdida de función hemi y homocigota causan miocardiopatía arritmogénica recesiva de inicio temprano, que podrían explicar algunos casos de muerte súbita sin antecedentes familiares y o genéticos evidentes (Brodehl A, 2021). Adicionalmente, Para algunas de las mutaciones sin sentido conocidas de DSG2, se han descrito defectos de escisión del predominio, las propiedades de adhesión y la localización celular (Gaertner A.,2012).

Caso 3

Lactante masculino de 3 meses, diagnosticado con muerte súbita, sin antecedentes ante mortem. Se detecto una variante en TRPM4 (TRPM4:c.A2365G:p.S789G) heterocigota, sin sentido de impacto moderado, asociada a bloqueo cardíaco familiar progresivo tipo 1B. TRPM4 proporciona instrucciones para producir una proteína llamada miembro 4 de la subfamilia M del canal de cationes modulado por voltaje y activado por Ca²⁺ (Nilius et al., 2005).

Esta proteína actúa como un canal, abriéndose para permitir la entrada de Na⁺ y salida de K⁺ en la célula (Launay et al., 2002; Ramsey et al., 2006) realizando la repolarización de la membrana. El canal TRPM4 está incrustado en la membrana externa de las células de todo el cuerpo, pero abunda en las células del corazón (cardíacas), se ha encontrado que participa en perturbaciones eléctricas después de isquemia cardíaca y episodios de reperfusión debido a su sensibilidad a Ca²⁺ y ATP (Kalogeris et al., 2012).

Los canales TRPM4 desempeñan un papel importante en la señalización del inicio de cada latido del corazón, la coordinación de las contracciones de las cámaras superior e inferior del corazón y el mantenimiento de un ritmo cardíaco normal.

Se ha encontrado que algunas mutaciones en el gen TRPM4 causan un bloqueo cardíaco familiar progresivo. Esta condición altera el latido normal del corazón y puede provocar desmayos (síncope) o paro cardíaco repentino y muerte. El TRPM4 las mutaciones genéticas cambian los componentes básicos de una sola proteína (aminoácidos) en el canal TRPM4.

Los canales alterados tienen una mayor actividad en la membrana celular, lo que probablemente altera la capacidad de la célula para generar señales eléctricas debido al aumento del flujo de cationes. Las células cardíacas con estos canales alterados tienen dificultad para producir y transmitir señales eléctricas que coordinan los latidos cardíacos normales. La interrupción de esta señalización provoca un bloqueo cardíaco. La muerte de estas células cardíacas deterioradas con el tiempo puede provocar una acumulación de tejido cicatricial (fibrosis), lo que empeora el bloqueo cardíaco (Hu Y., et al. 2021; Dong Y., et al. 2021).

Estudios recientes también han relacionado otras variantes genéticas del gen TRPM4 con: el bloqueo cardíaco familiar progresivo tipo 1 (PFHB1) (Kruse et al., 2009 ; Daumy et al., 2016; Palladino A, et al. 2022), la enfermedad de conducción cardíaca aislada (ICCD) (Liu et al., 2010), bloqueo auriculoventricular (BAV) (Stallmeyer et al., 2012 ; Syam et al., 2016), bloqueo de rama derecha (BRD) (Stallmeyer et al., 2012) y síndrome de Brugada (BrS) (Liu et al. , 2013 ; Gualandi et al., 2017).

Se demostró que varias variantes de TRPM4 vinculadas a enfermedades cardíacas hereditarias causan ganancia o pérdida de función de la actividad del canal. Sin embargo, los detalles moleculares de estas alteraciones y cómo las variantes de ganancia y pérdida de función pueden conducir a defectos de conducción aún no se conocen bien (Hu Y., et al. 2021; Dong Y., et al. 2021; Palladino A, et al. 2022).

Se detecto una variante en AKAP9 (c.G4841A:p.R1614Q), heterocigota, sin sentido, de impacto moderado, asociado a síndrome LQT, síndrome de Romano-Ward, fenotipo cardiovascular, considerado benigno/probablemente benigno (Ng D, et al. 2013).

AKAP9, son un grupo de proteínas estructuralmente diversas que tienen la función común de unirse a la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) y confinar la holoenzima a ubicaciones discretas dentro de la célula, codifica al menos dos isoformas, que interactúan con varias proteínas de señalización para ayudar con disposición espacial

y señalización temporal, uniéndose a menudo a moléculas reguladoras opuestas para establecer una regulación temporal localizada de transducción de señales (Wong W, et al. 2004; McConnachie G. et al. 2006).

Adicionalmente es un gen codificador de proteínas. Por ejemplo, en el corazón interactúa con KCNQ1 y KCNE1 que forman un ion de potasio lento canal (canal IKs) y generar la corriente IKs que es esencial para la última fase de repolarización del potencial de acción cardíaco (Marx SO, et al. 2002), si el canal IKs está inhibido, provocará una prolongada duración del potencial de acción dando lugar a LQTS (Yap YG, 2003).

AKAP9 presenta la isoforma más pequeña que es Yotiao 9 que reúne varias proteínas como PKA, PPI, AC9, PDE4D3 y KCNQ1, cada uno de los cuales desempeña un papel en la vía transducción de señales (Chen L. et al. 2011). En general, este complejo regula la fosforilación de KCNQ1 en Ser27 y por lo tanto la actividad del canal IKs. Diferentes regiones de Yotiao unen cada uno de estas proteínas; por lo tanto, las mutaciones que interrumpen esta unión subyacen al LQTS (Li Y. et al, 2001; Ciampa EJ. 2001).

Una variante en TTN (c.C67100T:p.P22367L), heterocigota, missense y de significado incierto, clasificada como patogénica con los algoritmos de predicción in silico.

Dos variantes en ANK3 (c.C11159T:p.T3720M y c.C4465T:p.P1489S), heterocigotas, de significado incierto y de impacto moderado.

Las anquirinas son una familia de proteínas que se cree que unen las proteínas integrales de la membrana con el citoesqueleto de espectrina-actina subyacente y desempeñan funciones clave en actividades como la motilidad celular, la activación, la proliferación, el contacto y el mantenimiento de dominios de membrana especializados (Ackerman MJ, Mohler PJ. 2011). el AnkG cardíaco (ANK3) está menos estudiado, pero está estrechamente relacionado con los fenotipos de arritmia tanto en humanos como en modelos animales a través de su asociación con el canal Na^v dependiente de voltaje, Na^v 1.5 (SCN5A).

Las variantes de SCN5A humano que tienen un impacto en las interacciones AnkG/Na^v 1.5 están asociadas con el síndrome de Brugada (Mohler PJ, 2004; Michael A, et al. 2014; Angsutararux P, et al. 2021). Puede participar en el mantenimiento/dirección de canales iónicos y moléculas de adhesión celular en los nodos de Ranvier y segmentos iniciales axonales. Regula la actividad del canal KCNA1 en función de los niveles de Mg²⁺ en la

dieta y, por lo tanto, contribuye a la regulación de la reabsorción renal de Mg(2+) (Nassal D, 2021).

Sin datos antemortem y antecedentes familiares, resulta complicado correlacionar las variantes encontradas con la muerte del lactante, sin embargo, es posible que estas variantes coadyuvarán a desencadenar el deceso, adicionalmente se es necesario realizar una búsqueda de otros genes presentes, pero que no estaban dentro del alcance de la investigación que pudieran influir en la muerte súbita.

Caso 4

Un lactante masculino de 3 meses, diagnosticado con muerte súbita, sin antecedentes ante mortem. Se identificó una en ANK2 (c.G6634A: p.G2212S) homocigota, sin sentido, de impacto moderado, asociada a síndrome LQT, fenotipo cardiovascular y benigna. ANK2, codifica un miembro de la familia de proteínas de la anquirina que une las proteínas integrales de la membrana con la proteína subyacente del citoesqueleto espectrina-actina (Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V, 2002).

Es altamente expresada en el corazón, juega un papel crítico en la biología y fisiología celular. En el corazón, la anquirina-B desempeña un papel clave en la selección y localización de canales iónicos y transportadores clave, proteínas estructurales y moléculas de señalización (Sucharski HC. Et al. 2020).

En los cardiomiocitos, se requiere para el ensamblaje coordinado del intercambiador de Na/Ca, SLC8A1/NCX1, Na/K ATPasas ATP1A1 y ATP1A2 y receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) en los sitios del retículo sarcoplásmico/sarcolema. Necesario para la expresión y el direccionamiento de SPTBN1 en cardiomiocitos neonatales y para la regulación de la tasa de contracción de cardiomiocitos neonatales (Mohler PJ, et al., 2003).

Las mutaciones en este gen causan el síndrome de QT largo, síndrome de arritmia cardíaca y muerte súbita (Chiang CE. 2004; Mohler PJ, 2007; Ichikawa M,). Se han descrito múltiples variantes raras en dominio de membrana de ANK2 que causan enfermedades estructurales en el corazón y síndromes de arritmia heredables (Swayne LA. Et al. 2017; Watanabe H, Minamino T 2016).

Una variante en CACNA1C (c.C5689T:p.R1897C), heterocigota, sin sentido, impacto moderado asociado con síndrome LQT, síndrome de Brugada, síndrome de Timothy, fenotipo cardiovascular, benigno/probablemente benigno. CACNA1C produce el canal de calcio CaV1.2, en el corazón estos canales se abren y cierran en momentos específicos para controlar el flujo de iones de calcio hacia los cardiomiocitos en cada latido del corazón. El tiempo que los canales están abiertos y cerrados se regula para mantener la función cardíaca normal (Yamakage M, Namiki A, 2002; Liao P, 2005; Napolitano C, Antzelevitch C., 2011; Wemhöner K, et al. 2015).

Se han reportado variantes en este gen asociados previamente con LQTS, síndrome de Timothy (TS), canalopatías arritmogénicas, que son raras y generalmente conduce a la muerte sobre todo en niños menores de tres años (Marks, ML, et al. 1995; Fukuyama M, et al. 2014; Dufendach, KA. Et al, 2018; Gardner RJM, 2019; Para V, 2019).

Si bien cada una de estas variantes por sí sola puede no haber contribuido significativamente a la muerte, puede ser plausible que cada una de las dos variantes observadas en este bebé contribuyó parcialmente a una predisposición genética general.

Un bebé que estaba pasando por etapas críticas en su desarrollo, es posible estos factores en conjunto, pueden haber contribuido a la muerte del bebé, lo que se conoce como “puntuación de riesgo poligénico”, efecto aditivo causado por múltiples variantes de bajo riesgo, cada una con un efecto patogénico bajo, pero que colectivamente pueden producir un funcionamiento por debajo del umbral de las vías fisiológicas de interacción. (Purcell, S.M. 2009; Dudbridge, F. 2013). Sin embargo, se deben realizar más pruebas.

Caso 5

Lactante femenino de 2 meses, llevada a clínica por conjuntivitis y al día siguiente fallece. Se detecto una variante en DSG2 (c.T2759G:p.V920G), heterocigota, missense, asociada a miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho y presenta conflicto de interpretación de patogenicidad, también detectada en el caso II.

Una variante en TTN (c.C5093T:p.P1698L) heterocigota, sin sentido, de impacto moderado, asociada a miocardiopatía hipertrófica, miopatía dilatada tipo 2, miopatía distal tipo Markesbery-Griggs, miocardiopatía dilatada 1G, miopatía hereditaria con insuficiencia respiratoria temprana, miopatía diabética de inicio temprano, miopatía diabética con

miocardiopatía fatal, miopatía diabética dominante, miopatía diabética recesiva, benigna/probablemente benigna, esta variante también fue detectada en el caso.

Para este caso, se debe tener en cuenta lo mismo que para el caso 4, que las dos variantes hayan contribuido parcialmente a una predisposición genética general, en un bebé que estaba pasando por etapas críticas en su desarrollo, es posible estos factores en conjunto, pueden haber contribuido a la muerte del bebé, similar al caso 4 “puntuación de riesgo poligénico” (Purcell, S.M. 2009; Dudbridge, F. 2013). Sin embargo, se deben realizar más pruebas.

Caso 6

Se trata de un adolescente masculino de 15 años, fallece en la habitación de la casa, el estudio histológico, arroja desarreglo leve en fibras del corazón. Se detecto una variante en MYBPC3 (c.C2992G: p.Q998E), heterocigota, en la región de empalme y sin sentido asociada con miocardiopatía dilatada primaria, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo, miocardiopatía hipertrófica familiar primaria, miocardiopatía hipertrófica familiar 4, fenotipo cardiovascular, miocardiopatía dilatada y miopatía diabética dominante. Es una variante que ha sido previamente reportada en otros estudios (Van Driest SL et al., 2004; Konno T et al., 2010; Bahrudin U et al.,2008; García-Castro M et al., 2009).

MYBPC3, proporciona instrucciones para producir proteína C fijadora de miosina cardíaca (MyBP-C cardíaca), que se encuentra en las células del músculo cardíaco (Previs MJ, 2012). En estas células, MyBP-C cardíaco está asociado con una estructura llamada sarcómero, que es la unidad básica de la contracción muscular (Kulikovskaya I, et al. 2007). Las alteraciones en este gen dan origen a la Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MHF), es una enfermedad cardíaca primaria, donde la característica diagnóstica básica es la hipertrofia del ventrículo izquierdo, y la consecuencia más grave es la muerte súbita (Dong X, et al. 2017).

La MHF se debe mayormente a mutaciones en las proteínas del sarcómero. Las mutaciones en el gen MYBPC3 son una causa común de miocardiopatía hipertrófica familiar y representan hasta el 30 por ciento de todos los casos. Esta condición se

caracteriza por el engrosamiento (hipertrofia) del músculo cardíaco (Møller DV, et al. 2009; Finsterer J, et al., 2017).

Aunque algunas personas con miocardiopatía hipertrófica familiar no tienen efectos evidentes en la salud, sin embargo, todas las personas afectadas tienen un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca y muerte súbita (Keren A, et al. 2008).

No está claro cómo las mutaciones del gen MYBPC3 causan la falta de compactación del ventrículo izquierdo (Kolokotronis K, 2019). Durante el desarrollo normal antes del nacimiento, el músculo cardíaco se compacta y se vuelve suave y firme.

Es probable que las mutaciones del gen MYBPC3 provoquen cambios en este proceso, lo que da como resultado un músculo cardíaco del ventrículo izquierdo que no está compactado, pero es grueso y esponjoso. El músculo cardíaco anormal es débil y no puede contraerse de manera efectiva, lo que provoca los diversos signos y síntomas de falta de compactación del ventrículo izquierdo (Marston S, 2011; Waldmüller S, et al. 2001; Arif, M., Nabavizadeh, P., Song, T. *et al.* 2020).

Una variante en KCND3 (c.G1712A p.R571H), heterocigota, de significado incierto y presenta conflicto de interpretación de patogenicidad. El gen KCND3 (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3) está asociado con enfermedades como el síndrome de Brugada, una canalopatía cardíaca con alta heterogeneidad genética que tiene una alta incidencia de muerte súbita en pacientes con un corazón estructuralmente normal [53].

KCND3, codifica el canal de potasio dependiente de voltaje Kv4.3 que se inactivan rápidamente, representan la clase más compleja de canales iónicos dependientes de voltaje tanto desde el punto de vista funcional como estructural, debido a que se asocia con las subunidades reguladoras KCNIP1, KCNIP2, KCNIP3 y KCNIP4 (por similitud) e interactúa con KCNE1, KCNE2, SCN1B y KCNAB1 y DLG1 (Lundby A, Olesen SP. 2006; Dehghani-Samani A, 2019;) contribuye a la corriente de potasio de salida cardíaca (I_{to1}), durante la fase 1 de repolarización del potencial de acción cardíaco (Li-Smerin Y, Hackos DH, Swartz KJ. 2000; Oudit GY, et al. 2001).

Las variantes raras de KCND3 pueden conferir riesgo de arritmias ventriculares letales, como el síndrome de Brugada (Giudicessi JR, et al. 2011; Li X. et al. 2020), LQTS (Frank-Hansen R, 2005; Ohno S. et al. 2009) y otras enfermedades de conducción cardíaca

(Sun B , et al. 2013; Olesen MS, 2013; Wu CT, 2014; Huo R, et al, 2014; Takayama K et al. 2019;) (, y estar asociadas con el síndrome de muerte súbita inexplicable (SUDS) con autopsia negativa (Giudicessi JR, et al. 2012).

Una variante en TTN (c.C49424A:p.P16475Q), heterocigota, sentido, de significado incierto.

Una variante en ANK3 (c.G6955A:p.D2319N) heterocigota, missense y ligeramente benigna. ANK3 puede participar en el mantenimiento/dirección de canales iónicos y moléculas de adhesión celular en los nodos de Ranvier y segmentos axónicos iniciales. Regula la actividad del canal KCNA1 en función de los niveles de Mg (2+) en la dieta y, por tanto, contribuye a la regulación de la reabsorción renal de Mg (2+).

Se requiere ANK3 (ANKG) para la localización de NaV1.5 y CaMKII en el disco intercalado de los cardiomiocitos (Makara, MA. Et al., 2018). Una variante del gen SCN5A en el motivo de unión a ANKG de NaV1.5 se ha asociado con el síndrome de Brugada y la arritmia B.M. Kroncke, BM. Et al., 2018). Esta misma variante es una variante de pérdida de función cuando se expresa en cardiomiocitos primarios. Las variantes de AnkG se han asociado con el síndrome de Brugada y, más recientemente, con la miocardiopatía dilatada (Hong K., 2005).

Una variante en KCNH2 (exón 2: c.G275C: R92P) homocigota, de significado incierto, es una variante de interacción estructural. KCNH2 relacionado con el éter-a-go-go humano (hERG1) codifica la subunidad α del canal Kv11.1, que subyace en la corriente de K^+ rectificadora retardada de activación rápida (IKr) en el corazón durante las fases 2 y 3 del potencial de acción cardíaco, por lo que juega un papel importante en la repolarización cardíaca (De Zio et al., 2019).

El análisis de esta variante revela que el residuo mutado se encuentra en una región MiID_Hotspot para el síndrome LQT tipo 2 que contiene variantes altamente letales (Kroncke, BM. Et al., 2019). Se ha informado previamente que variantes en el exón 7 del gen KCNH2 causan muerte súbita (Jia PL., et al., 2018), lo cual es consistente con los efectos estructurales de las mutaciones en la proteína. Adicionalmente, es un gen que presenta variantes prioritarias típicamente asociados a canalopatías y muerte súbita (Anderson et al., 2006; Garg et al., 2018; Gema Mondéjar-Parreño, 2021).

Para este caso, la mutación en el gen *KCNH2* podría ser la responsable de la causa de la muerte.

1.4 Discusión

La muerte súbita cardiaca al ser una enfermedad compleja y dada la variabilidad genética que se presenta en los diferentes individuos, su diagnóstico se hace muy complicado (Castiglione, Vincenzo et al., 2021). Sin embargo, no es sencillo su diagnóstico debido al tipo de cardiopatía o canalopatía cardiaca y las comorbilidades asociadas (Khairy P., et al., 202).

Con el avance tecnológico de la secuenciación masiva que permite obtención de grandes cantidades de datos en tiempos muy cortos y el desarrollo bioinformático que permite procesar esos datos, poder estudiar el sustrato molecular de los genes asociados a este tipo de enfermedades es muy importante (Neubauer, J., et al. 2018; Raquel N., et al. 2022).

En este capítulo se presentó un procedimiento de autopsia molecular post mortem en la investigación y detección de enfermedades genéticas letales que podrían haber contribuido a un evento de muerte súbita. Para ello se realizó el análisis del exoma clínico, que permitió amplificar 4834 genes, utilizando la estrategia de enriquecimiento nextera y utilizando el secuenciador de NGS Miseq. Sin embargo, el análisis se enfocó solo al estudio de 67 genes asociados a muerte súbita cardiaca, teniendo en cuenta principalmente las canalopatías cardiacas y variantes de significado incierto (Bezzina et al., 2015; Fadel S., et al., 2020).

Una vez seguido los protocolos de secuenciamiento en las instalaciones del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, se evaluó la calidad del secuenciamiento in situ para obtener una visión general del comportamiento de la secuenciación y del protocolo aplicado. Así se observó si los datos obtenidos son de calidad esperada para continuar con los demás procesos de análisis. Se emplearon varios algoritmos de alineamiento complementarios, como paso clave en la detección de potenciales variantes de interés, este análisis siempre se realizó contra el genoma de referencia GRCh37/hg19.

Es importante mencionar que la utilización del método enzimático transposasa si bien mejora la preparación de librerías (Kia et al, 2017), este método a su vez es muy sensible a la cantidad y calidad del ADN de partida, lo que puede producir sesgos a la hora de

utilizar este tipo de fragmentación. Este trabajo presentó ese reto ya que presente estudio, se trabajaron con muestras postmortem que llevaban mucho tiempo almacenadas en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses lo cual puede afectar la calidad del ADN, tal como se puede observar en la figura 1.4 en la visualización con IGV donde en el gen CACNA1C hay regiones con baja cobertura.

En el trabajo realizado por Manase y colaboradores (Manase et al, 2014) donde estudiaron la profundidad y cobertura en 50 genes relevantes en cardiología, encontraron que solamente existía una cobertura y profundidad adecuada >30X en el 64% de los genes estudiados. Es por ello que 30X fue la profundidad que se tuvo en cuenta para la selección de variantes en los pasos de filtrado para el llamado de variantes.

Otro factor importante que se debe tener en cuenta, es la identificación de variantes relevantes para genómica clínica que debe ser consistente y precisa, ya que se pueden encontrar variantes falsas que podrían llevar a un mal diagnóstico generando costos personales y sociales en la genómica clínica (Hwang, S., et al., 2015), por lo tanto, el llamado de variantes en cada una de las plataformas de secuenciación es muy importante para detectar falsos positivos.

En los estudios de genómica utilizando la secuenciación con NGS es muy frecuente utilizar la combinación de software de alineación de secuencia y llamado de variantes con el fin de obtener los mejores resultados y estar seguros de que las variantes encontradas se pueden asociar con una determinada enfermedad o que no son el producto de falsos positivos causados por el método de secuenciación utilizado (Li Heng, 2014; Pabinger S., et al., 2014; Hwang, S., et al, 2015; Cornish A and Guda Ch., 2015; Sandman S., et al., 2017; Yao et al. 2020, Hsin-N L and Wen-L H., 2021). Es por ello que en esta tesis se recurrió al uso de tres herramientas de llamado de variantes GATK-HC, Samtools mpilup y Freebayes combinado con los alineadores de secuencia anteriormente mencionados permitieron tener un panorama general de las variantes encontradas en común figura 13.

Cuando se utiliza, Bowtie2, gsnap y Novoaling, junto con los tres llamados de variantes, se encuentran el mismo número de llamada de variantes en común esto concuerda con lo reportado previamente en la literatura (Cornish A and Guda Ch., 2015; Sandman S., et al., 2017), por el contrario, cuando se utiliza bwa-men, con los tres llamados de variantes, se observa que en común se encuentran 89 variantes. Relevante es que GATK identifica un

gran número de variantes independientes, por el contrario, entre Freebayes y Samtools se identifican el mismo número de variantes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que con Freebayes se pueden presentar más falsos positivos que con Samtools por el tipo de algoritmo que maneja cada uno.

La eliminación de variantes con puntuación baja puede aumentar la proporción de verdaderos positivos del total de llamado de variantes. Estos resultados sugieren que Freebayes podría ser la mejor opción para llamar variantes si solo se consideran variantes de alta calidad para el estudio. Los resultados con GATK-HC son de esperarse ya que reporta únicamente variantes cuyo puntaje de calidad es mayor a 30.

Adicionalmente, se deben tener en cuenta aspectos como:

- Durante el preproceso de alineación GATK descarta lecturas con baja calidad de mapeo, pero samtools usa todas las lecturas de forma predeterminada.
- Modelo de probabilidad de genotipo SNP: GATK asume que los errores de secuenciación son independientes, mientras que samtools cree que el segundo error tiene una mayor probabilidad. Modelo de probabilidad de genotipo Indel. Esta es una de las principales diferencias entre samtools y GATK. El modelo de Samtools se deriva de BAQ. El modelo de GATK se derivó del modelo de Dindel.
- Samtools utiliza filtros ajustados a mano, mientras que GATK aprende filtros a partir de datos. Por supuesto, el enfoque de GATK es más conveniente y poderoso, al menos para llamadas de variantes humanas donde tiene suficientes datos para entrenar el modelo y no necesita sitios no polimórficos.
- Otras características específicas de GATK: llamado de haplotipos, realineación Indel, entre otras.
- Otras funciones específicas de samtools: análisis sin genotipos, fases físicas, etc.

Claramente, hay mucha variación en los números generados por cada herramienta de llamado de variantes. Sin embargo, uno puede encontrar algunos puntos en común en los números que probablemente provengan de los orígenes algorítmicos de cada herramienta.

Freebayes produce tanto la mayor cantidad de variantes sin filtrar como la mayor cantidad de falsos positivos. Es probable que solo veamos este tipo de rendimiento de esta herramienta debido al hecho de que, si bien no es el único emisor de variantes basado en la inferencia bayesiana, es único en su interpretación de las alineaciones. Es decir, es un llamador basado en haplotipos que identifica variantes en función de la secuencia de las lecturas en lugar de la alineación, la última de las cuales es la forma en que opera UnifiedGenotyper de GATK.

Una vez realizado los filtros correspondientes, se obtuvieron un total de 21 variantes en 14 genes de relevancia clínica. Se encontró que, de las 21 variantes, 19 tenían un ID asociado, y para las otras dos en los genes TTN y KCNH2 aún no se les ha asignado un ID. Por otra parte, se encontraron nueve variantes de significado incierto, su clasificación es debido a que no existe evidencia suficiente para definir su papel funcional en el fenotipo.

En 2015, el ACMG/AMP publicó pautas clínicas sobre la clasificación genética de variantes basadas en varios elementos, como predicciones *in silico*, frecuencias de población global y análisis funcional *in vivo/in vitro* (S. Richards, et al., 2015). En los últimos años, se han publicado informes adicionales que incluyen modificaciones de estas guías, mejorando la clasificación patogénica potencial de variantes raras (M. Lek, et al., 2016; Y. Kobayashi, et al., 2017; A.N. Abou Tayoun, et al., 2018).

Adicionalmente, ACMG en el 2022 realizó una actualización de las pautas de clasificación de variantes (patógeno, probablemente patógeno, predisponente, probablemente predisponente, significado incierto, probablemente benigno y benigno) (Masson E., et al. 2022). En la actualidad, no existen lineamientos forenses sobre el manejo e interpretación de los casos en los que se encuentran este tipo de variantes.

Aunque existen directrices para la investigación de autopsia de muerte súbita cardíaca establecida por la Asociación Europea de Patología Cardiovascular (Basso C., et al. 2017) y las guías para el manejo de muerte súbita en adultos (Sessa F., et al., 2021), donde recomiendan el trabajo multidisciplinario para este tipo de casos.

El abordaje de autopsias moleculares propone la implementación de metodologías dentro del contexto forense, para poder realizar una correcta correlación con los hallazgos de la

autopsia, ya que en la mayoría de los casos de muerte súbita no se cuentan con datos antemortem y mucho menos el acceso a información de familiares dificultando la interpretación. Estos casos se debe realizar análisis funcionales *in silico* que ayuden a asociar la patogenicidad de las variantes. Para el presente proyecto se complementó este tipo de análisis que será abordado en el capítulo 4.

En cuanto a las variantes asociadas a cardiomiopatías, se observa que presentan un impacto moderado, y que existe una discrepancia en cuanto al significado clínico pese a estar asociadas a algún tipo de miocardiopatía. Se encontraron los genes TTN, DSP y MYBPC3 que han sido catalogados como prioritarios, es decir claramente asociados a la enfermedad y recomendados para el análisis en las guías de práctica clínica (Corrado D., et al., 2015).

En cuanto a las canalopatías cardíacas, se encontraron variantes en los genes TRDN, AKAP9, ANK2, CACNA1C y en KCNH2, estos dos últimos genes son muy relevantes al momento de estudiar este tipo de patologías, dada su complejidad e interacción con otros genes (Campuzano O, et al., 2015; Magi, S., 2017; Fernández-Falgueras A, 2017; Fonseca DJNdO, Silva MJLVd, 2018; Skinner JR et al, 2019; Jonathan R., 2019; Alabdulgader Abdullah, 2021).

Uno de los factores que afectó la complejidad de la interpretación de los datos de secuenciación de próxima generación en este estudio fue la falta de antecedentes clínicos disponibles, que dificulta evaluar el papel de variantes raras, supuestamente patogénicas, en casos que se presentaron como muerte súbita inesperada, en los que se debe considerar una posible enfermedad cardíaca hereditaria.

Observando los casos 2, 3, 4 y 5 que se trataron de lactantes de 2 a 3 meses, las variantes observadas posiblemente contribuyeron a la muerte, y probablemente otros factores también contribuyeron, esta noción resulta concordante con la hipótesis del triple riesgo de fue propuesto por primera vez en 1994 por Filiano y Kinney (Filiano H. Kinney A. 1994): en estos casos los bebés se encontraban en una etapa crítica de su desarrollo, el evento desencadenante pudo haber sido alguna tipo de infección, y la predisposición puede haber sido las variantes genéticas.

La ocurrencia simultánea de estos eventos pudo dar como resultado una arritmia cardíaca que finalmente condujo a la muerte. Estudios han revelado que síntomas de la fiebre puede desencadenar eventos más graves, como un paro cardíaco en personas con síndrome Brugada (Amin AS., et al. 2008). Esta hipótesis se apoya en el caso V que presentaba un cuadro de conjuntivitis y que tenía variantes genéticas en DSG2 y TTN.

2. Análisis *in silico* de genes asociados a canalopatías cardíacas y miocardiopatías usando la base de datos de mil genomas

2.1 Introducción

Las enfermedades de origen cardiovascular son una de las principales causas de muerte súbita cardíaca (MSC), se ha estimado una incidencia al rededor del 20% en países industrializados y por lo cual se han convertido en problema de salud pública (Basso C., et al., 2008; Adabag AS., et al. 2010). Además, por su carácter sorpresivo la MSC se asocia a diversos conflictos medicolegales y, por ende, su abordaje diagnóstico en el ámbito forense es de gran importancia. Las miocardiopatías y canalopatías son las más frecuentes, con un componente hereditario. Las miocardiopatías hereditarias como la miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada y la miocardiopatía arritmogénica, son difíciles de diagnosticar ya que presentan mínimos cambios estructurales en el corazón (Ackerman MJ., et al. 2011). Por otro lado, las canalopatías, afectan el ritmo cardíaco y la conducción eléctrica cardíaca desencadenando un paro cardíaco repentino, lo cual también dificulta su diagnóstico (Narula N., et al., 2015; Neubauer J., et al., 2016).

Con los estudios genéticos de MSC, se han logrado identificar variantes en genes codificantes en cuatro familias de proteínas: sarcoméricas (asociada a cardiomiopatía hipertrófica (Geisterfer-Lowrance AA., 1999), citoesqueléticas (asociada a miocardiopatía dilatada (Burkett EL., y Hershberger RE. 2005), desmosómicas (asociadas a displasia arritmogénica de ventrículo derecho (Tomé EM., et al. 2004) y canales iónicos (asociadas a enfermedades eléctricas, como el síndrome QT largo (SQTL (Zipes et al. 2006), Síndrome QT corto (SQTC) (Priori SG., et al. 2005), síndrome de Brugada (SBr) (Brugada P and Brugada J. 1992), Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC)

(Priori SG., et al. 2001) y Síndrome de Repolarización Precoz y Fibrilación Ventricular Idiopática (SRPyFVI) (Valdivia CR., et al. 2010), en el avance inicial del estudio de estas enfermedades se logró establecer la base genética de herencia mendeliana.

Las cardiomiopatías y canalopatías presentan una alta heterogeneidad genética y expresividad variable debido al gran número de variantes que pueden llegar a tener alguna incidencia, por lo cual son clasificadas como enfermedades complejas, dificultando la estratificación del riesgo (Priori SG. 2009; Tester DJ., and Ackerman MJ., 2011). Sumado a ello, en los análisis experimentales se requiere contar con un elevado número de pacientes y controles, lo que dificulta su análisis.

Sin embargo, gracias a los diferentes proyectos de genotipado masivo como es el proyecto de mil genomas (Durbin RM., et al. 2010), se puede realizar un análisis *in silico*, basado en las alteraciones de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos y su comparación con el genoma de referencia, para correlacionar el efecto de una determinada mutación con el fenotipo del individuo, lo cual es más rápido, que permite estudiar grupos de genes de forma masiva a un bajo costo.

2.2 Objetivo

analizar genes asociados a miocardiopatías y canalopatías cardíacas en la base de datos de los mil genomas (<http://www.internationalgenome.org/>), describir las frecuencias de variantes en los diferentes grupos poblacionales, incluyendo la población colombiana, e investigar el patrón de patogenicidad que pueden tener.

2.3 Metodología

Utilizando la base de datos de mil genomas, se obtuvieron los datos pertenecientes a 2504 individuos, las secuencias de estos fueron alineadas con el genoma de referencia hg19 (Miga KH., et al. 2014), usando el software snpEff (Cingolani P., et al. 2012), una herramienta que permite predecir efectos en las variaciones genéticas y las alteraciones a nivel de aminoácidos. El cálculo de frecuencias se realizó utilizando el software "Whole genome association analysis toolset" (PLINK 1.9) (Shaun Purdell. 2010). Se analizaron en total 84 genes reportados en la literatura asociados a miocardiopatías y canalopatías cardíacas.

La patogenicidad de las diferentes variantes en los genes CACNA1C, CACNB2, CTNNA3, DSP, KCNAB1, KCND2, KCNJ11, CJNQ1, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN5A, SLMAP y TRDN, se estimó a cabo mediante las herramientas de predicción SIFT (Kumar P., et al. 2009), POLYPHEN (Adzhubei VA., et al. 2010), LRT (Chun, S., & Fay, JC. 2009), MUTATION-TASTER (Schwarz, JM., et al. 2014), MUTATION-ASSESOR [Reva B., et al. 2011), FATHMM (Shihab, HA. Et al. 2012), RadialSVM-pred, (Zou, C. et al. 2013), LR-pred (Dong C., et al 2015), y bases de datos CLINVAR y dbSPN (Kitts A., et al. 2002), donde cada predictor utiliza un algoritmo específico basado en distintas características que buscan determinar el efecto de las variantes en la estructura y función de las proteínas y su posible patogenicidad. La figura 2.1a muestra el *pipeline* de análisis, utilizando el software anteriormente mencionado.

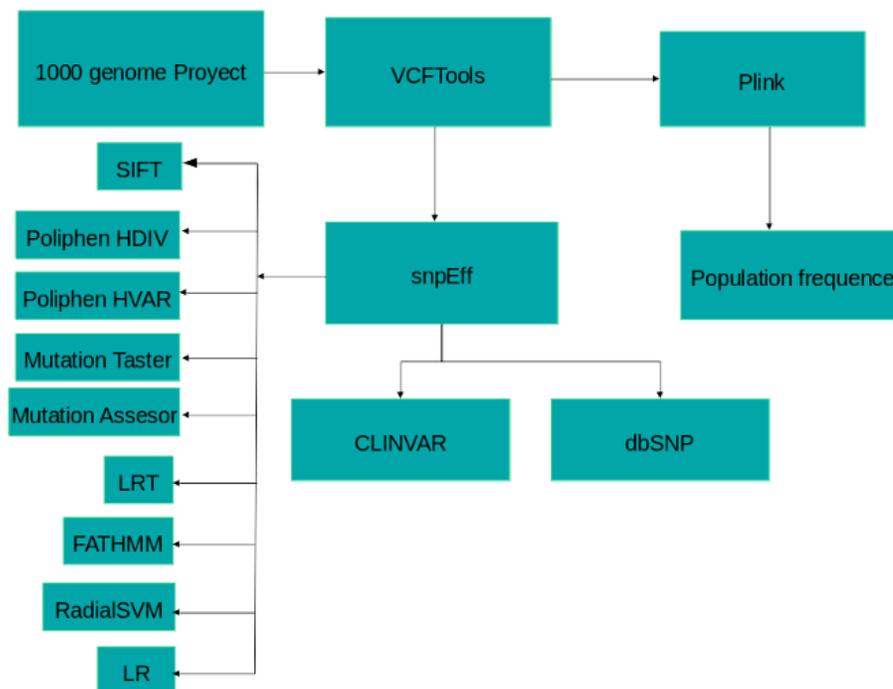


Figura 13 *Pipeline* utilizado para el análisis de la información de la base de datos de mil genomas.

2.4 Resultados

Un total de 226 variantes diferentes fueron identificadas en 1217 individuos (48.6%) provenientes de la base de datos de los mil genomas, se observa que el mayor número de variantes se encontraron en los genes DSP, SCN5A, SCN10A, RYR2 y PRDM16, Tabla 2.1.

Tabla 2 1. Numero de variantes encontradas en los genes asociados a cardiomiopatías y canalopatías en la base de datos de los mil genomas.

Gen	No. de variantes	No. de Individuos	%
CACN1C	6	16	0.6389
CACNB2	3	8	0.3195
CTNNA3	2	3	0.1198
DSP	52	180	7.1885
KCNAB1	2	7	0.2795
KCND2	3	11	0.4393
KCNJ11	6	12	0.4792
KCNQ1	8	20	0.7987
NOS1AP	4	35	1.3977
PRDM16	28	130	5.1917
RYR2	25	134	5.3514
SCN10A	36	101	4.0335
SCN5A	39	350	13.9776
SLMAP	10	12	0.4792
TRDN	2	17	0.0891

Adicionalmente, se encontraron dos variantes de *stop gained* para el gen DSP (rs138907450 y rs28763965).

En la figura 2.2 Se puede observar el número de individuos con variantes en cada grupo poblacional, por ejemplo, para el gen SCN5A (asociado al síndrome de Brugada (SBr)) en la población africana se presentó el mayor número de individuos con variantes, el gen DSP (asociado a cardiomiopía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC)) está presente en todas las poblaciones con un número considerable de variantes.

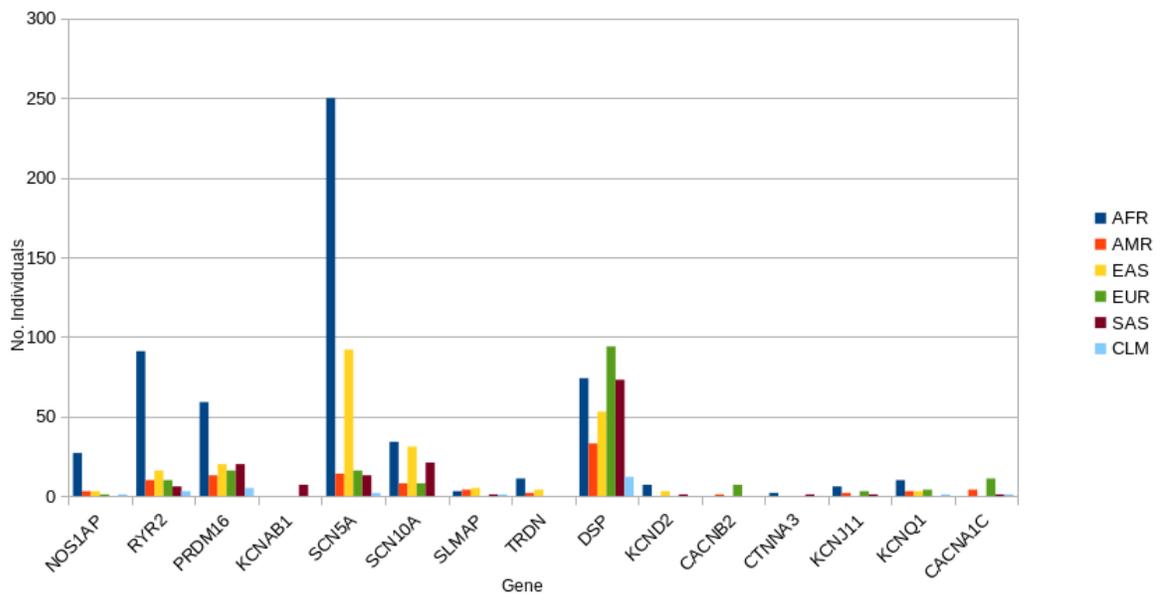


Figura 14. Numero de individuos con variantes por gen en las poblaciones de los 1000 genomas

Figura 2.2 Número de Individuos con variantes por gen en las poblaciones analizadas.

El análisis de Variantes asociados a miocardiopatías y canalopatías cardíacas que se muestra en la figura 2.3, evidencia la expresividad variable o heterogeneidad clínica, donde diferentes Variantes van a dar lugar a una misma enfermedad, y un mismo SNP va dar lugar a diferente fenotipo. Se observa que la población AFR presenta la mayor frecuencia de canalopatías como son LQTS3 y BrS, seguida por la población SAS, con el BrS1, LQTS y fenotipo cardio vascular. En cuanto a miocardiopatías se presentan con mayor frecuencia en la población EUR, en el caso de la población CLM, puede ser debido al tamaño de muestra.

Al realizar la predicción *in silico* de patogenicidad con los diferentes predictores (figura 4), se observa una variabilidad de la patogenicidad, esto es debido al tipo de algoritmo que maneja cada uno de los predictores, haciendo que la interpretación de la patogenicidad sea muy complicada, porque un mismo Variantes puede tener diferente grado de patogenicidad o no ser patogénica.

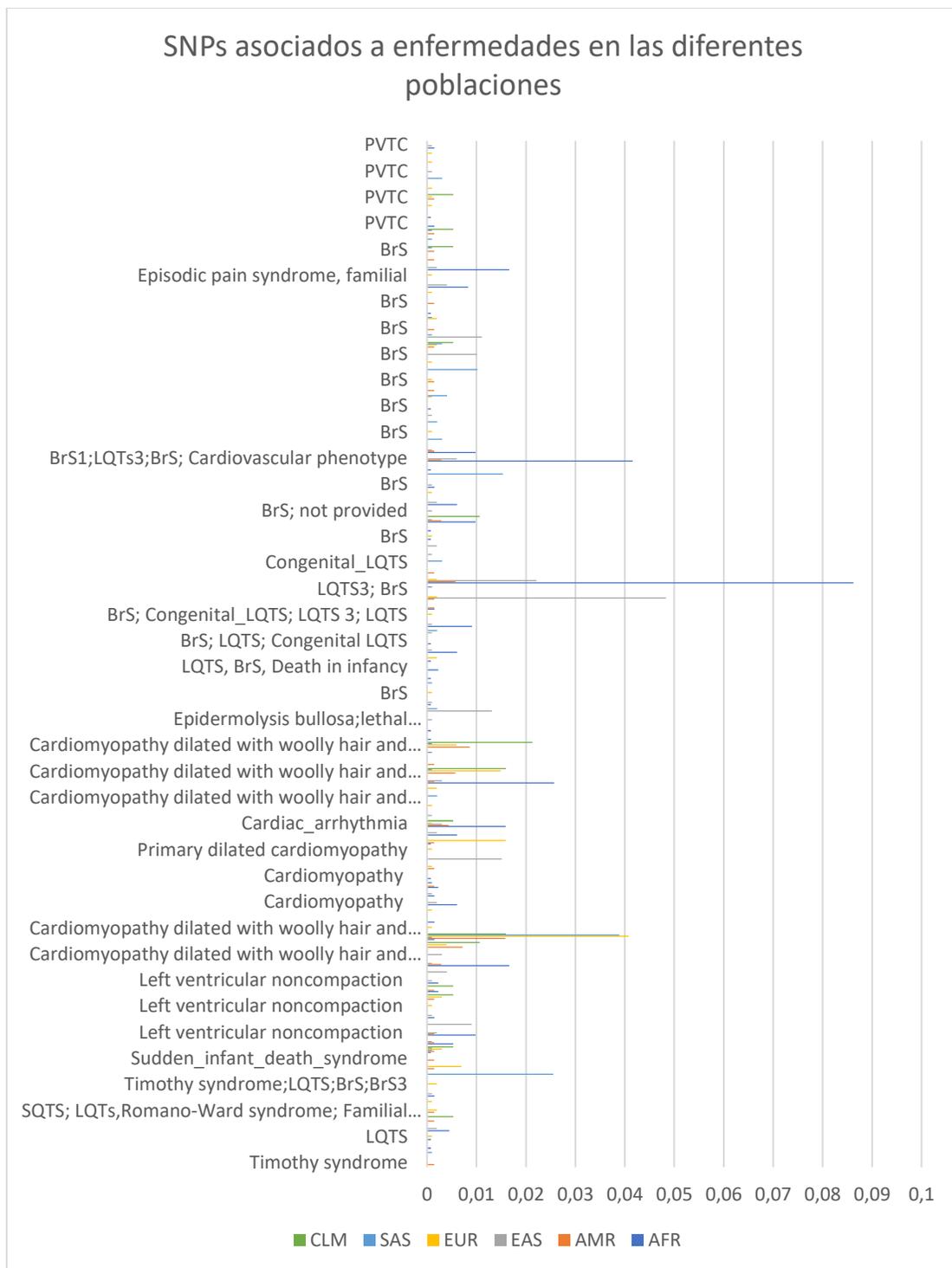


Figura 15. Variantes asociadas a diferentes enfermedades, eje Y: muestra las miocardiopatías y canalopatías, en el eje X: las variantes asociadas a las enfermedades en cada una de las poblaciones.

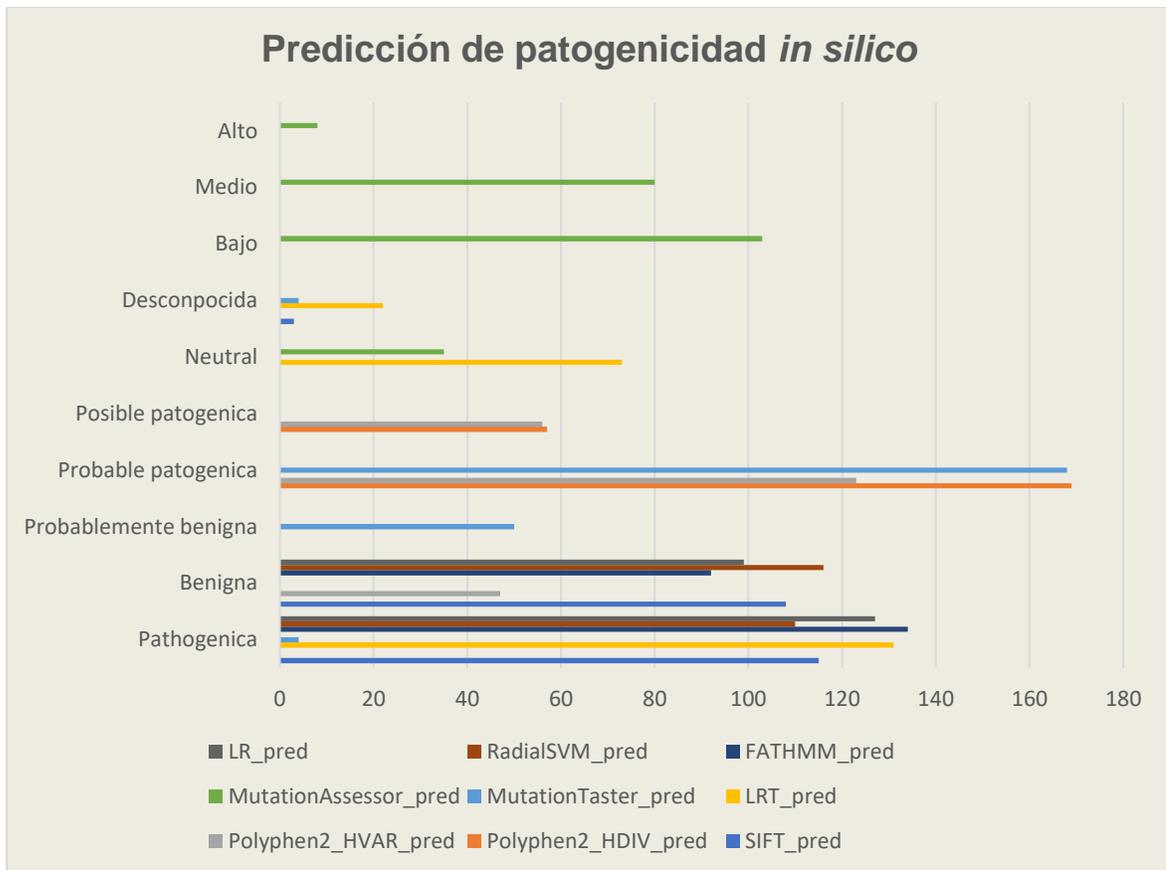


Figura 16 Predicción *in silico*, para la patogenicidad. En el eje Y se muestra el nivel de patogenicidad y en el eje X el número de variantes con cada uno de los predictores de patogenicidad.

En cuanto la significancia clínica de cada una de las variantes encontradas por gen (tabla 2.2), se observa que las variantes tienen un gran espectro, sin embargo, hay variantes que presentan conflicto de interpretación de patogenicidad, que se deben tener en cuenta para estudios posteriores, como que tanto afectan la estabilidad funcional de la proteína (Radusky L., et al. 2018; Neetu S., et al. 2022).

Tabla 2.2. Significancia clínica de las variantes priorizadas.

GEN	Variante	Significancia clínica
CACNA1C	rs200941579, rs199586997 y rs121912775	patogénicos
	rs34534613, rs201392574 y rs112532048	Conflicto de interpretación de patogenicidad
CACNB2	rs148638262	patogénico
	rs191098369 y rs150722502	contradictorio
CTNNA3	rs373081692 y rs200392000	Conflicto de interpretación de patogenicidad
DSP	rs17604693, rs141163578, rs2491080, rs138907450, rs200331083, rs181608152, rs147000526 y rs201863784	patogénicos
	39 SNPs (rs78652302)	Conflicto de interpretación de patogenicidad
	5 SNPs	Benignos
KCNAB1	rs376655720 y rs200440614	Conflicto de interpretación de patogenicidad
KCND2	rs146058924 y rs367713278	patogénicos
	rs35460901	contradictorio
KCNJ11	rs114613745 y rs149667199	patogénicos
	rs5217, rs77131926, rs115716690 y rs139079635	Conflicto de interpretación de patogenicidad
KCNQ1	rs143709408, rs75813654, rs120074193, rs199472776, rs140452381 y rs199472811	patogénicos
	rs199473446 y rs12720457	Conflicto de interpretación de patogenicidad
NOS1AP	rs3700143137 y rs142303407	patogénicos
	rs148930944	contradictorio
	rs34398505	Benigna
PRDM16	20 SNPs	Conflicto de interpretación de patogenicidad
	8 SNPs	Benigna
RYR2	rs370057029, rs200685968, rs190140598, rs182778119, rs180862949, rs202015519, rs368040638, rs149514924, rs79457258, rs142498105, rs370331492, rs186906598, rs140798752, rs377136047, rs191850147 y rs181732213	patogénicos
	9 SNPs	Conflicto de interpretación de patogenicidad
SCN10A		5 Conflicto de interpretación de patogenicidad
SCN5A		12 Conflicto de interpretación de patogenicidad
SLMAP		10 Conflicto de interpretación de patogenicidad
TRDN		2 Conflicto de interpretación de patogenicidad

Al comparar las poblaciones, se encuentra que los Variantes rs14604693 (DSP) y rs187194973 (PRDM16), patogénico y con conflicto de interpretación de patogenicidad está presente en las cinco grandes poblaciones, el primero asociado a cardiomiopatías y el segundo a no compactación ventricular izquierda.

2.5 Discusión

La población de AFR presenta el mayor número de variantes, en total 86 (patogénicas 36, conflicto interpretación patogenicidad 42 y Benignas 7), en los genes SCN5A, SCN10A, KCNQ1, DSP, RYR2 y NOS1AP, esto debido a la diversidad genética y a la antigüedad de

la población; la segunda es la población EAS con 66 variantes (patogénicas 23, conflicto interpretación patogenicidad 39 y Benignas 3) en los genes SCN5A, SCN10A, KCND2, RYR2 y DSP.

La población EUR 61 variantes (patogénicas 31, conflicto interpretación patogenicidad 28 y Benignas 4) en los genes RYR2, SCN10A, SCN5A, DSP, KCNQ1 y CACNA1C y KCNJ11. La población de AMR 60 variantes (patogénicas 20, conflicto interpretación patogenicidad 35 y Benignas 5) en los genes SCNA10A, SCN5A, CACNA1C, KCNQ1, RYR2, DSP y CACNB2, dentro de esta población la CLM tiene 17 variantes (patogénicas 4, conflicto interpretación patogenicidad 11 y Benignas 2), en los genes RYR2, DSP, y KCNQ1.

La población SAS con 38 variantes (patogénicas 13, conflicto interpretación patogenicidad 23 y Benignas 2) en los genes SCN5A, SCN10A, RYR2, NOS1AP, DSP y KCNJ11.

En las poblaciones AFR, AMR, EAS, EUR y SAS se encontraron variantes con frecuencias menores a las mínimas asociados a canalopatías cardíacas y patogénicos (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Variantes patogénicas con frecuencias menores a las mínimas por super población.

Población	Variante
AFR	rs370057029, rs150264233, rs199473303, rs199473147, rs146848219, rs115463830 y
AMR	rs199473187, rs20164141342, rs145712124, rs120074193, rs199472811 y rs200941579
EAS	rs37033131492, rs199473180, rs45475899 y rs141648641
EUR	rs0140598, rs79457258, rs186906,598, rs377136047, rs199473603, rs201276017,
SAS	rs37033131492, rs199473180, rs45475899, rs141648641, rs192379242, rs199473183 y

Igualmente, variantes asociadas cardiomiopatías en AFR (rs147000526), EUR (rs141163578), SAS (rs199473339).

Las diferencias entre el número de Variantes asociados a canalopatías y cardiomiopatías, podría deberse a que las canalopatías son difíciles de detectar y en algunos casos hay que

realizar pruebas de esfuerzo o de susceptibilidad a medicamentos para que se puedan evidenciar en los electrocardiogramas (ACCF, 2011).

Adicionalmente, se detectó el SNP rs138404783 asociado a síndrome de dolor episódico familiar, un síndrome asociado a variantes en los canales de sodio que afecta los sensores neuronales, este síndrome es muy frecuente en poblaciones japonesas (Okuda H.; et al. 2016).

Para la población CLM se encontraron dos Variantes patogénicos, el rs120074193 (asociada a SQT1 en el gen KCNQ1) (Kapplinger JD., et al. 2009; Verma R et al., 2010; Ware Js et al. 2012) y el rs182778119 (Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) gen RYR2) que se encuentra en otra población americana (aún no hay reportes en ncbi ni en ClinVar).

Si bien los resultados obtenidos podrían estar afectados por los tamaños poblaciones, este trabajo proporciona información preliminar sobre posibles variantes asociadas a enfermedades en cada una de las poblaciones, generando interés en la ampliación de los tamaños muestrales. De esta forma aumentar datos que ayuden en la estratificación del riesgo de este tipo de enfermedades en la población, para que en el futuro se desarrollen estrategias de prevención de la muerte súbita cardíaca.

De los resultados dos aspectos a tener en cuenta el primero que se encontraron 114 Variantes que presentan un conflicto de interpretación de patogenicidad con los predictoras *in-silico*. Hallazgo interesante que conlleva a proponer otros estudios que ayuden a dilucidar su patogenicidad y deben ser tenidos en cuenta cuando se realicen estudios de caso-control y teniendo presente el protocolo de significancia clínica de las variantes genéticas Duzkale H., et al., 2013).

El segundo aspecto, es sobre los resultados concordantes con los diferentes estudios que soportan la heterogeneidad genética y la expresividad variable de este tipo de enfermedades (Priori SG et al., 2013), las canalopatías cardíacas que pueden ser causadas por variantes en un gen o en varios genes, esto se puede evidenciar en la figura 2.3.

Se destaca que, si un individuo presenta una determinada variante, no es indicativo que vaya a desarrollar la enfermedad, puesto que además de los factores ambientales también pueden existir modificadores genéticos que disminuyen o suprimen la gravedad de la

enfermedad (Ali J. M. 2020; Ellingford, J.M., et al. 2022), por otro lado, los efectos de penetrancia, expresividad, dominancia y pleiotropía [Jesse D., et al. 2017; Eloisa A., et al. 2022], aspectos que no se mencionaron durante el presente trabajo, pero que se tendrán en cuenta en una futura investigación.

3. Prevalencia de variantes asociadas a canalopatías cardíacas en una muestra poblacional

3.1 Introducción

Las canalopatías cardíacas son un grupo de arritmias malignas en un corazón normal, estos trastornos cardíacos, pueden ser de origen tanto genéticos heredables, como adquiridos, que predisponen a los individuos afectados a la muerte súbita como resultado en los cambios en la expresión o la modificación postraducciona de los canales iónicos o alteraciones en proteínas asociadas dentro del corazón (Ackerman, MJ et al., 2011, Chockalingam, P. et al., 2012; Priori SG, et al., 2013; Schober T. et al., 2012)

Se ha estimado que la prevalencia de este tipo de trastornos oscila entre 1 de cada 2.000 y 1 de cada 3.000 personas (Schwartz et al., 2009), y que representan aproximadamente un tercio de las enfermedades inexplicables en casos de muertes súbita cardíaca (MSC) (Behere & Weindling, 2015; Chockalingam & Wilde, 2012). Sin embargo, estas tasas pueden ser una subestimación porque muchas personas son mal diagnosticadas, ya que se pueden presentar canalopatías a nivel cerebral como en casos de epilepsia (Wang, J., et al. 2014), o que no se diagnostican antes de la muerte por paro cardíaco repentino (Abriel & Zaklyaminsaya, 2013; Krahn et al., 2013).

La MSC se puede presentar en niños, adolescentes y adultos jóvenes a los pocos minutos del inicio de los síntomas cardíacos (Ellison, 2015). En estudios recientes se ha encontrado que alrededor del 30% de las autopsias negativas en individuos jóvenes (<15 años) posiblemente podrían explicarse por variaciones patogénicas en los genes relacionados

con canalopatías. (Campuzano, U. et al., 2014). Adicionalmente se ha encontrado que aproximadamente dos tercios de los sobrevivientes de un paro cardíaco repentino son posteriormente diagnosticados con una condición de canalopatía (Behere & Weindling, 2015).

Los síntomas de presentación comunes en las canalopatías cardíacas incluyen síncope palpitaciones, episodios de contención de la respiración y episodios similares a convulsiones (Chockalingam & Wilde, 2012). Las canalopatías cardíacas más prevalentes son el síndrome de QT largo (LQTS) (Gollob MH, et al. 2011), el síndrome de Brugada (BrS) (Brugada R., et al., 2003), el síndrome de QT corto (SQTS) (Stabile G, et al., 2013) y la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) (Medeiros-Domingo A, et al., 2009).

En los últimos años, los avances tecnológicos en el campo de la genética han facilitado la implementación de paneles de genes para la detección de mutaciones, en un corto periodo de tiempo (Ankala A., et al. 2015). La aplicación de esta tecnología a la cardiología ha facilitado la identificación de varios genes clave asociados con la MSC. Como resultado, las pruebas genéticas se han incorporado progresivamente al diagnóstico clínico, lo que ayuda a identificar la causa de la enfermedad en pacientes clínicamente afectados y en casos post mortem no resueltos, así como a identificar factores de riesgo en portadores asintomáticos (Campuzano, et al., 2014).

En Colombia, con el decreto 786 de 1990, se estableció la realización de necropsias medico legales obligatorias, en casos de homicidio, suicidio y accidente o cuando se sospechen de estos, adicionalmente, están indicadas para aquellas muertes donde no existe una causa clara del evento que conduce al deceso (DG-M-P-016- V3-2021).

La importancia de la investigación: en primer lugar, epidemiológicamente, contribuirá a afinar el diagnóstico de enfermedades hereditarias capaces de provocar arritmias letales, con el consecuente consejo genético que se puede derivar de este hecho para los familiares. En segundo lugar, generará conocimiento para docencia y para ayudar al diagnóstico de los portadores de estos padecimientos; y en tercer lugar establecerá las bases y parámetros para efectuar pruebas moleculares en autopsias médico legales (Sarquella-Brugada et al, 2016) u hospitalarias que no consigan aclarar morfológicamente la causa de muerte súbita cardíaca, para brindar un diagnóstico mucho más preciso.

3.2 Objetivo

Determinar de forma indirecta la prevalencia genética de canalopatías a partir de casos de muerte súbita mediante el análisis de distribución de variantes identificadas por el estudio exómico, así como las reportadas en otras poblaciones.

3.3 Metodología

Se realizó una revisión sistemática de 511 protocolos de necropsia (años 2015 a 2020), teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión establecidos previamente en el capítulo 1. De los cuales se seleccionaron 96 casos para el análisis.

Para el análisis de las muestras, se continuó con la misma metodología establecida en el capítulo 1, para la extracción y cuantificación del ADN, construcción de librerías, secuenciación, alineamiento y filtrado de las variantes de interés.

El panel de secuenciación utilizado para en este capítulo fue el TruSight™ Cardio, que contiene 174 genes asociados a enfermedades cardíacas. Este kit, maneja la misma metodología que el kit TruSight™ One utilizado en el capítulo 1.

3.4 Resultados y Discusión

Para los análisis solo se tuvieron en cuenta 68 casos en los cuales se logró obtener información para alguna de las variantes. Una vez realizado el análisis de datos crudos, las anotaciones y el filtrado de variantes teniendo en cuenta las recomendaciones de la ACC/AHA/ESC 2006, HRS/EHRA 2011 y HRS/EHRA/APHRS 2013.

En la figura 3.1, se muestra los rangos de edades de los casos analizados, se observa que se seleccionaron en total 15 casos en niños menores de 5 años, no se tomaron casos femeninos para los rangos de 6 a 10 años y de 11 a 15 años.

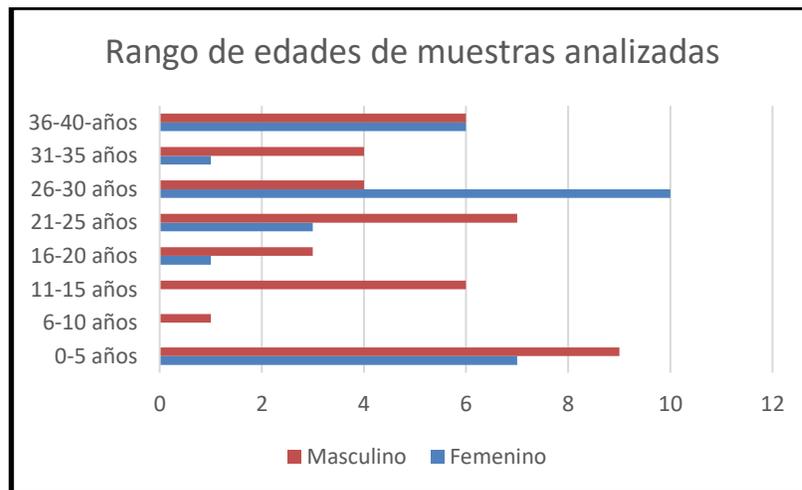


Figura 17 Rango de edades por género de las muestras analizadas

Se construyo en hetmap en R, con el fin de poder observar mejor la tipificación de cada una de las variantes asociadas a enfermedades cardiovasculares (Figura 3.2)



Figura 18 Distribución de las variantes tipificadas para cada uno de los individuos analizados.

La variación que se observa está dada por el espectro de edad de los individuos, con rangos desde 2 meses a 40 años.

3.4.1 Estimación de haplotipos

Al observar la gráfica de distribución de variantes, llamo la atención cuatro variantes a las que se les realizó una estimación de haplotipos (ver tabla 3.4), (rs181494964, rs3741315 y rs7124127) del gen SCNAB, ligeramente benignos, asociado a síndrome de Brugada tipo

4 y a fenotipo cardiovascular; Síndrome SQTL y Síndrome Romano-Ward; y (rs743547) del gen TAZ, benigno asociado al síndrome de Barth Cardiomiopatía no compactante del ventrículo izquierdo, Cardiomiopatía dilatada 3B. Mutaciones en el TAZ, conduce a la deficiencia severa de cardiolipina que da lugar a la disfunción de la cadena respiratoria, variantes patogénicas pueden ser letales y por eso este gen se ha incluido dentro del grupo de genes asociados a muerte súbita cardiaca en niños menores de 2 años, la edad de supervivencia al síndrome de Barth esta entre los 3 años y 13 años de edad. (Mazurová S. et al., 2013)

Tabla 3.1. Estimación de haplotipos para las variantes: rs1814964, rs3741315, rs7124127, rs743547, mediante la librería haplo.em en R.

Haplotipos					
a)	rs1814964	rs3741315	rs7124127	hap.freq	Detalles
1	1	1	1	0.37805	Inlike = -3993803
2	1	1	2	0.00000	lr stat for no LD = 193.2914
3	1	2	1	0.00000	df = -1
4	1	2	2	0.02439	p-val = NA
5	2	1	1	0.00000	
6	2	1	2	0.00000	
7	2	2	1	0.00000	
8	2	2	2	0.59756	
b)	rs1814964	rs7124127	rs743547	hap.freq	
1	1	1	1	0.07809	Inlike = -69.41279
2	1	1	2	0.27870	lr stat for no LD = 68.84967
3	1	2	1	0.01445	df = 2
4	1	2	2	0.01046	p-val = 0
5	2	1	1	0.00000	
6	2	2	1	0.57401	
7	2	2	2	0.04429	
c)	rs3741315	rs7124127	rs743547	hap.freq	
1	1	1	1	0.08036	Inlike = -62.95481
2	1	1	2	0.27737	lr stat for no LD = 98.32257
3	1	2	1	0.00000	df = 0
4	2	1	1	0.00000	p-val = NA
5	2	2	1	0.58525	
6	2	2	2	0.05701	
d)	rs3741315	rs1814964	rs743547	hap.freq	
1	1	1	1	0.07829	Inlike = -69.47916
2	1	1	2	0.27925	lr stat for no LD = 70.2575
3	1	2	1	0.00000	df = 2
4	2	1	1	0.01396	p-val = 0
5	2	1	2	0.01016	
6	2	2	1	0.57406	
7	2	2	2	0.04428	

En la tabla 3.2, están codificados los alelos comunes y variantes como 1 y 2, se puede ver la presencia de varios haplotipos posibles entre los sujetos y se enumeran con una frecuencia estimada de haplotipos. Claramente, los haplotipos no son igual de probables

como se esperaba del alto DL entre las variantes. Los haplotipos más probables están resaltados en gris. En la tabla 3.2-a) los haplotipos más probables son 1 y 8 con un acumulado de que 97.561%; 3.2-b) 2 y 6 con 85.271%; 3.2-c) 2 y 5 con 86.262% y 3.2-d), *haplo.em* estima para cada sujeto la probabilidad de un haplotipo dado en cada uno de los cromosomas del sujeto.

3.4.2 Variantes detectadas

Una vez realizado los diferentes filtros y teniendo en cuenta un $MAF \leq 0.05$, para frecuencias poblacionales en mil genomas, Exome_AD y Genome_AD, y siguiendo las recomendaciones para clasificar las variantes según la ACMG, se encontraron 29 variantes en 19 genes, la información de las variantes, su significación clínica y los resultados con los predictores de patogenicidad se presentan en las tablas (tabla3.c, 3d y 3e).

Se observan las variantes: exónicas (12), UTR3 (7), UTR5 (2) y Splicing (2). Adicionalmente se observa la variante exónica de parada (c.C20497T:p.R6833X).

En TMEM43 (NM_024334:c.-142G>A), se encontró en 13 casos, resulta interesante esta variante. La TMEM43 es una proteína transmembrana con cuatro dominios y se ha informado que variantes en este gen causan la miocardiopatía arritmogénica (ACM) (Bengtsson L and Otto H. 2008; Siragam V., et al. 2014). Recientemente, un estudio de exoma, se identificó la variante TMEM43:p.S358L, autosómica dominante en una familia con ACM en la cual 10 individuos afectados habían muerto de forma repentina (Shinomiya, H. et al. 2021), lo que sugiere que se debe realizar estudios funcionales más exhaustivos de estas variantes en el TMEM4.

El gen TMPO (NM_001032283:c.*1A>G) en tres casos, TMPO codifica la proteína LAP2 α,β que contribuye a la regulación del ciclo celular y la organización/expresión del genoma (Gruenbaum, Y. et al., 2015). Variantes en este gen están asociadas miocardiopatías (Dechat, T., et al. 2000). En el año 2005 se describió la variante TMPO:c.C2068T:p.A690C, en dos hermanos afectados por DCM sin problemas significativos en la conducción cardiaca (Taylor, MRG. Et al., 2005), en el estudio realizado por Vadrot N. et al., encontraron las variantes raras TMPO (p.(Gly395Glufs*11), p.(Leu124Phe), p.(Ala240Thr) y la variante frecuente (p.Arg690Cys) y con los estudios in silico validaron la patogenicidad de las tres variantes raras (Vadrot N. et al., 2023). Con lo anterior, se confirma que las

variantes en TMPO están asociadas a cardiomiopatías, y el gen se debe tener en cuenta en los análisis de casos asociados a muerte súbita cardíaca.

En el gen SELENON (NC_000001.11:25809790:C>T) en un caso, SELENON es una proteína transmembrana localizada en el retículo endoplásmico (Castets, P. et al. 2012), variantes en este gen han sido asociadas miopatías congénitas, a disfunción sistólica del ventrículo derecho secundaria a insuficiencia pulmonar y arritmias (Zhang S., et al. 2021; Karlijn Bouman. et al., 2022). En el estudio de Zhang S, et al., evidenciaron tres nuevas variantes SELENON (c.1286_1288 del CCT, c.1078_1086dupGGCTACATA y c.785 G>C), adicionalmente sugieren que este gen debe ser considerado como de diagnostico diferencial en pacientes adultos con compromiso respiratorio tardío (Zhang S, et al. 2021).

El gen TNNT2 (NM_001001432:c.*66G>A) en cinco casos, TNNT2 sintetiza la troponina T cardíaca, variantes de este gen son la tercera causa de la HCM, aumenta la sensibilidad de los miofilamentos Ca²⁺ y causa arritmogenesis (Messer et al., 2016). Adicionalmente, variantes en TNNT2 también están vinculadas con un mayor riesgo de arritmogenesis ventricular y muerte súbita a pesar de causar poca o ninguna hipertrofia cardíaca especialmente en jóvenes y adultos jóvenes (Shafaattalab S., et al., 2021).

En TPM1 (NM_001018020:c.*119T>C) en tres casos, TPM1 produce la α -tropomiosina, importante en el ensamblaje de la actina sarcomérica, se encuentra en el tejido del musculo cardíaco y juega un papel clave en permitir que los músculos se contraigan, variantes en este gen han sido asociados a DCM, HCM, LVNCM y RCM (SJ Carlus. Et al., 2020; Larissa M., et al. 2021; Man YMS., et al. 2022). Para este gen se han informado más de 30 variantes que incluyen variantes sin sentido, de cambio de lectura debido a eliminación. En el estudio realizado por Man YMS., et al., reportan la nueva variante c.340G>C heterocigota en una familia china (Man YMS., et al., 2022), los autores comentan que esta mutación aumenta la carga local positiva en una región de la molécula cargada negativamente y altamente conservada.

En SCN4B (NM_001142349:c.*1071T>C) en cinco casos, Sub unidad β 4 del canal de sodio, es una proteína reguladora en el tejido cardíaco y desempeña un papel crucial en la adhesión celular, la transducción de señales, la expresión del canal en el sarcolema y la

dependencia de voltaje de compuerta de canal (Li, RG., 2013; José P. Llongueras., et al. 2020). Variantes en este gen han sido asociadas a LQTS, BrS y fibrilación atrial familiar

Tabla 3.2. Variantes seleccionadas para análisis acorde a las frecuencias poblacionales con MAF \leq 0.05.

caso	Gen	rsID	Func	Variante genética y cambio de AA	zygocidad	MAF \leq 0.05		
						1000g	ExomeAD	gnomeAD
7	TTN	rs56273463	exonic	c.C74017T:p.R24673C	het	0.00279553	0.0056	0.0055
8	CTNNA3	rs373233387	exonic	c.A578G:p.Q193R	hom	Ausente	0,08541	0.0003
	CACNA1C	rs185788586	exonic	c.C5689T:p.R1897C	het	0.00858626	0.0101	0.0018
9	KCNJ5	rs115012103	exonic	c.C121T:p.R41C	het	0.00499201	0.0011	0.0026
10	DSP	rs368802003	exonic	c.C12G:p.N4K	3.02	0.00199681	0.0052	0.0009
11	TTN	rs764562311	exonic	c.C41053T:p.P13685S	het	Ausente	0,01233	Ausente
	TTN	rs180694107	exonic	c.A1884C:p.R628S	het	0.000399361	0,008137	Ausente
	CACNB2	rs61733968	exonic	c.C1651G:p.R551G	het	0.00439297	0.0091	0.0099
	CREBBP	rs146887252	exonic	c.G712C:p.V238L	het	Ausente	0.0004	0.0002
	DSP	rs368802003	exonic	c.C12G:p.N4K	3.02	0.00199681	0.0052	0.0009
14	TTN	rs775186117	exonic	c.C20497T:p.R6833X	het	Ausente	0,004641	Ausente
15	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
16	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
18	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
21	KCNE3	rs1009289016	UTR3	NM_005472:c.*1383C>T	het	Ausente	Ausente	Ausente
25	TNNT2	rs3729998	UTR3	NM_001001432:c.*66G>A	het	0.00738818	Ausente	0.0169
26	TNNT2	rs3729998	UTR3	NM_001001432:c.*66G>A	het	0.00738818	Ausente	0.0169
28	TNNT2	rs3729998	UTR3	NM_001001432:c.*66G>A	het	0.00738818	Ausente	0.0169
30	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
31	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
32	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
33	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
37	KCNE3	rs1009289016	UTR3	NM_005472:c.*1383C>T	hom	Ausente	Ausente	Ausente
42	TNNT2	rs3729998	UTR3	NM_001001432:c.*66G>A	het	0.00738818	Ausente	0.0169
44	TNNT2	rs3729998	UTR3	NM_001001432:c.*66G>A	het	0.00738818	Ausente	0.0169
46	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
48	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
49	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
51	SNTA1	rs41305789	UTR3	NM_003098:c.*343G>A	het	0.0443291	Ausente	0.0143
52	SNTA1	rs41305789	UTR3	NM_003098:c.*343G>A	het	0.0443291	Ausente	0.0143
54	SNTA1	rs41305789	UTR3	NM_003098:c.*343G>A	het	0.0443291	Ausente	0.0143
57	CASQ2	rs72554068	UTR3	NM_001232:c.*503G>A	het	0.00199681	Ausente	0.0036
58	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
	TMPO	rs1058300	UTR3	NM_001032283:c.*1A>G	het	0.00279553	0.0035	0.0023
59	CASQ2	rs72554068	UTR3	NM_001232:c.*503G>A	het	0.00199681	Ausente	0.0036
	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0152
	TMPO	rs1058300	UTR3	NM_001032283:c.*1A>G	het	0.00279553	0.0035	0.0023
60	SCN4B	rs117263855	UTR3	NM_001142349:c.*1071T>C	het	0.0313498	0.0343	0.0113
	TPM1	rs138843544	UTR3	NM_001018020:c.*119T>C	het	0.0107827	Ausente	0.0250
61	SCN4B	rs117263855	UTR3	NM_001142349:c.*1071T>C	het	0.0313498	0.0343	0.0113
	TPM1	rs138843544	UTR3	NM_001018020:c.*119T>C	het	0.0107827	Ausente	0.0250
62	SCN4B	rs117263855	UTR3	NM_001142349:c.*1071T>C	het	0.0313498	0.0343	0.0113
63	SCN4B	rs117263855	UTR3	NM_001142349:c.*1071T>C	het	0.0313498	0.0343	0.0113
	TPM1	rs138843544	UTR3	NM_001018020:c.*119T>C	het	0.0107827	Ausente	0.0250
65	AKAP9	rs4727267	UTR5	NM_147185:c.-124G>C	hom	Ausente	0.8383	0.5967
	ANKRD1	rs10881855	exonic	NM_014391:c.-145T>C	hom	Ausente	0.6558	0.6652
	TMEM43	rs17038940	UTR5	NM_024334:c.-142G>A	het	0.0451278	Ausente	0.0955
66	SELENON	rs147587542	exonic	NC_000001.11:25809790:C>T	het	0.0101837	0.0256	0.0298
68	TTN	rs775186117	exonic	c.C20497T:p.R6833X	hom	Ausente	0,004641	Ausente
74	CACNB2	rs750396182	splicing	NM_020451.3:c.981C>T	het	Ausente	0.0008	0.0181
	TMPO	rs1058300	UTR3	NM_001032283:c.*1A>G	het	0.00279553	0.0035	0.0023
75	KCNH2	NM_172057	splicing	NM_172057:exon7:c.1672+2T>G	het	Ausente	0.0032	0.0070

76	SCN4B	rs117263855	UTR3	NM_001142349:c.*1071T>C	het	0.0313498	0.0343	0.0113
	KCNH2	NM_172057	splicing	NM_172057:exon7:c.1672+2T>G	het	Ausente	0.0032	0.0070

En KCNE3 (NM_005472:c.*1383C>T) en dos casos, KCNE3 es una subunidad transmembrana expresadas en el corazón y ligadas a arritmias cardiacas principalmente como LQTS y BrS; presente junto a otras subunidades en la formación de los poros de los canales de potasio (Abbott GW. 2016; Ji Sun, Roderick M. 2020).

En CASQ2 (NM_001232:c.*503G>A) en dos casos, CASQ2 es una proteína de unión al calcio localizada en el retículo sarcoplásmico de las células cardiacas y del musculo esquelético lento. Variantes en este gen causan CPVT inducida por estrés (Valle, G., et al. 2020; Kevin Ng., et al. 2020).

Tabla 3.3. Significado clínico de las variantes encontradas en cada uno de los casos.

caso	Variante genética y cambioAA	CLNDN	CLNSIG
7	c.C74017T:p.R24673C	HCM,DCM	Conflicto de interpretacion de patogenicidad
8	c.C5689T:p.R1897C	SQTL, SBr, S-Timothy, FC	Benigno/Ligeramente benigno
	c.A578G:p.Q193R	DAVD	Significado incierto
9	c.C121T:p.R41C	SQTL, SRomano-Ward, FC	Benigno/Ligeramente benigno
10	c.C12G:p.N4K	ARVC, CM, FCV	conflicto de interpretacion patogenicidad
11	c.C1651G:p.R551G	SBr, SBr-4, FCV	conflicto de interpretacion patogenicidad
	c.C12G:p.N4K	ARVC, CM, FCV	conflicto de interpretacion patogenicidad
	c.C41053T:p.P13685S	DCM	Significado incierto
	c.A1884C:p.R628S	DCM	Significado incierto
	c.G712C:p.V238L	not_specified	Ligeramente benigno
14	c.C20497T:p.R6833X	PDCM	Ligeramente patogenico/patogenico
15	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
16	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
18	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
21	NM_005472:c.*1384G>A	BrS	Significado incierto
25	NM_001001432:c.*66G>A	HCM, LVNCM, FRCM,DCM	Ligeramente benigno
26	NM_001276347:c.*66G>A	HCM, LVNCM, FRCM,DCM	Ligeramente benigno
28	NM_001001430:c.*66G>A	HCM, LVNCM, FRCM,DCM	Ligeramente benigno
30	NM_024334:c.-142G>A	CM,ARVC	Ligeramente benigno
31	NM_024334:c.-142G>A	CM,ARVC	Ligeramente benigno
32	NM_024334:c.-142G>A	CM,ARVC	Ligeramente benigno
33	NM_024334:c.-142G>A	CM,ARVC	Ligeramente benigno
37	NM_005472:c.*1383C>T	SBr	Significado incierto
42	NM_000364:c.*66G>A	HCM, LVNCM, FRCM	Ligeramente benigno
44	NM_001001431:c.*66G>A	HCM, LVNCM, FRCM, DCM	Ligeramente benigno
46	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
48	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
49	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
51	NM_003098:c.*343G>A	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno
52	NM_003098:c.*343G>A	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno
54	NM_003098:c.*343G>A	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno
57	NM_001232:c.*503G>A	CPVT	Significado incierto
58	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
59	NM_001232:c.*482C>T	CPVT	Significado incierto
	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
60	NM_001142349:c.*1071T>C	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno
	NM_001018020:c.*119T>C	HCM,DCM	Ligeramente benigno
61	NM_001142349:c.*1071T>C	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno
	NM_001365778:c.*119T>	HCM, DCM	Ligeramente benigno
62	NM_001142349:c.*1071T>C	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno
	NM_001142349:c.*1071T>C	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno
63	NM_001365778:c.*119T>C	HCM,DCM	Ligeramente benigno
	NM_147185:c.-124G>C	LQTS, Romano-Ward-S	ligeramente benigno
65	NM_014391:c.-145T>C	CMD	ligeramente benigno
	NM_024334:c.-142G>A	CM, ARVC	Ligeramente benigno
66	NC_000001.11:25809790:C:T	ECMD,SEPN1	Ligeramente benigno
68	c.C20497T:p.R6833X	PDCM	Ligeramente patogenico
74	NM_201593c.121-2A>T	BrS	Significado incierto
75	NM_172057:c.1672+2T>G	LQTS2	Significado incierto
76	NM_172057:c.1672+2T>G	LQTS	Significado incierto
	NM_001142349:c.*1071T>C	LQTS, Romano-Ward-S	Ligeramente benigno

Tabla 3.4. Predicción de patogenicidad con los predictores por *SIFT*, *PolyPhen2*, *Mutation Taster*, *LRT*, *Mutation Assesor*, *FATHMM*, *MetaSVM*, *RadialSVM*, *LR*, *CADD*, *GERP++*, *PhyloP* y *SiPhy*.

caso	Gen	Variante genética y cambioAA	SIFT pred	Polyphen2 HDIV pred	Polyphen2 HVAR pred	LRT pred	Mutation Taster pred	Mutation Assesor pred	FATHMM pred	Radial SVM pred	LR pred	CADD phred	GERP++ RS
7	TTN	c.C74017T.p.R24673C	D	D	D	.	D	M	T	T	T	18.85	5.52
8	CACNA1C	c.A578G.p.Q193R	T	D	P	N	N	N	T	T	T	25.08	4.26
8	CTNNA3	c.C5689T.p.R1897C	D	D	D	N	D	L	T	T	T	19.83	5.19
9	KCNJ5	c.C121T.p.R41C	D	D	P	N	D	L	D	D	D	25.4	5.79
10	DSP	c.C12G.p.N4K	D	P	B	D	D	N	T	T	T	17.69	3.02
11	TTN	c.C41053T.p.P13685S	D	D	P	.	D	H	T	D	T	13.54	5.78
	TTN	c.A1884C.p.R628S	D	P	P	.	N	L	T	T	T	13.14	4.75
	CACNB2	c.C1651G.p.R551G	D	D	D	D	D	L	T	D	T	16.61	5.91
	CREBBP	c.G712C.p.V238L	T	D	P	D	D	N	T	T	T	20.1	6.01
	DSP	c.C12G.p.N4K	D	D	P	B	D	D	N	T	T	17.69	3.02
14	TTN	p.R6833X	D	.	.	.	A	58	0.77
15	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
16	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
18	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
21	KCNE3	NM_005472:c.*1383C>T	T	D	.	N	.	.	T	.	T	15.27	5.35
25	TNNT2	NM_001001432:c.*66G>A
26	TNNT2	NM_001276347:c.*66G>A
28	TNNT2	NM_001001430:c.*66G>A
30	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
31	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
32	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
33	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
37	KCNE3	NM_005472:c.*1383C>T	D	D	P	.	.	.	T	.	T	18.59	4.68
42	TNNT2	NM_000364:c.*66G>A
44	TNNT2	NM_001001431:c.*66G>A
46	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
48	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
49	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
51	SNTA1	NM_003098:c.*343G>A
52	SNTA1	NM_003098:c.*343G>A
54	SNTA1	NM_003098:c.*343G>A
57	CASQ2	NM_001232:c.*503G>A	D	B	T	.	T	21.32	5.49
58	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
59	CASQ2	NM_001232:c.*503G>A	D	B	T	.	T	13.69	4.92
	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
60	SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C
	TPM1	NM_001018020:c.*119T>C
61	SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C
61	TPM1	NM_001365778:c.*119T>
62	SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C
63	SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C
	TPM1	NM_001365778:c.*119T>C
65	AKAP9	NM_147185:c.-124G>C	T	P	P	N	N	N	T	T	T	17.94	1.68
	ANKRD1	NM_014391:c.-145T>C	T	P	D	N	N	N	T	T	T	22.73	8.64
65	TMEM43	NM_024334:c.-142G>A
66	SELENON	NC_000001.11:25809790:C:T
68	TTN	p.R13330X	D	.	.	.	A	58	0.77
74	CACNB2	NM_201593:exon2:c.121-2A>	D	P	.	.	D	.	T	.	T	17.82	5.7
75	KCNH2	NM_172057:exon7:c.1672+2T	T	B	.	.	D	21.0	3.87
76	KCNH2	NM_172057:exon7:c.1672+2T	T	B	.	.	D	21.0	3.87
	SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C

Se observa en la tabla 3.5, que la predicción de patogenicidad con los algoritmos de predicción no fue muy bien estimada. Sin embargo, se observa que se presentan diferencias entre los predictores de patogenicidad.

Para los genes CASQ2, KCNE3, SCN4B, SNTA1, TMEM43, TMPO, TNNT2 y TPM1, si bien las variantes encontradas fueron en 3UTR y 5UTR, las variaciones genéticas en estas regiones pueden modificar los elementos reguladores que afectan la interacción de las UTR con las proteínas y los microARN.

Las consecuencias funcionales generales incluyen la modulación de la transcripción del ARNm, la estructura secundaria, la estabilidad, la localización, la traducción y el acceso a reguladores como microARN y las proteínas de unión al ARN (Steri M., 2017; MacArthur J., 2017; Pamuła-Piłat, J., et al. 2020), estas alteraciones modifican las vías moleculares y los procesos celulares, lo que puede conducir a procesos patológicos. Estas regiones resultan ser importantes para investigar en impacto de los cambios en la función de los canales iónicos y proteínas asociadas sobre la predisposición genética al riesgo de la muerte súbita inesperada.

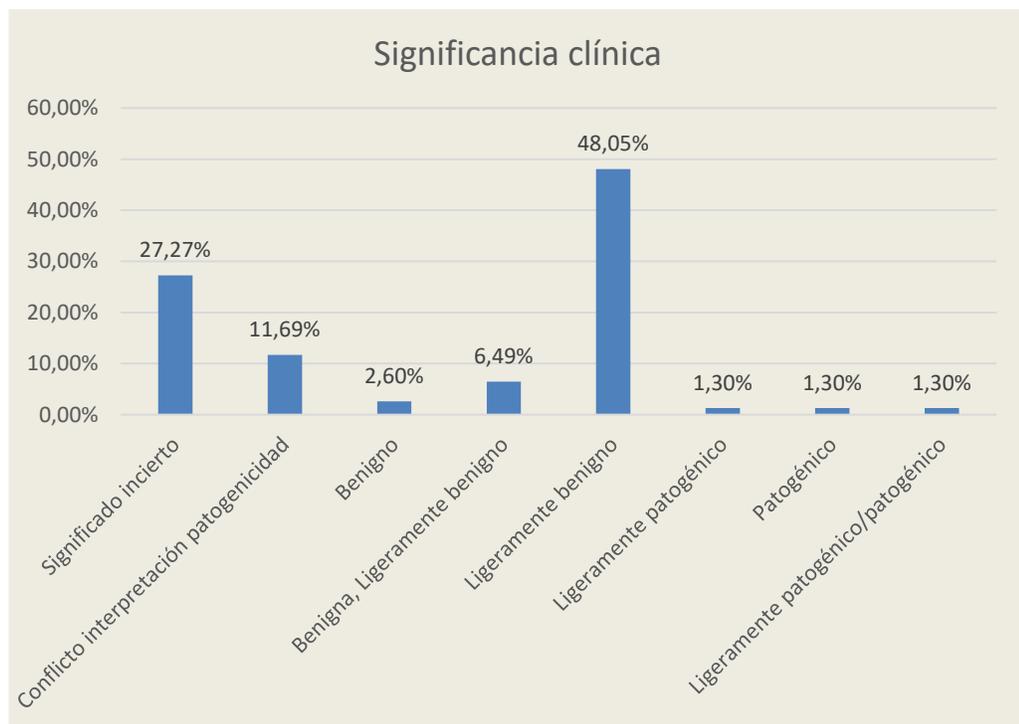


Figura 19 Porcentaje de significancia clínica de las variantes tipificadas que pasaron los filtros

Se observa que el las variantes ligeramente benignas (48.05%) fueron los que más se encontraron, seguidos de variantes con significado incierto (27.27%), variantes con conflicto de interpretación de patogenicidad (11.69%) entre los más representativos.

Con respecto a las variantes de significado incierto representan alrededor de un 40% del total de las variantes (Federici G, Soddu S., 2020), son un gran desafío y genera dilema para los médicos e incertidumbre sobre cómo realizar el asesoramiento a los

pacientes y esto se complica aún más cuando se abordan enfermedades complejas como las canalopatías cardíacas (Campuzano, O. et al. 2015).

Oulas, A y colaboradores, desarrollaron el software VariantClassifier (VarClass), el cual selecciona variantes informativas de significado incierto a través de las asociaciones basada en redes de genes, lo que permite: a) proporcionar nuevas asociaciones entre variantes catalogadas anteriormente como de significado incierto y la enfermedad, b) permite la detección de variantes que actúan de forma sinérgica, proporcionando una visión más realista de la variabilidad de las enfermedades complejas, c) permite con mejor precisión en la predicción del riesgo para cohortes de variación genética de enfermedades, con la selección de variantes de significado incierto que pueden ser informativas (Oulas, A., et al 2019).

En cuanto a las variantes que presentan conflicto de interpretación de patogenicidad, se deben realizar estudios *in silico* con los diferentes algoritmos de predicción de patogenicidad, algoritmos de predicción funcional, datos evolutivos de conservación que permitan identificar regiones funcionales altamente conservadas, análisis de interacción proteína-proteína entre otros (Luca Ponzoni, et al. 2020; Li, C. et al. 2022; Joseph AA et. al. 2022).

En cuanto a los diferentes fenotipos que se pueden encontrar relacionados con diferentes estudios se muestran en la figura 3.4. Se observa que existe una gran heterogeneidad genética y expresión variable en las enfermedades cardíacas. Esto puede deberse a la participación de numerosos tipos de células y combinaciones complejas de especies moleculares que interactúan, y la manifestación de enfermedades interrelacionadas tal como sucede en la HCM que posee más 200 variantes en al menos 11 genes que codifican proteínas del sarcómero cardíaco (Toepfer CN et al. 2019).

Adicionalmente, se ha estimado que la prevalencia de la HCM es aproximadamente 2.5 mayor que la observada clínicamente en estudios ecocardiográficos (Bick AG, et al. 2012; Maron BJ., et al 1995). Por otra parte, en estudios realizados, demuestran que algunas mutaciones de la HCM consideradas causales se observan con diferentes

frecuencias en comparación con los controles en ciertos grupos étnicos (Manrai AK, et al. 2016).

Por otro lado, la HCM abarca un gran espectro de diversos endofenotipos que no dependen de la pato-biología de los sarcómeros. Un ejemplo puede ser el alargamiento de la válvula mitral, la fibrosis de reemplazo miocárdico y la remodelación hipertrófica de las arterias coronarias intramurales, entre otras anomalías que involucran tipos de células que no expresan proteínas del sarcómero de cardiomiocitos, que se han observado en diversos grados en pacientes individuales con HCM (Maron BJ, et al., 2019, Helms AS. et al. 2021).

Igualmente se han encontrados otros ejemplos de la heterogeneidad genética en la patogenidad de la miocardiopatía dilatada del ventrículo izquierdo y la miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo causadas por variantes en el gen TTN (Herman DS, et al. 2012; Hastings R, et al. 2016)

Se ha estimado que el efecto acumulativo de las variantes comunes interactúa con los factores ambientales y determina la susceptibilidad tal como sucede en la insuficiencia cardíaca que es una enfermedad multifactorial (Leopold JA, et al. 2020). Los diferentes fenotipos de las miocardiopatías pueden ser causados por mutaciones en los numerosos genes descritos, sin embargo, incluso las mutaciones en el mismo gen asociado a la enfermedad pueden causar una variabilidad cuantitativa distinta en la expresión del fenotipo de miocardiopatía (Czepluch FS, et al. 2018; Bonaventura J. et al. 2021).

Por lo tanto, diferentes mutaciones dentro de un gen específico pueden causar diferentes efectos funcionales, produciendo diferentes fenotipos (la expresividad y la penetrancia variables implican que factores más allá de las mutaciones patogénicas individuales (modificadores genéticos, epigenéticos o ambientales) pueden influir en el fenotipo y es un campo aun inexplorado que se debe tener en cuenta en futuros trabajos.

En nuestro estudio encontramos diferentes variantes a asociadas enfermedades cardíacas como cardiomiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, displasia arritmogénica de ventrículo derecho, y a canalopatías cardíacas como síndrome QT largo (SQTL), Síndrome QT corto (SQTC), síndrome de Brugada (SBr), Taquicardia

ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), que han sido reportadas en otros estudios (Lowrance AA.T., et al., 1999; Burkett EL, Hershberger RE. 2005; Tester DJ and Akerman MJ, 2011; Zipes et al., 2006; Priori SG., et al., 2013; Brugada P. and Brugada J. 1992; Priori SG., et al., 2001), solo por mencionar algunos.

Por otro lado, se ha estudiado que los canales iónicos pueden funcionar como partes de grandes complejos de macromoléculas que desempeñan papeles cruciales de transcripción, traducción, modificación postraduccion, degradación de todos los canales iónicos cardiacos, ensambles multiproteínicos, entre otros de ahí el gran número de variantes reportadas dan lugar a la heterogeneidad genética de este tipo de enfermedades arritmogénicas como se les conoce generalmente (Schwartz PJ, et al. 2013; Campuzano, O. et al. 2015; Hugues A., et al., 2015; Kamga MVK. Et al. 2021)

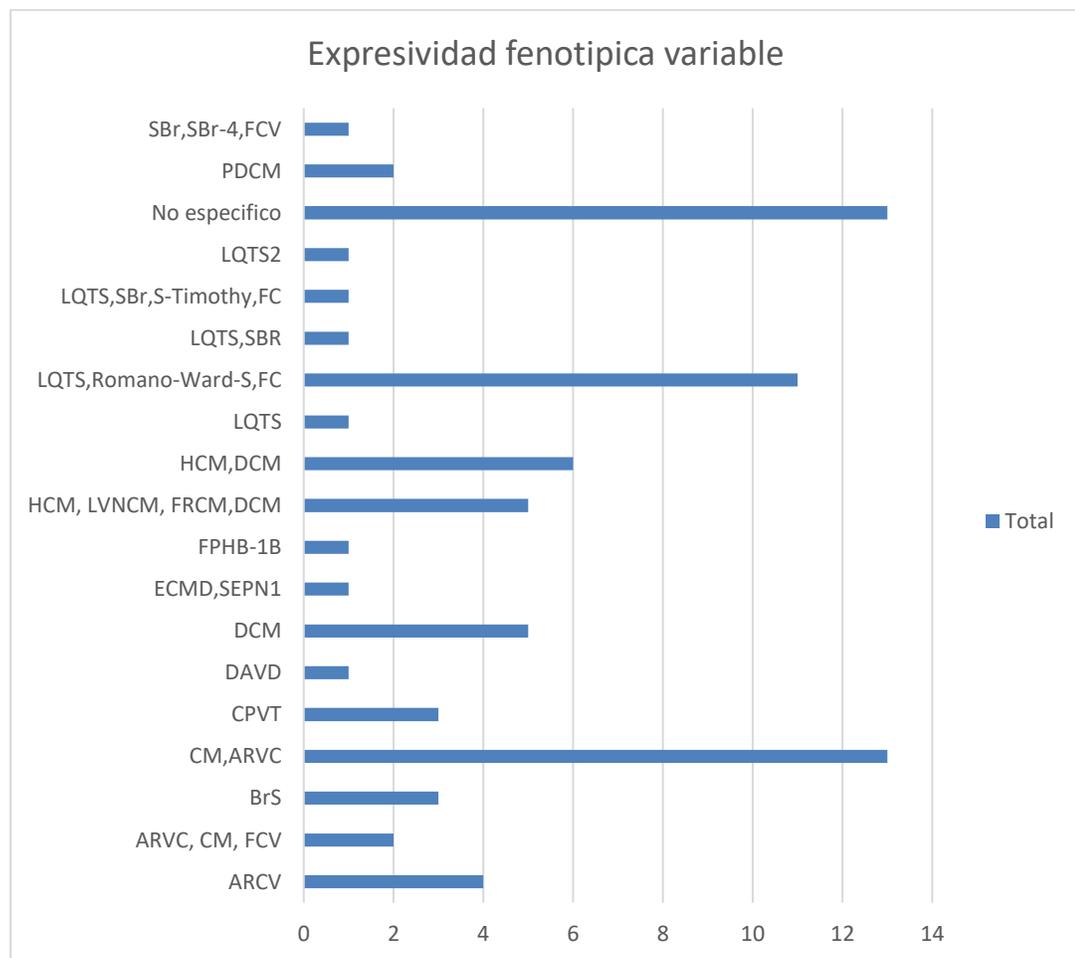


Figura 20 Fenotipos de las diferentes variantes encontradas en la presente tesis.

En cuanto al número de variantes encontradas por gen, se relacionan en la figura 3.5, se puede observar que los genes con el mayor número de variantes el gen TTN (11). Lo cual es de esperar por ser el gen más largo, seguido de ANK3, CACNB2, DSP, KCHH2 y AKAP9, son genes ampliamente estudiados y asociados a diferentes fenotipos de cardiomiopatías y canalopatías cardiacas (Ingles J. et al. 2019; Asatryan B, Medeiros-Domingo A. 2019; Mazzaccara C, et al. 2022; Spielmann, N. et al. 2022)

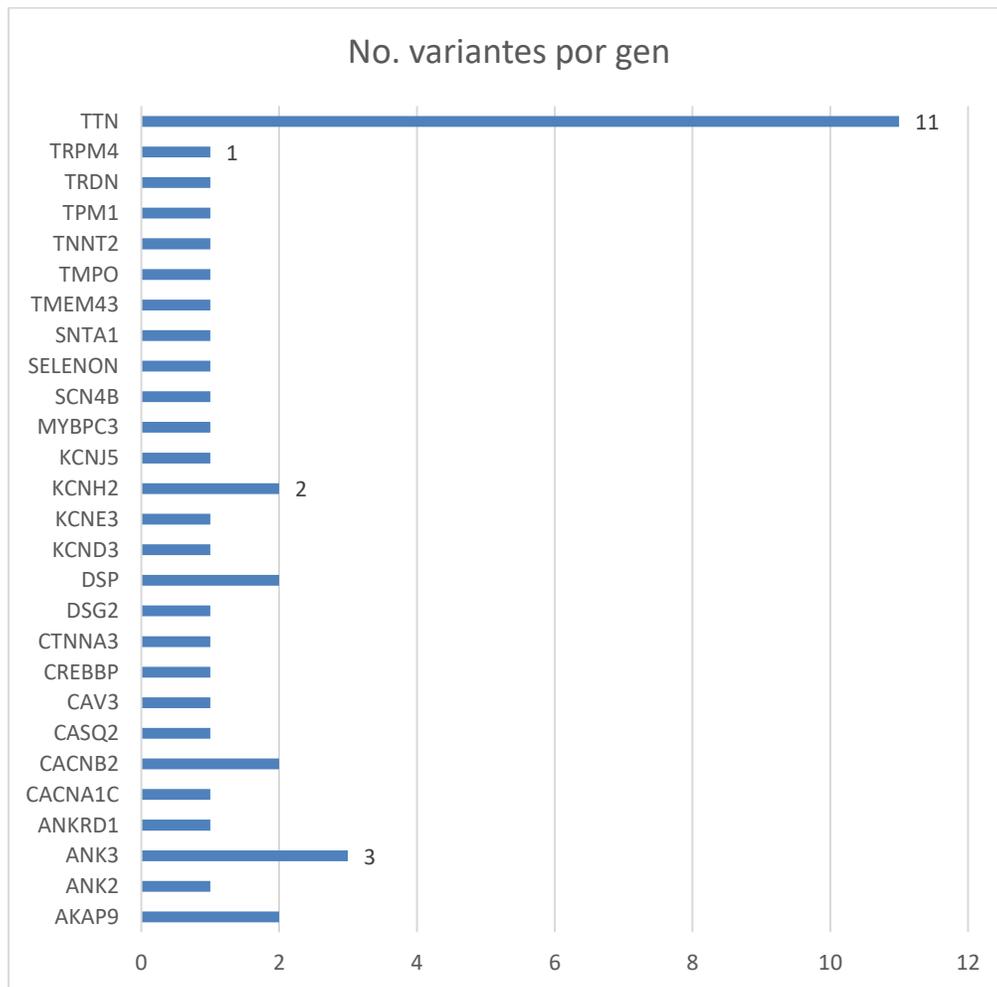


Figura 21 Numero de variantes detectadas por gen

Después de realizar filtros adicionales teniendo en cuenta las frecuencias con un MAF < 0.05 en la base de datos de mil genomas, y sumando las variantes obtenidas en el capítulo 1, se encontraron en total en este estudio 43 variantes en 27 genes en 45 casos de los que se obtuvo alguna(s) variante(s) asociadas a enfermedades cardiacas (miocardiopatías y canalopatías), siendo el gen TTN (11), ANK3 (3), KCNH2, DSP, CACNA1C y AKAP9 con 2 variantes respectivamente.

Para el gen KCNH2, en los casos 75 y 76 se encontró una variante en estado heterocigota, a diferencia del caso 6 que se encontró en estado homocigota previamente descrita en el capítulo 1, y a la cual se le realizó diferentes análisis funcionales *in silico* que fueron publicados (Joseph AA., et al 2022).

Si bien el fenotipo y el riesgo dependen del gen, pero sobre todo de la mutación específica identificada, así como la presencia de factores adicionales genéticos y ambientales, en todos los genes hay variantes de mayor o menor riesgo y otras que no son patogénicas. Con el conocimiento actual se ha visto que hay grupos de variantes que comparten características y efectos funcionales similares, de ahí la importancia de realizar otros estudios complementarios, si bien en los casos de muerte súbita cardíaca, se propone estudios de co-segregación para confirmar la presencia de la variante, en el caso de las autopsias moleculares no se tiene acceso a familiares, por lo que se dificulta el abordaje de estos casos, sin embargo las herramientas computacionales pueden suplir esta limitante (O'neil MJ., et al. 2022).

En general, teniendo en cuenta que se procesaron 68 casos en total, se encontró que el 39.7% de los casos presentaron alguna variante para cardiomiopatías y un 26.47% de los casos variantes para canalopatías cardíacas. En un estudio realizado en el 2016 por Bagnall R., et al, en 490 casos analizados, encontraron que el 24% fueron a causa de enfermedad arterial coronaria, el 16% de los casos a miocardiopatías hereditarias y el 40% a muerte súbita inexplicada (Bagnall R., et al, 2016). La patogenicidad de las variantes se evaluó, utilizando múltiples herramientas, como bases de datos del proyecto 1000genomas y de Genome y exome AD, herramientas bioinformáticas y diferentes algoritmos de predicción de la patogenicidad.

Por otra parte, teniendo en cuenta el análisis *in silico* de enfermedades cardíacas utilizando la base de datos del proyecto mil genomas (1000g), se procedió a realizar una comparación de las frecuencias génicas Figura 3.8.

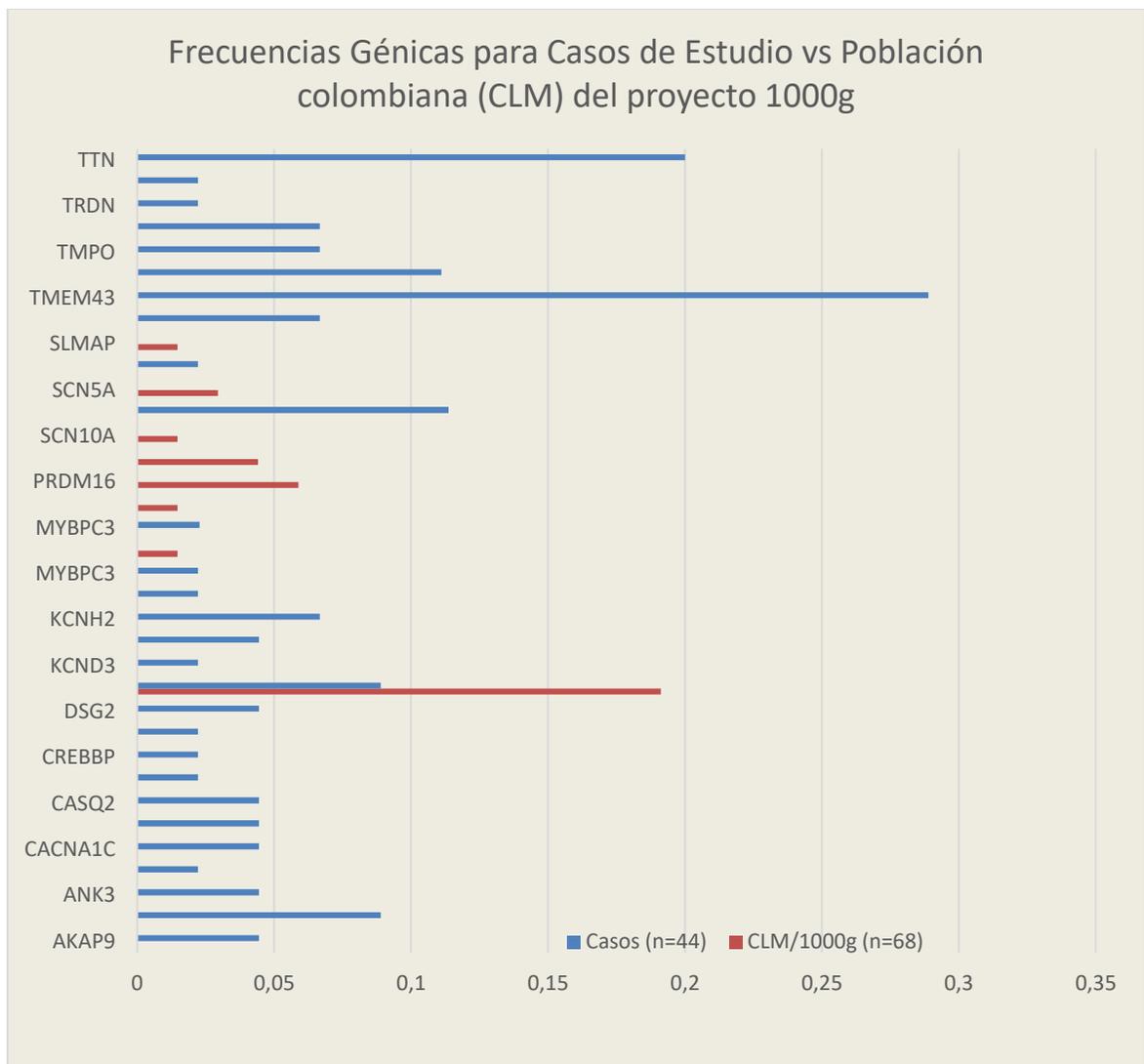


Figura 22 Comparación de frecuencias genotípicas entre los resultados obtenidos del análisis *in silico* y las obtenidas en la presente tesis.

Se observa que para el proyecto de 1000g para la población colombiana, se obtuvieron variantes en 8 genes, mientras que en el presente estudio resultaron en 27 genes, lo importante de destacar es que tanto en el proyecto de 1000g como en el presente estudio se identificaron variantes para el gen DSP. Esto podría suponer que, aunque para la base de datos 1000g, se seleccionaron individuos aparentemente sanos, no se puede descartar la presencia de portadores de un fenotipo cardíaco y más con el gen DSP que este asociado a la miocardiopatía hipertrófica.

Limitaciones en este estudio incluye la falta de perfiles lipídicos postmortem, la incapacidad de probar funcionalmente las variantes patogénicas o probablemente patogénicas encontradas y el poder realizar estudios complementarios de co-segregación por falta de familiares.

4. Análisis funcional de variantes encontradas

4.1 Introducción

Las miocardiopatías hereditarias como la miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada y la miocardiopatía arritmogénica, son difíciles de diagnosticar ya que presentan mínimos cambios estructurales en el corazón (Chugh SS, et al., 2008; Kaltman JR., et al., 2011). Las canalopatías no son asociadas a cambios anatómicos, pero afectan el ritmo cardíaco y la conducción eléctrica cardíaca desencadenando un paro cardíaco repentino, que igualmente dificulta su diagnóstico postmortem (Chugh SS, et al., 2008; Tester D., et al 2012).

En los últimos años con el desarrollado de la secuenciación masiva en paralelo o secuenciamiento de próxima generación (NGS por su sigla en inglés), permite secuenciar el genoma y el exóma completo de un paciente, para analizar la totalidad de los genes de un individuo. Esta metodología ha permitido identificar un gran número de variantes genéticas, sin embargo, la validación de todas ellas mediante estudios funcionales electrofisiológicos puede ser costosa y llevar mucho tiempo. Una posible estrategia para superar ese desafío, es evaluar cada variante posiblemente patogénica mediante un enfoque bioinformático (Wei, Q., et al. 2010; Teng, S. et al. 2008)

Diferentes algoritmos de predicción y modelos estadísticos se han desarrollado para explorar la asociación entre las variantes genéticas y las enfermedades, considerando la estabilidad de las proteínas, la conservación de secuencias, propiedades físicas y químicas, y las variaciones a nivel estructural (Schwartz, C. E. & Chen, C. F. 2013).

El análisis estructural ayuda al desarrollo de hipótesis sobre posibles impactos de las sustituciones y sus vínculos con los estados de la enfermedad. Los cambios de

aminoácidos pueden afectar tanto la función normal de una proteína al cambiar la red de enlaces de hidrógeno, la dependencia del pH, perturbar la unión a ligandos, la dinámica conformacional y la modificación transduccional (Stefl, S., 2013; Konstantinos F, et al. 2022).

Diferentes estudios han tenido en cuenta las variaciones estructurales de las proteínas y los cambios de energía libre al evaluar los efectos desreguladores (Zhang, Z., et al. 2010; Zhang, Z. et al. 2013; Boccuto, L. et al. 2013), demostrando la eficacia de predecir la influencia de los cambios de aminoácidos en las proteínas (Ahsan, T., Sajib, A.A. 2022).

En resumen, es bien sabido que la aparición de variantes en una secuencia es uno de los principales contribuyentes a la modificación estructural de las proteínas, lo que puede interferir con el plegamiento y/o el acoplamiento correcto. Por lo tanto, la combinación de los resultados bioinformáticos de las variantes genéticas con los análisis de estructura y función de proteínas puede mejorar las predicciones y facilitar la caracterización de la patogenia de las canalopatías cardíacas.

4.2 Objetivo

Caracterizar funcionalmente las mutaciones de los genes que se encuentren en el análisis exómico de personas fallecidas por muerte súbita cardíaca.

4.3 Metodología

A partir de las variantes obtenidas en el capítulo 1, se procedió a realizar un análisis funcional.

4.3.1 Predicción de Patogenicidad de Variantes

Se incluyeron 12 tipos de algoritmos predictivos *in silico* (SIFT (Ng PC, Henikoff S. 2003), PolyPhen-2 (Adzhubei IA. Et al., 2010), MutationTaster (Schwarz, J., et al. 2014), LRT (Chun S, Fay JC. 2009), Mutation Assesor (Reva, B. 2011), FATHMM (Functional Analysis Through Hidden Markov Models) (Shihab HA, 2013), MetaSVM (Dong C., et al 2013), RadialSVM, LR, CADD, GERP++ (Cooper GM, et al., 2010), phyloP (Siepel A., et al., 2010), SiPhy (Garber GM et al., 2009), para evaluar la patogenicidad de las variantes identificadas.

El filtrado de las variantes, se realizó mediante la determinación de la frecuencia del alelo menor (MAF). Se siguieron las normas y directrices para la interpretación de variantes sugeridas por el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) para la clasificación de causalidad de cada una de las variantes (Siepel A, et al., 2009; Garber M, et al. 2009; Richards S, et al., 2015; Li Q, Wang K.).

4.3.2 Predicción del impacto SNP en la estabilidad de la proteína

La estabilidad de las proteínas es el factor principal que afecta la función y la actividad de las moléculas biológicas. La energía libre del desdoblamiento de proteínas es fundamental para su estabilidad. Por lo tanto, el impacto de la mutación en la estabilidad de la proteína podría determinarse con precisión estudiando el efecto de la mutación en la energía libre

I-Mutant3.0: es una herramienta basada en máquinas de soporte vectorial (SVM), predice si una mutación de SNP estabiliza o desestabiliza la estructura de la proteína calculando el cambio de energía libre ($\Delta\Delta G$) y la dirección del cambio después de la mutación de la proteína en un solo punto, a través de predicciones de acoplamiento con la herramienta FOLD-X basada en energía; puntuaciones positivas aumentan la estabilidad de la proteína, mientras que una puntuación negativa indica desestabilización (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/>).

I-Mutant, puede predecir los cambios de estabilidad en proteína con un 80% de precisión en base a su estructura y con 77% de precisión basado en su secuencia (Capriotti E, et al., 2005).

MuPro: es una herramienta en línea de análisis estructural para el cálculo de variaciones de estabilidad de proteínas en SNP arbitrarios, (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>) (Cheng J., et al. 2006).

Para los resultados predictivos finales de las herramientas I-Mutant 3.0 y Mupro, establecimos un criterio restringido. Cuando se integraron los resultados de las dos herramientas bioinformáticas anteriores, el SNP que en las dos herramientas *in silico* predijeran que "Disminuiría" se consideraría como un "SNP patógeno de alto riesgo ARX" debido a la desestabilización de la proteína.

MutPred2: método basado en el aprendizaje automático que integra datos genéticos y moleculares para inferir probabilísticamente la patogenicidad de las sustituciones de aminoácidos y sus mecanismos moleculares, mediante la predicción general de patogenicidad y una lista clasificada de alteraciones moleculares específicas que pueden afectar el fenotipo (Pejaver V. et al., 2020).

4.3.3 Análisis de especificidad genómica por ShinyGO

ShinyGO analiza la especificidad genómica de los genes en comparación con el genoma completo. Se comparan cuatro aspectos: número de exones, número de isoformas de transcripción por gen, extensión del genoma y longitud de 3'-UTR (región no traducida) (Ge SX, et al. 2020).

Las características novedosas de ShinyGO incluyen la visualización gráfica de los resultados de enriquecimiento y las características de los genes, y el acceso a la interfaz del programa de aplicación (API) a KEGG y STRING, para la recuperación de diagramas de vías y redes de interacción proteína-proteína. ShinyGO es una aplicación web gráfica e intuitiva que puede ayudar a los investigadores a obtener información procesable de las listas de genes. Disponibilidad: <http://ge-lab.org/go/>.

Gene Ontology (GO) es una base de datos única que describe las características y localización celular de cada gen (Ashburner et al. 2000). KEGG es una base de datos que contiene un gran número de rutas metabólicas conocidas de los genes (Kanehisa et al., 2017).

Análisis de especificidad genómica

ShinyGO es una herramienta gráfica de enriquecimiento de conjuntos de genes para organismos modelo (Steven Xijin Ge and others, 2020). Nosotros usamos ShinyGO para analizar la información genómica de estos genes, incluido el número de exones, la longitud de UTR del gen, la longitud del gen, etc. Las diferencias significativas en la ubicación genómica se extrajeron para su posterior análisis.

4.3.4 Efecto de la mutación en la estructura 3D de la proteína

Para el análisis del efecto del SNP en la estructura 3D de las proteínas y propiedades fisicoquímicas se utilizó el servidor HOPE (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>), que busca estructuras 3D de proteínas mediante la recopilación de información estructural de una serie de fuentes, incluidos cálculos en las coordenadas 3D de la proteína, anotaciones de

secuencia de la base UniProt y predicciones de los servidores DAS (Distributed Annotation System) (Phobius, PHDacc, PHDsec, Net Phos) (Venselaar H. et al., 2010). Además, describe la reacción y propiedades fisicoquímicas de las mutaciones. Se envió como datos de entrada la secuencia de la proteína y la mutación al servidor, el resultado es el análisis de las variaciones estructurales y conformacionales de las sustituciones de un solo aminoácido.

4.3.5 Análisis de Interacción proteína-proteína y redes funcionales

Adicionalmente, se realizó un análisis de interacción proteína-proteína y redes funcionales, para investigar las relaciones directas físicas y funcionales entre genes identificados, con la base de datos (STRING) (<http://string.embl.de>) (Mering V. 2005). La base de datos STRING proporcionó una puntuación para cada interacción gen-gen, calculada como la probabilidad conjunta de las probabilidades de los diferentes canales de evidencia (interacción de proteínas, fusión, coexpresión, etc.), se construyó una red funcional aproximada sobre la base del perfil de expresión de las proteínas identificadas en el presente estudio. La entrada de datos fue el nombre de la proteína y el organismo y, por último, se utilizó el servidor GeneMANIA (<http://www.genemania.org/>) (Warde-Farley D. et al., 2010), es un enfoque para reconocer la función de la proteína mediante la integración de múltiples fuentes de genómica y proteómica para hacer inferencias sobre la función de proteínas desconocidas. La entrada fueron los genes *MYBPC3*, *KCND3*, *TTN*, *ANK3*, *KCNH2* y *CTDSP2*, mientras que la salida fue una imagen que muestra la interacción de la red biológica entre esos genes y sus genes correlacionados.

4.4 Resultados y Discusión

Con los algoritmos de predicción de patogenicidad de las 72 variantes (Tabla 2.1), en el 41.66% no se logró obtener resultados de predicción de patogenicidad por alguno de los algoritmos de predicción utilizados. De 72 variantes reportadas, se encontró que el análisis con *SIFT* (26) variantes son perjudiciales; con Polyphen2 (28) perjudiciales y (8) probablemente perjudiciales; para *Mutation Taster* (28) perjudiciales. Con referencia a los otros algoritmos de predicción hay una discrepancia en la predicción de patogenicidad. Para los algoritmos de predicción de conservación de la secuencia, como es *GEPP++RS*

con punto de corte mayor a 4.4, se encontró que en 14 de las variantes no hay conservación de la secuencia. Para CADD con un punto de corte de 20, se encontraron 12 variantes dañinas.

Si bien hay discrepancia en los resultados con los algoritmos de predicción de patogenicidad, nos permite seleccionar aquellas variantes que necesitan estudios adicionales en silico, para comprender el mecanismo molecular y poder clasificar de una mejor forma si la variante en realidad puede llegar a ser patogénica.

Para algunos de los siguientes análisis, se tomaron las variantes que nos parecieron más relevantes o que se tenía una estructura cristalográfica definida con la cual, poder comparar nuestros resultados y así hacer un análisis un poco más acertado.

Tabla 4 1. Lista de variantes analizadas por *SIFT*, *PolyPhen2*, *Mutation Taster*, *LRT*, *Mutation Assesor*, *FATHMM*, *MetaSVM*, *RadialSVM*, *LR*, *CADD*, *GERP++*, *PhyloP* y *SiPhy*.

Gen	Cambio AA	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	Mutation Taster	Mutation Assessor	FATHMM	Radial SVM	LR	CADD phred	GERP++ RS	
AKAP9	p.R1614Q	T	P	B	N	N	N	T	T	T	19.25	1.43	
AKAP9	NM_147185:c.-124G>C	T	P	P	N	N	N	T	T	T	17.94	1.68	
ANK2	p.G2212S	.	D	B	N	D	L	T	T	T	13.77	3.85	
ANK3	p.T3720M	D	D	P	N	D	L	T	T	T	16.37	5.3	
ANK3	p.P1489S	D	D	D	D	D	M	T	D	D	17.55	5.69	
ANK3	p.D2319N	T	D	P	D	D	M	T	T	T	23.8	5.94	
ANKRD1	NM_014391:c.-145T>C	T	P	D	N	N	N	T	T	T	22.73	8.64	
CACNA1C	p.R1897C	T	D	P	N	N	N	T	T	T	17.08	4.26	
CACNA1C	c.A578G;p.Q193R	T	D	P	N	N	N	T	T	T	25.08	4.26	
CACNB2	c.C1651G;p.R551G	D	D	D	D	D	L	T	D	T	16.61	5.91	
CACNB2	NM_201593:exon2:c.121-2A>T	D	P	T	.	T	17.82	5.7	
CASQ2	NM_001232:c.*503G>A	D	B	T	.	T	21.32	5.49	
CASQ2	NM_001232:c.*503G>A	D	B	T	.	T	13.69	4.92	
CAV3	p.Y62C	D	D	D	D	D	M	D	D	D	17.36	3.44	
CREBBP	c.G712C;p.V238L	T	D	P	D	D	N	T	T	T	20.1	6.01	
CTNNA3	c.C5689T;p.R1897C	D	D	D	N	D	L	T	T	T	19.83	5.19	
DSG2	p.V920G	T	P	B	N	N	L	T	T	T	13.78	2.5	
DSP	p.E1234V	T	D	D	D	N	L	T	T	T	20.4	5.2	
DSP	c.C12G;p.N4K	D	P	B	D	D	N	T	T	T	17.69	3.02	
DSP	c.C12G;p.N4K	D	D	P	B	D	D	N	T	T	T	17.69	3.02
KCND3	p.R571H	D	D	D	D	D	M	D	D	D	28.7	5.63	
KCNE3	NM_005472:c.*1383C>T	T	D	.	N	.	.	T	.	T	15.27	5.35	
KCNE3	NM_005472:c.*1383C>T	D	D	P	.	.	.	T	.	T	18.59	4.68	
KCNH2	p.R92P	T	D	D	N	D	M	D	D	D	20.7	3.49	
KCNH2	NM_172057:exon7:c.1672+2T>G	T	B	.	.	D	21.0	3.87	
KCNH2	NM_172057:exon7:c.1672+2T>G	T	B	.	.	D	21.0	3.87	
KCNJ5	c.C121T;p.R41C	D	D	P	N	D	L	D	D	D	25.4	5.79	
MYBFC3	p.Q998E	D	D	D	.	D	M	T	T	T	21.2	4.1	
SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C	
SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C	
SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C	
SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C	
SCN4B	NM_001142349:c.*1071T>C	
SELENON	NC_000001.11:25809790:C:T	
SNTA1	NM_003098:c.*343G>A	
SNTA1	NM_003098:c.*343G>A	
SNTA1	NM_003098:c.*343G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TMEM43	NM_024334:c.-142G>A	
TNNT2	NM_001001432:c.*66G>A	
TNNT2	NM_001276347:c.*66G>A	
TNNT2	NM_001001430:c.*66G>A	
TNNT2	NM_000364:c.*66G>A	
TNNT2	NM_001001431:c.*66G>A	
TPM1	NM_001018020:c.*119T>C	
TPM1	NM_001365778:c.*119T>	
TPM1	NM_001365778:c.*119T>C	
TRDN	p.V66I	T	D	D	D	D	L	T	T	T	19.57	5.82	
TRPM4	p.S789G	T	D	P	D	D	M	T	T	T	16.5	5.09	
TTN	p.W16260C	D	D	D	.	D	H	D	D	D	12.74	5.87	
TTN	p.I24660T	D	P	P	.	D	L	T	T	T	14.53	5.59	
TTN	p.A1969T	D	D	D	.	D	L	T	T	T	12.34	5.12	
TTN	p.S5499T	D	D	D	.	D	M	T	T	T	14.29	6.03	
TTN	p.P22367L	D	D	D	.	D	H	T	D	D	19.08	6.03	
TTN	p.P1698L	D	D	D	.	D	M	T	T	T	11.85	5.05	
TTN	p.P16475Q	D	D	D	.	D	H	T	D	D	18.28	5.55	
TTN	c.C74017T;p.R24673C	D	D	D	.	D	M	T	T	T	18.85	5.52	
TTN	c.C41053T;p.P13685S	D	D	P	.	D	H	T	D	T	13.54	5.78	
TTN	c.A1884C;p.R628S	D	P	P	.	N	L	T	T	T	13.14	4.75	
TTN	p.R6833X	D	.	.	.	A	58	0.77	
TTN	p.R13330X	D	.	.	.	A	58	0.77	

4.4.1 Predicción del impacto de SNP en la estabilidad de proteínas

- **Predicción de la estabilidad de la proteína con I-Mutant 2.0 y Mupro**

Los cambios en la estabilidad de la proteína de las variantes se examinaron utilizando el software I-Mutant 2.0 y Mupro (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Estabilidad proteica de los SNP por I-Mutant 3.0 y Mupro: MUPro: predice que la mutación podría desestabilizar relativamente la proteína o no. Puntuación menor que cero, significa que la sustitución disminuye la estabilidad de la proteína. Por el contrario, la puntuación >0 significa que la mutación aumenta la estabilidad de la proteína. I-Mutante: predice si una mutación puntual estabiliza o desestabiliza la estructura de la proteína nativa en función del cambio de energía libre ($\Delta\Delta G$).

Gen	rsID	Cambio a nivel de proteína	I-Mutant 3.0 Predicción	RI	DDG valor predicción	MuPro Predicción	MuPro Score
DSP	rs78652302	p.E1234V	Incrementase	2	0.09	Disminuye	-0.57600156
TTN	rs776534823	p.A1969T	Disminuye	3	-0.60	Disminuye	-1.0005569
TTN	rs181189778	p.S5499T	Disminuye	0	-0.32	Disminuye	-0.65558429
TRPM4	rs138603244	p.S789G	Disminuye	9	-1.12	Disminuye	-1.3670468
TTN	rs75686037	p.P1698L	Disminuye	4	-0.44	Incrementa	0.83737709
DSG2	rs142841727	p.V920G	Disminuye	9	-2.02	Disminuye	-2.2447524
MYBPC3	rs11570112	p.Q998E	Incrementa	4	-0.16	Disminuye	-0.73155586
TRDN	rs372169818	p.V66I	Disminuye	6	-0.45	Disminuye	-0.76372025
AKAP9	rs2230768	p.R1614Q	Disminuye	4	-0.33	Disminuye	-0.59876134
ANK2	rs61734478	p.G2212S	Disminuye	4	-1.01	Disminuye	-0.40436484
CACNA1C	rs185788586	p.R1897C	Disminuye	6	-1.08	Disminuye	-0.67510594
TTN	rs746749916	p.W16260C	Disminuye	8	-1.64	Disminuye	-0.3799672
TTN	.	p.I24660T	Disminuye	7	-2.01	Disminuye	-1.8524381
CAV3	rs753990961	p.Y62C	Incrementa	2	-1.07	Disminuye	-0.94970534
TTN	rs759415579	p.P22367L	Incrementa	2	-0.30	Disminuye	-0.38920806
ANK3	rs201547988	p.T3720M	Disminuye	4	-0.39	Disminuye	-0.37011007
ANK3	rs41274676	p.P1489S	Disminuye	9	-1.90	Disminuye	-1.4299976
KCND3	rs186194682	p.R571H	Disminuye	6	-1.20	Disminuye	-0.7320396
TTN	rs541464855	p.P16475Q	Disminuye	8	-1.29	Disminuye	-1.0325811
KCNH2	.	p.R92P	Disminuye	6	-0.52	Disminuye	-1.5125869
ANK3	rs140463162	p.D2319N	Incrementa	2	-0.22	Disminuye	-0.60154872
KCNJ5	rs115012103	p.R41C	Disminuye	6	-1.02	Disminuye	-0.64107663
SCN4B	rs117263855	p.G8S	Disminuye	5	-0.93	Disminuye	-0.75335627
CTNNA3	rs373233387	p.Q193R	Incrementa	1	-0.21	Disminuye	-0.73344844
CACNB2	rs61733968	p.R551G	Disminuye	3	-1.45	Disminuye	-1.9082555
DSP	rs78652302	p.E1234V	Incrementa	6	0.48	Disminuye	-0.57600156
DSP	rs368802003	p.N4K	Disminuye	3	-0.24	Disminuye	-1.2003101

Los resultados predijeron un aumento o una disminución de la energía libre tras las sustituciones de aminoácidos. I-Mutant, predice la estabilidad examinando la energía libre de Gibbs por valor $\Delta\Delta G = \Delta G$ (Nueva proteína) - ΔG (Tipo salvaje) en kcal/mol, que se calcula a pH 7 y 25 °C. El algoritmo predice puntuaciones <0 para indicar una menor estabilidad, mientras que se considera que las puntuaciones >0 indican una mayor

estabilidad. La predicción de DDG ($\Delta\Delta G$) de I-Mutant 2.0 mostró que los 17 (72,3 %) nsSNP tenían un valor de estabilidad reducido con $DDG < 0$, mientras que -10 (22,7 %) nsSNP tenían un valor de estabilidad aumentado con $DDG > 0$. Con respecto a MUPro informó que 1 (4,5%) sustituciones aumentaron la estabilidad de la estructura de la proteína mientras que 21 (95,5%) sustituciones la redujeron.

- **Análisis de predicción de la estabilidad de la proteína con MUPred2**

MutPred2, permite conocer los cambios de los mecanismos moleculares, que prácticamente remodelan el funcionamiento del corazón, esto se observa en la tabla 2.3.

El remodelado cardiovascular se define como un conjunto de cambios moleculares, celulares e intersticiales que se producen en el corazón y los vasos a causa de diferentes lesiones. Los cambios de tamaño, geometría y función son los eventos clave que ocurren en el corazón. La fisiopatología incluye muerte celular, cambios en el metabolismo energético, inflamación, estrés oxidativo, alteración en la matriz extracelular, activación neuro hormonal y cambios en el transporte de iones (Azevedo, P.S. 2016).

Para el caso de KCNH2 que codifica la subunidad α Kv11.1 del canal K^+ (K_v) dependiente de voltaje, cuatro subunidades α de Kv11.1 se coensamblan en un canal iónico tetramérico que conduce la corriente de K^+ rectificadora retardada de activación rápida (I_{Kr}) en el corazón (M.C. Trudeau, et al. 1995), el gen KCNH2 codifica un polipéptido de 1159 aminoácidos que se pliega en 6 hélices α transmembrana, numeradas S1-S6, una hélice de poro situada entre S5 y S6, y extremos N y C citoplasmáticos (Morais C JH et al, 1998).

Dado que el corazón sufre diferentes estímulos fisiológicos, su adaptación patológica puede conducir a cardiomiopatías, disfunción cardíaca y en última instancia e insuficiencia cardíaca (Litviňukova M, et al. 2020). Los datos de modelos animales y de pacientes humanos apuntan hacia la conjugación y desconjugación equilibrada de la SUMOilación, que es una modificación postraducciona transitoria con modificadores similares a la ubiquitina pequeña (SUMO1, SUMO2 y SUMO3) unidos covalentemente a sus proteínas diana a través de una cascada enzimática de varios pasos (Kho C. 2011, Maejima Y., Sadoshima J. (2014); Kim EY., et al. 2015). La SUMOilación modifica las interacciones proteína-proteína, la actividad enzimática o la unión a la cromatina en una multitud de

procesos celulares clave, actuando como un interruptor molecular altamente dinámico (Heusch G. 2020; Chen Y. et al. 2021; Cai Z. et al. 2021), en el presente estudio se encontró pérdida de SUMOilación en la proteína del gen KCNH2, que hace suponer que esta proteína, junto con pérdida de la hélice y ganancia en la hebra pierda su estabilidad funcional teniendo una alta probabilidad de incidencia en la presencia del LQTS2.

Las mutaciones en el gen KCNH2 causan LQTS2, que es la segunda causa más común de LQTS congénito y responsable del 35% al 45% de todos los LQTS genotipados (Duncan G, et al., 2017), y que un 25% de los casos de LQTS no son diagnosticados, lo que dificulta la identificación en grupos familiares y aún se desconoce en gran medida los determinantes de la variabilidad en la gravedad de la enfermedad, porque algunos miembros pese a tener la mutación resultan asintomáticos (Wilde AAM, et al, 2022).

En el corazón, la ganancia de glicosilación ligada-O, se reconoce como un mecanismo importante involucrado en la regulación de muchos procesos celulares, incluido el metabolismo celular, la función mitocondrial, el control de calidad y el recambio de proteínas, la autofagia y el manejo del calcio.

La glicación puede alterar la función y la estabilidad de las proteínas e inducir la síntesis de moléculas patogénicas que favorecen la aparición y progresión de diferentes enfermedades, entre las que se encuentran las cardiovasculares (Cho SJ, et al. 2007; Dozio E. et al. 2017).

Uno de los primeros estudios que informaron los efectos de la glicosilación ligada-O en las proteínas del corazón se publicó en 1996 y sugirió un papel protector potencial de la glicosilación ligada-O, independientemente de la hiperglucemia. En ese trabajo, Roquemore et al. mostró que, en el corazón de rata, tenía una pequeña proteína de choque térmico alfa B-cristalina, también llamada HspB5, es un objetivo de glicosilación ligada O. En el corazón, la alfa B-cristalina reduce la agregación de filamentos de actina (es decir, paracrystalales), desempeñando así un papel protector durante condiciones de estrés agudo como la isquemia (Roquemore, E.P. et al. 1996).

Tabla 4 3. Predicción estabilidad de las proteínas con MutPred2 para las variantes de los genes KCNH2, ANK3, TTN, CTDSP2 y CAV3.

ID	Substitution	MutPred2 score	Remarks	Mecanismos moleculares con P-values <= 0.05	Probabilidad	Valor -P	Motivos PROSITE y ELM afectados
NP_742053.1_KCNH2	R92P	0.812	-	Perdida de helice	0.30	5.3e-03	ELME000002, ELME000102, ELME000233, PS00007
				Ganancia de hebra	0.30	2.7e-03	
				Perdida de SUMOilación en K93	0.21	0.03	
ANK3	P1489S	0.594	-	Interfaz ordenada alterada	0.25	0.02	ELME000052, ELME000053, ELME000063, ELME000106, ELME000173, ELME000336
				Ganancia de glicosilación ligada O en T1491	0.24	9.6e-03	
				Proteina transmembrana alterada	0.15	0.01	
				Ganancia de escisión proteolítica en R1486	0.14	0.02	
				Perdida de sulfatación en Y1494	0.01	0.05	
TTN	P16475Q	0.755	-	Proteina transmembrana alterada	0.30	1.4e-04	ELME000052, ELME000062, ELME000117, ELME000136, ELME000159, ELME000202
				Interfaz ordenada alterada	0.28	0.04	
				Ganancia de hebra	0.26	0.04	
				Perdida de ADP-ribosilación en R16472	0.23	0.02	
TTN	P1698L	0.845	-	Proteina transmembrana alterada	0.20	5.5e-03	None
				Union a metal alerado	0.19	0.02	
TTN	P16475Q	0.755	-	Estabilidad alterada	0.28	6.6e-03	ELME000052, ELME000063, ELME000070, ELME000182, PS00001
				Proteina transmembrana alterada	0.16	0.01	
				Pérdida del enlace disulfuro en C24664	0.12	0.04	
				Ganancia de glicosilación ligada a N en N24658	0.06	0.02	
TTN	P1698L	0.845	-	Proteina transmembrana alterada	0.20	5.5e-03	None
				Union a metal alerado	0.19	0.02	
TTN	I24660T	0.707	-	Estabilidad alterada	0.28	6.6e-03	ELME000052, ELME000063, ELME000070, ELME000182, PS00001
				Proteina transmembrana alterada	0.16	0.01	
				Pérdida del enlace disulfuro en C24664	0.12	0.04	
				Ganancia de glicosilación ligada a N en N24658	0.06	0.02	
TTN	P22367L	0.723	-	Gain of Phosphorylation at Y22368	0.26	0.03	ELME000080
CTDSP2	I106T	0.823	-	Estabilidad alterada	0.63	8.1e-04	ELME000220, ELME000333, PS00006
				Union a metal alerado	0.29	3.4e-03	
				Perdida de sitio catalítico en E110	0.19	0.01	
CAV3	Y62C	0.702	-	Interfaz ordenada alterada	0.35	2.5e-03	ELME000052, ELME000053, ELME000063, ELME000080, ELME000120, ELME000182
				Ganancia de hélice	0.28	0.02	
				Proteina transmembrana alterada	0.20	5.3e-03	
DSP	N4K	0,586	-	Interfaz desordenada alterada	0.16	0.05	ELME000285, PS00005
				Perdida de acetilación N-terminal de M1	0.02	6.2e-03	

En condiciones hiperglucémicas, el aumento de la producción de superóxido mitocondrial promueve la actividad HBP y la glicosilación ligada-O de diferentes sustratos, como el factor de transcripción Sp1, que puede desempeñar un papel en el inicio y la progresión de las complicaciones de la diabetes mellitus (DM). Teniendo en cuenta que la glicosilación ligada O del factor de transcripción Sp1 reduce la expresión de glutatión S-transferasa P (GSTP) en el hígado, podemos suponer que el mismo mecanismo también podría dar lugar a una respuesta reducida a las agresiones oxidativas en el corazón (Oliveri, L.M. 2021).

Por otro lado, el aumento crónico de la glicosilación ligada-O que se produce en la DM se ha asociado con la miocardiopatía (Fricovsky, E.S. 2012; Erickson, J.R., 2013; Qin, C.X. 2017). Prakoso y colaboradores mostraron un aumento significativo en los niveles de proteínas glicosilación ligada-O, OGT y OGA en biopsias del ventrículo izquierdo de pacientes con DM sometidos a cirugía de derivación coronaria en comparación con pacientes sin DM. Además, el nivel total de glicosilación ligada-O se correlacionó directamente con la glucemia y la HbA1c e inversamente con la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (Prakoso, D. et al., 2021).

Estos hallazgos parecen sugerir que los niveles elevados de UDP- glicosilación y glicosilación ligada-O, resultantes de la hiperglucemia, pueden estar asociados con una función cardíaca alterada. Un estudio realizado en ratones diabéticos mostró, en cambio, que la sobreexpresión de OGA mediada por adenovirus mejora las propiedades contráctiles del corazón (Hu, Y. et al., 2005). Quizás, la glicosilación ligada-O de proteínas cardíacas puede ejercer efectos protectores o dañinos según el momento de la activación, a saber, aumento a corto plazo o crónico, respectivamente.

La O-GlcNAcylation juega un papel en una amplia gama de procesos (pato) fisiológicos en el sistema cardiovascular, incluido el cardio protección isquémica, la hipertrofia, las complicaciones diabéticas, la hipertensión y la insuficiencia cardíaca (Wende AR, 2016; Banerjee PS. Et al, 2016).

El papel de la glicosilación ligada-O en la regulación de la función cardiovascular es complejo y que como la mayoría de los estudios se centran en su papel en la fisiopatología cardiovascular. Por otro lado, a medida que empezamos a entender más acerca de las funciones celulares reguladas por la proteína glicosilación ligada-O, es cada vez más claro

que un concepto más preciso sería que la modificación de glicosilación ligada-O de las proteínas cardiovasculares es un proceso dinámico que es fundamental para mantener la función normal de los cardiomiocitos (Wende AR., 2016; Wang X, et al. 2016).

La arginina es uno de los aminoácidos naturales más comunes y juega un papel importante como sitio de reconocimiento para otras proteínas o ARN y como precursor de la síntesis de óxido nítrico (NO) (Maxwell, A. J. & Cooke, J. P. 1998). Estos sitios de reconocimiento son la clave para las actividades y estructuras enzimáticas (Morris, S.M., Jr. 2006).

Los cambios en la modificación de proteínas pueden hacer que las proteínas pasen de estados activos a inactivos o alteren sus actividades y provoquen numerosos eventos celulares en estados patológicos. Los residuos de arginina de las proteínas juegan un papel importante en asegurar las interacciones electrostáticas entre las enzimas y la superficie celular cargada negativamente (Lazo J.S et al. 2001).

En 1997, se presentó a la arginina como una posible nueva terapia farmacológica para el proceso aterogénico que conduce a la enfermedad coronaria (Cooke JP and Tsao PS. 1997). Los efectos anti aterogénicos de la arginina están especialmente demostrados en sujetos humanos con aterosclerosis ya puede atenuar modestamente el aumento de la reactividad plaquetaria (Wolf A, et al. 1997).

A través de la mejora de la producción de NO, la restauración de la vasodilatación y la inhibición de la progresión de la aterosclerosis, la arginina beneficia a los pacientes con trastornos cardiovasculares. Estos trastornos incluyen enfermedad arterial coronaria y periférica, daño por isquemia/reperfusión e insuficiencia cardíaca, todos los cuales están asociados con una síntesis de NO alterada y disfunción endotelial (Maxwell, A. J. & Cooke, J. P. 1998, Schlüter, K. D. 2015).

La sulfatación de proteína tirosina (PTS) es una modificación postraduccional, la PTS es catalizada por la tirosilproteína sulfotransferasa (TPST) a través de la transferencia de un sulfato activado de 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato a tirosina en una variedad de proteínas y péptidos la proteína tirosina sulfatada están involucradas en muchos procesos biológicos, incluida la hemostasia, el rodamiento de leucocitos en las células endoteliales, las funciones visuales, la entrada viral en las células y la unión de algunos, muchas de estas proteínas sulfatadas en tirosina participan en interacciones proteína-proteína

impulsadas por el reconocimiento, al menos en parte, del grupo sulfato (Kanan, et al., 2013 y Kannan Y., et al 2014).

Después de un infarto del miocardio, los nervios simpáticos vuelven a crecer a través del miocardio no dañado, pero no pasan a través de la cicatriz debido a la presencia de proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG: juega un papel importante en el crecimiento del axón), lo que provoca una heterogeneidad en la inervación simpática aumentando el riesgo de arritmias y muerte súbita cardiaca (Fallavollita et al., 2014; Herring NKalla, MPaterson DJ. 2019). En el presente estudio se encontró que la variante en la proteína ANK3, produce una ganancia de glicosilación ligada-O, se altera la proteína transmembrana, produce pérdida de sulfatación en tirosina y altera el orden interfásico, lo cual tiene una alta probabilidad de tener efectos nocivos en la regulación del corazón.

Igualmente, en las Proteína TTN, CDSP2 y CAV3, se establece también pérdida y o cambios de los mecanismos moleculares, que prácticamente remodelan el funcionamiento del corazón, lo que implica que estas variantes, provocan pérdida en la estabilidad de la proteína, que puede ser causa de la presencia de enfermedades arritmogénicas.

La acetilación N-terminal es una modificación postraduccional llevada a cabo por acetiltransferasas N-terminales (NAT) en cadenas de proteínas nacientes durante la traducción, participan en la maduración de proteínas contraduccionales, afectan fisicoquímicamente a la extremidad N-terminal de la mayoría de las proteínas (Aksnes et al., 2019). La pérdida de acetilación N-terminal y su papel previamente no anticipado en la biogénesis de proteínas, remodela globalmente el proteoma para crear un fenotipo único (Kha The Nguyen, et al. 2019).

Teniendo en cuenta lo anterior variantes patogénicas en DSP con pérdida NAT, podría conllevar a la fusión anormal contráctil de las células cardíacas, adicional porque esta proteína se encarga de unir el desmosoma cardiaco con los filamento intermedios, alteraciones en esta biosíntesis podría desencadenar miocardiopatía arritmogénica que se estima que afecta del 0.02% al 0.1% de la población con un mayor riesgo de muerte súbita cardiaca e insuficiencia cardiaca (Corrado et al., 2017; Gerull et al., 2019).

- **Análisis de enriquecimiento con GO**

Análisis del enriquecimiento GO de los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNA1C, CACNB2, CASQ2, CAV3, CTNNA3, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP, SNTA1, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPMP4 y TTN, mediante ShinyGO.

Se ha informado que cuanto más alto es el nivel jerárquico de los términos GO en la estructura de árbol, más explícita es la función biológica demostrada (Jain S, Bader GD.2010). Por lo tanto, solo los términos GO de enriquecimiento biológico con un valor de tasa de descubrimiento falso (FDR) inferior a 0,05 se mantuvieron como términos notablemente enriquecidos. Las vías con un valor de FDR inferior a 0,05 y que contienen al menos 5 genes se consideraron significativamente enriquecidas.

Se observa que las vías con mayor enriquecimiento biológico resaltadas en Tabla 4.4, se encontraron nueve vías relacionadas con conducción cardíaca, potencial de acción y repolarización de la membrana, causadas por defectos en los genes que codifican canales iónicos como potasio, sodio, y calcio o proteínas asociadas que alteran la generación y transmisión del potencial de acción que predisponen a arritmias fatales, como es el caso de los genes DSG2, KCNH2, DSP, KCNJ5, AKAP9, ANK2, CACNB2, KCND3, KCNE3, SCN4B, CTNNA3, y SCN5A implicados en las canalopatías cardíacas (Liu C. et al, 2013; Martínez-Barrios E., et al. 2022).

Tabla 4 4. Enriquecimiento biológico ShinyGO.

Enriquecimiento FDR	No. Genes	Vía Genes	Enriquecimiento pliegues	Vía	Genes
1256,943587	5	11	3,70065E+14	Potencial de acción de la célula del nódulo AV	CACNB2 SCN4B SCN5A SCN10A RYR2
1256,943587	5	11	3,70065E+14	Célula del nódulo AV al haz de señalización de células His	CACNB2 SCN4B SCN5A SCN10A RYR2
2,04292E-13	11	25	3,58223E+14	Repolarización de la membrana celular del músculo cardíaco ventricular	KCNH2 SNTA1 KCNJ5 AKAP9 ANK2 KCND3 KCNE3 SCN4B CAV3 SCN5A NOS1AP
1,5183E-06	9	21	3,48918E+14	registro de la repolarización de la membrana celular del músculo cardíaco ventricular	KCNH2 SNTA1 AKAP9 ANK2 KCNE3 SCN4B CAV3 SCN5A NOS1AP
2,83816E-15	13	34	3,1129E+14	Potencial de acción de las células del músculo cardíaco ventricular	DSG2 KCNH2 DSP SNTA1 KCNJ5 ANK2 KCND3 KCNE3 CAV3 CTNNA3 SCN5A RYR2 NOS1AP
4969,229302	5	14	2,90765E+14	Repolarización de la membrana durante el potencial de acción de las células del músculo cardíaco ventricular	KCNH2 KCNJ5 KCND3 KCNE3 NOS1AP
7357,844876	5	15	2,71381E+14	Comunicación del haz de His con el miocito de Purkinje	DSG2 DSP CTNNA3 SCN5A SCN10A
0,612051969	7	22	2,59045E+14	Despolarización de la membrana durante el potencial de acción de las células del músculo cardíaco	ANK2 ANK3 SLMAP CACNB2 SCN4B CAV3 SCN5A
131619,8334	4	13	2,50505E+14	registro del potencial de acción de las células del músculo cardíaco ventricular	DSG2 DSP CTNNA3 RYR2
0,008218532	8	27	2,41228E+14	registro del potencial de acción de las células del músculo cardíaco	DSG2 DSP AKAP9 ANK2 CAV3 CTNNA3 RYR2 NOS1AP
5,78813E-07	10	34	2,39454E+14	registro de repolarización de membrana	KCNH2 SNTA1 CASQ2 AKAP9 ANK2 KCNE3 SCN4B CAV3 SCN5A NOS1AP
2,56466E-11	12	41	2,38286E+14	registro de la frecuencia cardiaca por conducción cardiaca	DSG2 KCNH2 DSP KCNJ5 AKAP9 ANK2 CACNB2 KCND3 KCNE3 SCN4B CTNNA3 SCN5A
6,60817E-18	15	52	2,34849E+14	Potencial de acción de las células del músculo cardíaco implicado en la contracción	DSG2 KCNH2 DSP SNTA1 KCNJ5 ANK2 CACNB2 KCND3 KCNE3 SCN4B CAV3 CTNNA3 SCN5A RYR2 NOS1AP
190236387,4	3	11	2,22039E+14	Comunicación de la célula del nódulo SA con la célula del músculo cardíaco auricular	ANK2 SCN5A RYR2
8,94148E-11	12	45	2,17105E+14	repolarización de membrana	KCNH2 SNTA1 CASQ2 KCNJ5 AKAP9 ANK2 KCND3 KCNE3 SCN4B CAV3 SCN5A NOS1AP
26186,2998	5	19	2,14248E+14	Potencial de acción de las células del músculo cardíaco auricular	KCNJ5 ANK2 CACNB2 SCN5A RYR2
26186,2998	5	19	2,14248E+14	Señalización de células del músculo cardíaco auricular a células del nódulo AV	KCNJ5 ANK2 CACNB2 SCN5A RYR2
1,45932E-25	19	74	2,09037E+13	Potencial de acción de las células del músculo cardíaco	DSG2 KCNH2 DSP SNTA1 KCNJ5 AKAP9 ANK2 ANK3 SLMAP CACNB2 KCND3 KCNE3 SCN4B CAV3 CTNNA3 SCN5A SCN10A RYR2 NOS1AP
2,54198E-07	10	39	2,08755E+14	registro del movimiento basado en filamentos de actina	DSG2 DSP TNNT2 AKAP9 MYBPC3 ANK2 CAV3 CTNNA3 SCN5A RYR2
3,54913E-05	9	36	2,03536E+14	Despolarización de la membrana durante el potencial de acción	KCNH2 ANK2 ANK3 SLMAP CACNB2 SCN4B CAV3 SCN5A SCN10A

Tabla 4 5. Enriquecimiento molecular ShinyGO.

Enriquecimiento FDR	No. Genes	Vías Genes	Enriquecimiento pliegues	Vías	Genes
2595314,67	4	12	2,71381E+14	Actividad del canal de potasio dependiente de voltaje involucrada en el músculo cardíaco ventricular	KCNH2 KCNJ5 KCND3 KCNE3
3914323,131	4	15	2,17105E+14	Unión de óxido nítrico sintasa	SNTA1 CAV3 SCN5A NOS1AP
3,63898E+13	2	11	1,48026E+14	Unión a proteínas involucrada en la adhesión	DSG2 DSP
5,02076E+13	2	13	1,25253E+14	unión a titina	MYBPC3 ANKRD1
2611015095	3	24	1,01768E+14	Actividad del canal de sodio dependiente de voltaje	SCN4B SCN5A SCN10A
1,30897E+14	2	22	7,4013E+13	Actividad del canal de potasio rectificador	KCNH2 KCNJ5
1,30897E+14	2	22	7,4013E+13	Actividad de anclaje del citoesqueleto	ANK2 ANK3
2,92133E+14	1	11	7,4013E+13	Actividad de los canales de calcio	CACNB2
2,92133E+14	1	11	7,4013E+13	Actividad de la molécula estructural que confiere elasticidad.	TTN
0,000865976	12	140	6,97837E+14	Unión al transportador transmembrana	SNTA1 AKAP9 ANK2 ANK3 KCND3 KCNE3 SCN4B CAV3 SCN5A SCN10A TRDN RYR2
8709309595	3	38	6,42744E+14	Actividad reguladora de los canales de sodio	SNTA1 SCN4B CAV3
1,71884E+14	2	26	6,26264E+14	Unión a la subunidad reguladora de la	AKAP9 RYR2
3,36429E+14	1	13	6,26264E+14	Actividad del canal de potasio rectificador	KCND3
1,95452E+14	2	28	5,81531E+14	Unión de espectrina	ANK2 ANK3
3,49314E+14	1	14	5,81531E+14	Unión de cadenas pesadas de miosina	MYBPC3
3,49314E+14	1	14	5,81531E+14	Unión a la subunidad catalítica de proteína	RYR2
3,49314E+14	1	14	5,81531E+14	Unión de dominio de dedo RING de tipo	KCNH2
3,65446E+14	1	15	5,42762E+14	Actividad de histona metiltransferasa (específica de H3-K9)	PRDM16
3,65446E+14	1	15	5,42762E+14	Unión de actinina alfa muscular	TTN
1,2821E+13	3	46	5,30963E+14	Actividad del canal de sodio	SCN4B SCN5A SCN10A

En la tabla 4.5 se observa que, para el enriquecimiento molecular, los genes están implicados en la conformación, regulación de los diferentes canales iónicos dependientes de voltaje, así que cualquier alteración en alguna de las vías en las cuales interactúan resultara patogénica.

Usando la prueba de chi-cuadrado, el número de exones mostró un valor de p (0.0023) al comparar DEG con otros genes en el genoma. Además, el número de las isoformas de transcripción por gen fueron significativamente diferentes del valor esperado con un valor de p = 0,051. Estos resultados indicaron que nuestros DEG identificados podrían tener fuertes características de transcripción con otros genes, que podrían estar involucrados en las enfermedades cardíacas.

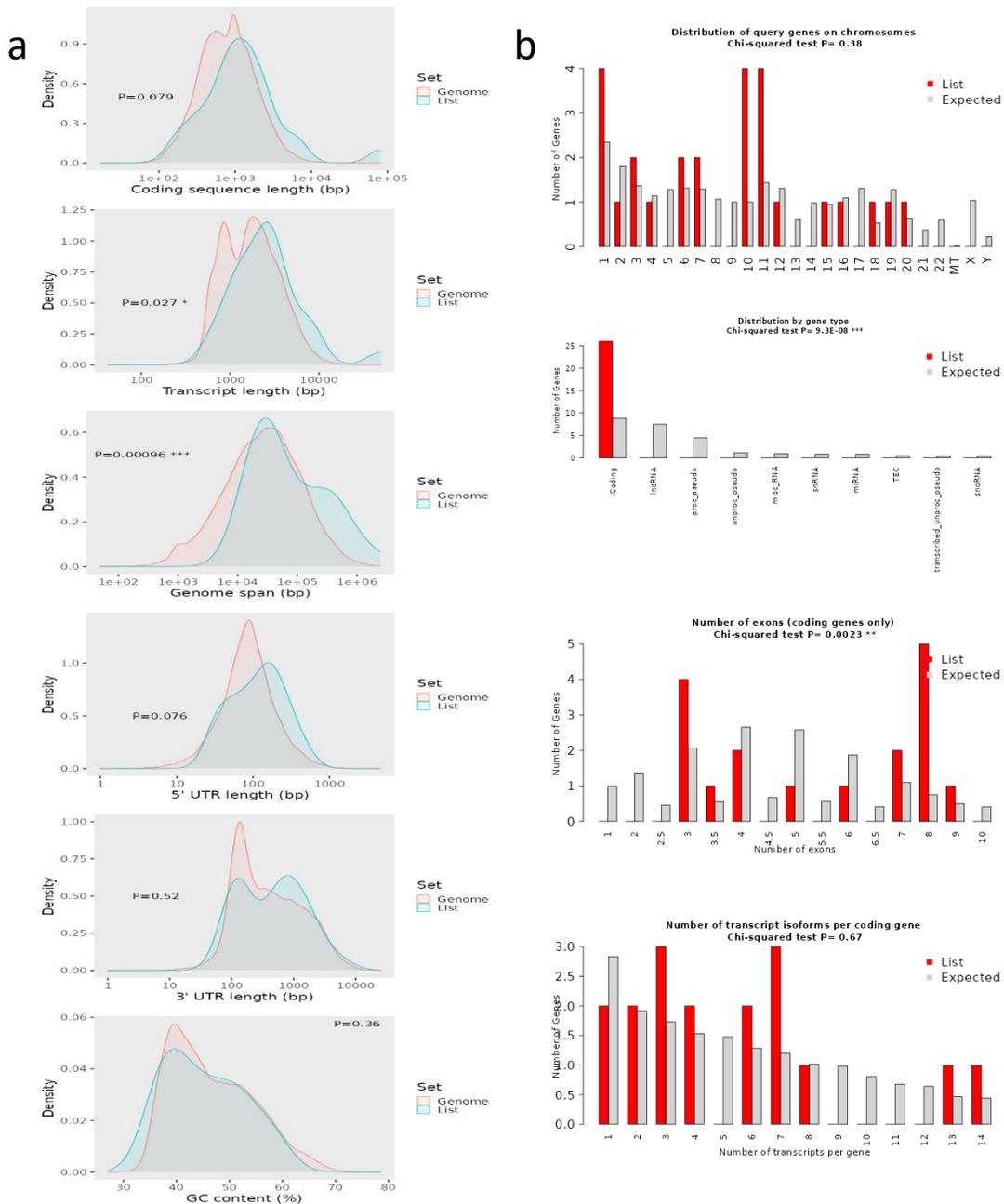


Figura 23 Comparación de los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNA1C, CACNB2, CASQ2, CAV3, CTNNA3, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP, SNTA1, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPMP4 y TTN con el resto de genes del genoma. Se ejecutaron pruebas de chi-cuadrado y t de Student para ver si los genes tienen características especiales en comparación con todos los demás genes: a) distribución de las longitudes de UTRs, b) distribución de los genes estudiados, en comparación con el genoma.

Para el análisis de extensión del genoma, observamos un valor p extremadamente bajo (0.00096), mientras que para la comparación de longitud 3'-UTR, observamos un valor p (0,52) y para 5'-UTR p (0.76). Existe una fuerte asociación entre estos genes y por lo tanto la presencia de variantes posiblemente patogénicas presentan un mayor riesgo de muerte debido a arritmias cardíacas, miocardiopatías y enfermedades coronarias. Por ejemplo, cerca del 50 % de los casos de ARVC están asociados con mutaciones en genes que codifican proteínas desmosómica y de adhesión celular necesarias para el acoplamiento mecano-eléctrico en el corazón (Towbion JA. 2014)

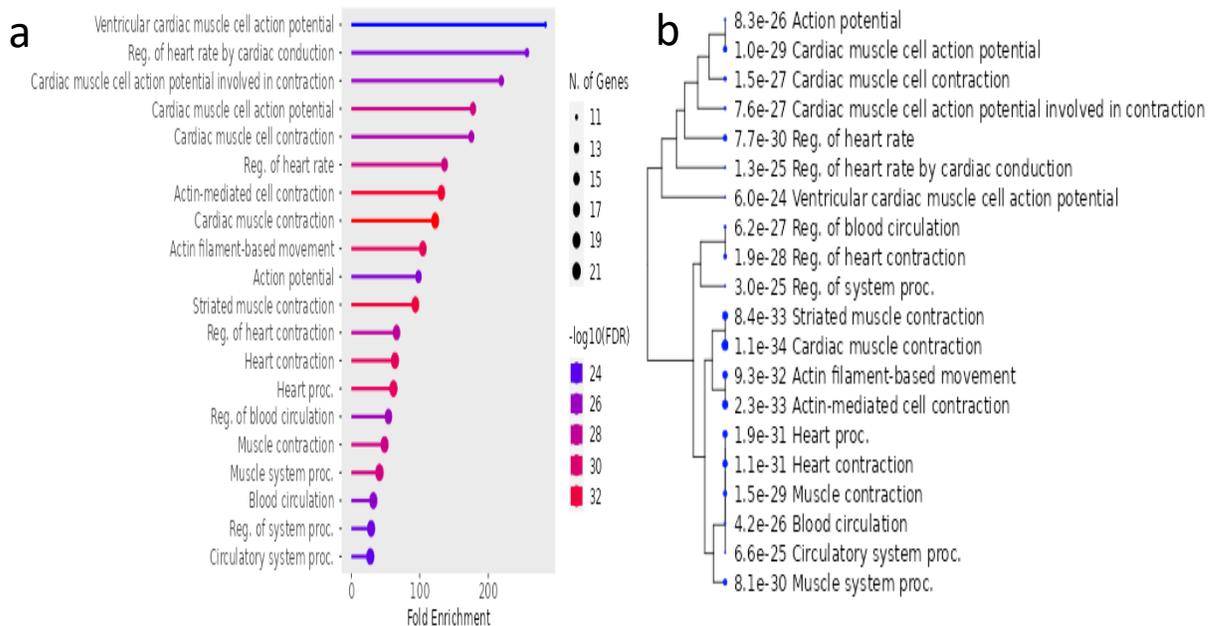


Figura 24 Enriquecimiento procesos biológicos en terminos de GO para los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNA1C, CACNB2, CASQ2, CAV3, CTNNA3, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP, SNTA1, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPMP4 y TTN ($p \leq 0.05$), a) el gradiente de color representa los valores ajustados y las diferencias en el tamaño de las burbujas se correlacionan con el factor de enriquecimiento; b) árbol de agrupamiento jerárquico, los términos GO relacionados se agrupan según la cantidad de genes que comparten. Los puntos más grandes indican valores de p más significativos.

En la figura 4.2, se puede observar la gran correlación que existe entre los genes estudiados, que todos ellos están no solamente interactuando, sino que participan en mucho de los procesos biológicos que tienen que ver con el corazón. Se ha informado

previamente, que cuanto más alto es el nivel jerárquico de los términos GO en la estructura del árbol, más explícita es la función biológica (Jain S, Bader GD. 2010)

Se construyeron las redes para los componentes biológicos, celular y molecular Figura 4.3.

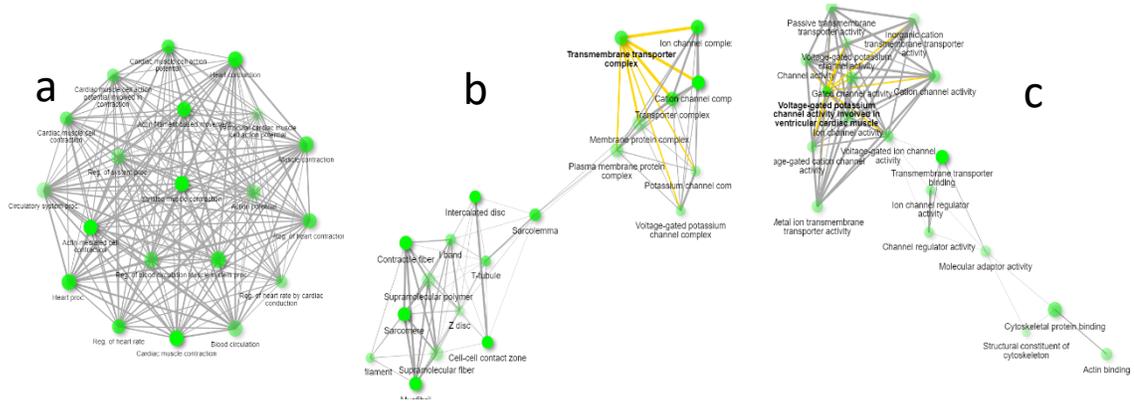


Figura 25 Redes de interacción de los genes estudiados a) componente biológico, b) componente celular y c) componente molecular.

Para el componente celular se observa que hay dos clústeres de interacción, uno correspondiente con los procesos celulares de contacto entre sarcolema, fibras de contracción, se podría decir que todo lo que tiene con el mecanismo de interacción celular a nivel físico y en el otro clúster los genes que tienen que ver con el transporte a través de los canales iónicos y sus proteínas asociadas. En el componente molecular (c), se observa en un gran clúster donde están incluidas todas las interacciones a nivel de los canales iónicos durante el potencial de acción.

Los mapas de rutas de KEGG son diagramas de red de interacción/reacción molecular representados en términos de los grupos de ortología KEGG, En la figura 4.4, se observa los diagramas de rutas enriquecidas y como los genes de estudiados están interactuando con las demás moléculas. Por lo tanto, cualquier variante en genes puede ocasionar la presencia de un mismo o diferente fenotipo.

Para adquirir información útil sobre el mecanismo molecular patogénico subyacente a la MSC, fue necesario identificar las vías bioquímicas enriquecidas en los genes candidatos. El enriquecimiento de la ruta para muerte súbita cardíaca se realizó mediante el uso de KEGG (figura 4.4), se encontraron tres vías bioquímicas principales asociadas la primera asociada a HCM, la segunda a DCM y la tercera a DM. Lo cual es concordante

con estudios previos, ya que la MCH es una de las principales causas de MSC (O'Mahony C, et al. 2014; Vriesendorp PA, et al. 2014), y la MCD es otra causa importante de MSC (Pahl E, et al., 2012; O'Mahony C., et al., 2019).

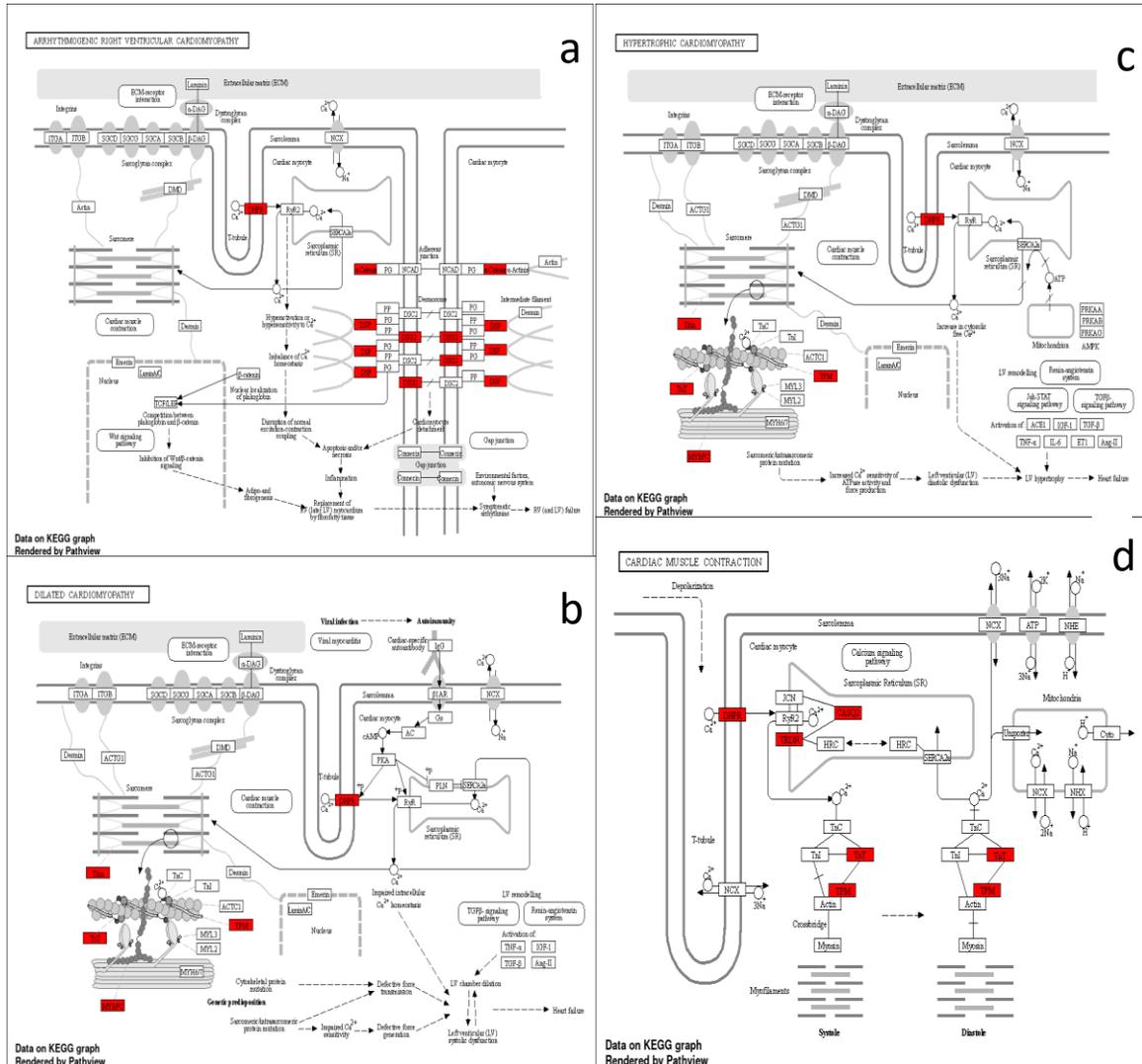


Figura 26. Ruta KEGG significativa para a) miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC), b) miocardiopatía dilatada (DM), c) miocardiopatía hipertrófica (HCM) y d) contracción del músculo cardíaco. Los genes de interés están resaltados en rojo.

La miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC) es una forma genética de miocardiopatía que generalmente se transmite con un patrón autosómico dominante y representa el 11-22% de los casos de MSC en la población de atletas jóvenes (Romero J, et al. 2013).

En este estudio, también se encontró enriquecido la ARVC, varias vías de señalización que están involucradas en el metabolismo celular y el comportamiento celular se enriquecieron mucho en nuestros resultados, incluida la vía de señalización del calcio, la vía de señalización de la oxitocina, la vía de señalización de GMP cíclico (cGMP)-proteína quinasa G (PKG), AMP cíclico (cAMP) vía de señalización, vía de señalización HIF-1 (en respuesta al estrés hipóxico), vía de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), lo que es consistente con estudios previos que sugieren que estas vías tienen funciones importantes en la MSC (Yeung CY, et al., 2012; Ackerman M, et al., 2016).

Predicción de la estructura 3D de las proteínas con alguna variante posiblemente patogénica.

El análisis Predicción de la estructura 3D, visualización y cambios fisicoquímicos de las sustituciones: para estudiar las propiedades biofísicas de estas mutaciones, se utilizó el servidor Project HOPE para cumplir este propósito, RaptorX se utilizó para predecir un modelo de estructura 3D para la proteína TTN, TRPM4 y KCND3 (Figura 4.5).

El análisis de la predicción de la estructura 3D mediante el servidor HOPE, arrojó para las variantes posiblemente patogénicas para el gen TTN:

4.5-a) Gen TTN: p.P1698L: el aminoácido Prolina cambia a Leucina en la posición 1698. Los aminoácidos de tipo salvaje y mutantes difieren en tamaño. El residuo mutante es más grande, esto podría dar lugar a golpes, la hidrofobicidad del residuo de tipo salvaje y mutante es diferente. Se perderán las interacciones hidrofóbicas, ya sea en el núcleo de la proteína o en la superficie.

4.5-b) p.W16260C: Los aminoácidos de tipo salvaje y mutantes difieren en tamaño, el residuo mutante es más pequeño que el residuo de tipo salvaje, la mutación causará un espacio vacío en el núcleo de la proteína. El residuo mutado se encuentra en un dominio que es importante para la unión de otras moléculas y en contacto con residuos en un dominio que también es importante para la unión. La mutación podría alterar la interacción entre estos dos dominios y, como tal, afectar la función de la proteína.

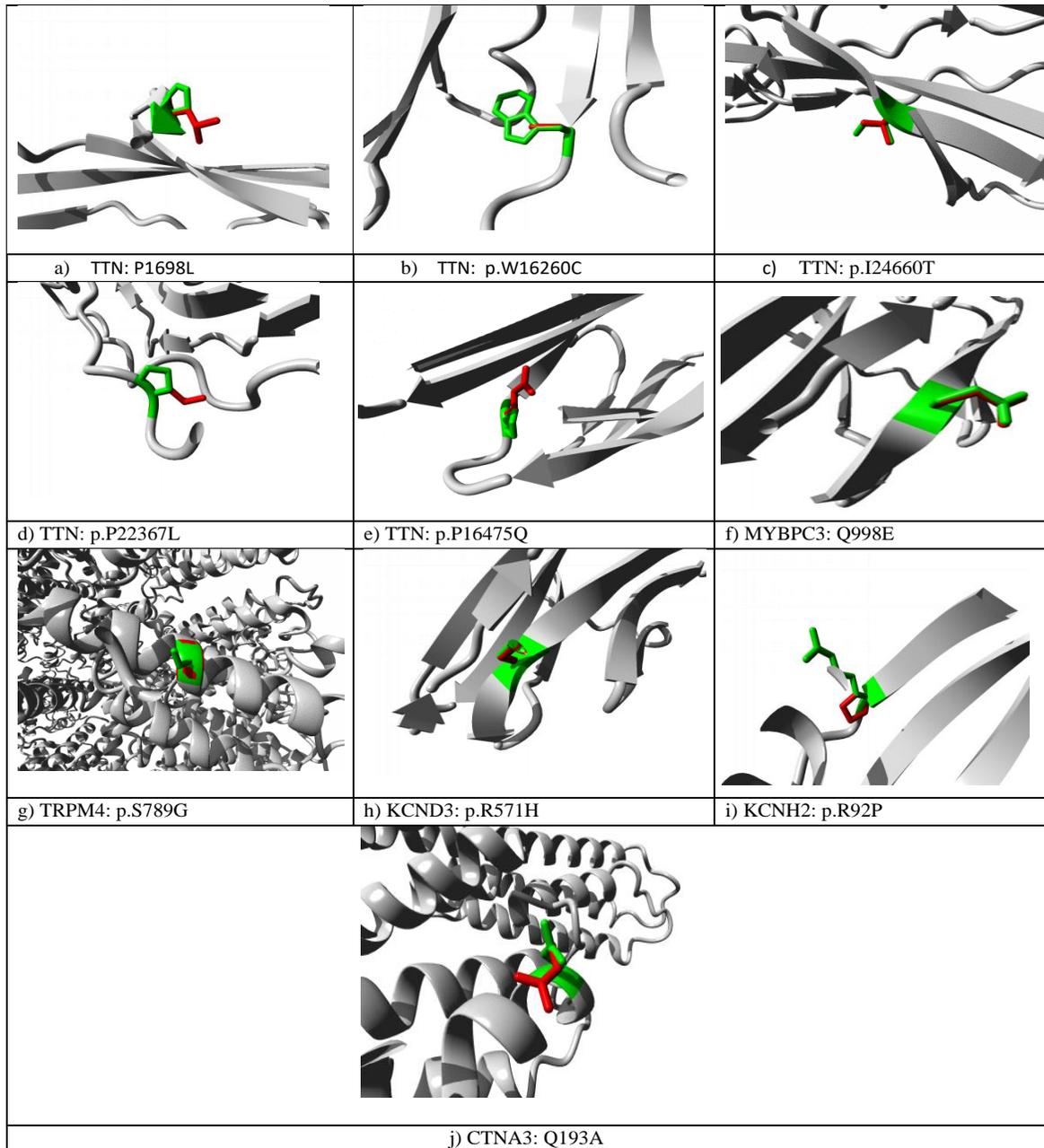


Figura 27 Primer plano para las variantes patogénicas de los genes TTN, MYPC3, TRPM4, KCND3, CTNA3 y KCNH2 genes. La proteína es gris, las cadenas laterales de los residuos de tipo salvaje color verde y mutantes de color rojo.

4.5-c) p.I24660T: los aminoácidos de tipo salvaje y mutantes difieren en tamaño, el residuo mutante es más pequeño que el residuo de tipo salvaje, la mutación causará un espacio vacío en el núcleo de la proteína, la hidrofobicidad de la naturaleza El tipo y el residuo

mutante difieren. La mutación provocará la pérdida de interacciones hidrofóbicas en el núcleo de la proteína.

4.5-d) p.P22367L: Los aminoácidos de tipo salvaje y mutantes difieren en tamaño. El residuo mutante es más grande que el residuo de tipo salvaje, el residuo de tipo salvaje estaba enterrado en el núcleo de la proteína. El residuo mutante es más grande y probablemente no quepa.

4.5-e) P16475Q: está dentro de un dominio, anotado en UniProt como Ig-120. La variante patógena provocará la pérdida de interacciones hidrofóbicas en el núcleo de la proteína. El residuo mutante es más grande y menos hidrofóbico.

4.5-f) MYBPC3: Q998E: se encuentra en un dominio UniProt como Ig-like C2-type 6 e introduce un ácido glutámico en esta posición. El residuo mutante tiene carga positiva y el residuo de tipo salvaje tiene carga neutra. El residuo de tipo salvaje está muy conservado, pero también se han observado otros tipos de residuos en esta posición. Ni el mutante ni ningún otro tipo de residuo con propiedades similares se observó en diferentes secuencias homólogas en esta posición. Según los puntajes de conservación, esta variante patógena probablemente daña la proteína.

4.5-g) TRPM4: p.S789G: Los aminoácidos de tipo salvaje y mutantes difieren en tamaño, el residuo mutante es más pequeño que el residuo de tipo salvaje. La mutación causará un espacio vacío en el núcleo de la proteína.

4.5-h) KCND3: R571H: introduce histidina en esta posición. El residuo mutante es minoritario y tiene carga neutra, mientras que el residuo de tipo salvaje tiene carga positiva. El residuo de tipo salvaje está muy conservado, pero también se han observado otros tipos de residuos en esta posición. El residuo mutante no se encontró entre los diferentes residuos observados en esta posición en otras proteínas homólogas.

4.5-i) KCNH2: R92P: introduce prolina en esta posición. El residuo mutado se encuentra en la superficie de un dominio con una función desconocida. El residuo mutante es más pequeño, más hidrofóbico que el tipo salvaje y de carga neutra. El residuo de tipo salvaje

forma un enlace de hidrógeno con la glutamina en la posición 84. Forma un puente salino con el ácido glutámico en la posición 90.

4.4.2 Análisis de interacción proteína-proteína

Las redes funcionales STRING de las proteínas TRDN, TTN, CAV3, DSP, DSG2, TRPM4, AKAP9, ANK3, ANK2, CACNA1C, MYBPC3, KCND3 y KCNH2, dieron como resultado una red funcional donde se observa un núcleo que representa una canalopatía cardíaca causada por el gen KCNH2 donde convergen otras proteínas que forman parte de la red y que tiene que ver con el potasio dependiente del voltaje. y Fase 0 - despolarización rápida, Fase 1 - inactivación de canales rápidos de Na⁺, y canal de Potasio, dependiente de voltaje, Kv3.1, canales de Potasio dependientes de voltaje, y Fase 3 - repolarización rápida, originando QT largo

síndrome 2; además de otras patologías relacionadas. Esto significa que sus proteínas tienen más interacciones entre sí de lo que se esperaría de un conjunto aleatorio de proteínas del mismo tamaño y grado de distribución extraídas del genoma. Tal enriquecimiento indica que las proteínas están al menos parcialmente conectadas biológicamente, como un grupo. Figura 4.6.

La red de estos genes al estar agrupada de esta forma indica, que sus proteínas tienen más interacciones entre sí de lo que se esperaría para un conjunto aleatorio de proteínas del mismo tamaño y distribución de grado extraídas del genoma. Tal enriquecimiento indica que las proteínas están al menos parcialmente conectadas biológicamente, como grupo.

Clúster 1 (color rojo): con valor de enriquecimiento PPI p- valor ($1.0e-16$), grado promedio del nodo (6.4) y coeficiente promedio de agrupamiento local (0.858). Conformado por los genes CACNA1C, CASQ2, CAV3, CTNNA3, RYR2, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN y TTN asociados a procesos biológico como: detección de estiramiento muscular, miocito de Purkinje para señalización de células del músculo cardíaco ventricular, liberación de iones de calcio secuestrados en el citosol por el retículo sarcoplásmico, regulación positiva del secuestro de iones de calcio, regulación del potencial de acción de las células del músculo cardíaco ventricular, entre otros; están asociadas a distrofia muscular Limb-girdle, SQTL, LVN, DCM, CPVT, ARVC, ICM, entre otros.

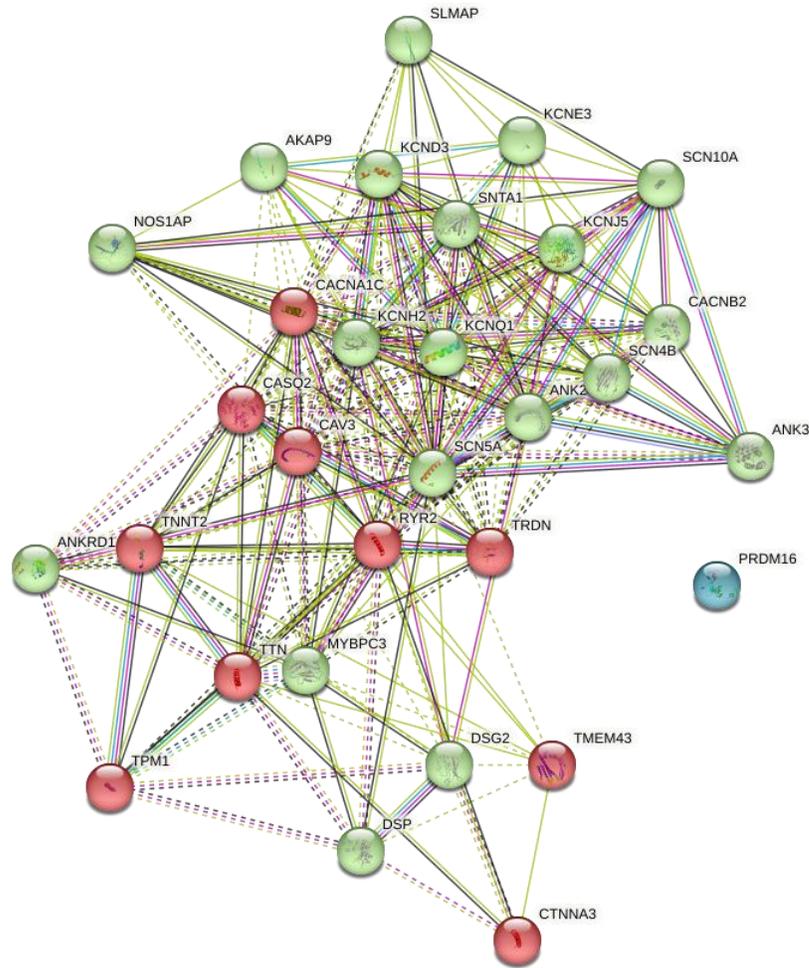


Figura 28 Red funcional de los genes TRDN, TTN, CAV3, DSP, DSG2, TRPM4, AKAP9, ANK3, ANK2, CACNA1C, MYBPC3, KCND3 y KCNH2 con tres clústeres: clúster 1 (rojo), clúster 2 (verde) y clúster 3 (azul).

Clúster 2 (color verde): con valor de enriquecimiento PPI p-valor ($1.0e-16$), grado promedio del nodo de (10.3) y coeficiente promedio de agrupamiento local de (0.831).

Conformado por los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNB2, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP y SNTA1, asociados principalmente a la regulación de la despolarización de la membrana durante el potencial de acción de las células del musculo cardiaco, despolarización de la membrana durante el potencial de acción de la célula del nodo atrioventricular, regulación del potencial de acción de las células del musculo cardiaco auricular, regulación del potencial de acción de las células del musculo cardiaco implicado en la regulación de la contracción y la organización del túbulo.

Asociados enfermedades como: arritmia cardíaca relacionada con anquirina B, síndrome de Timoty, síndrome LQTS13, LQTS 12, LQTS 3, , SQTS, BrS, ARVC, DCM, SIDS, enfermedad de conducción del corazón, entre otros.

Clúster 3 (color azul): con valor de enriquecimiento PPI p- valor (1), grado promedio del nodo de (0) y coeficiente promedio de agrupamiento local de (0). Conformado por el gen PRDM16 (PR dominio zinc finger proteína 16), se une al ADN y funciona como regulador transcripcional.

En la figura 4.7, se observa los genes de interés en círculos más grandes hacia el centro y alrededor la interacción con otros genes, la mayoría son genes también asociados a enfermedades cardíacas.

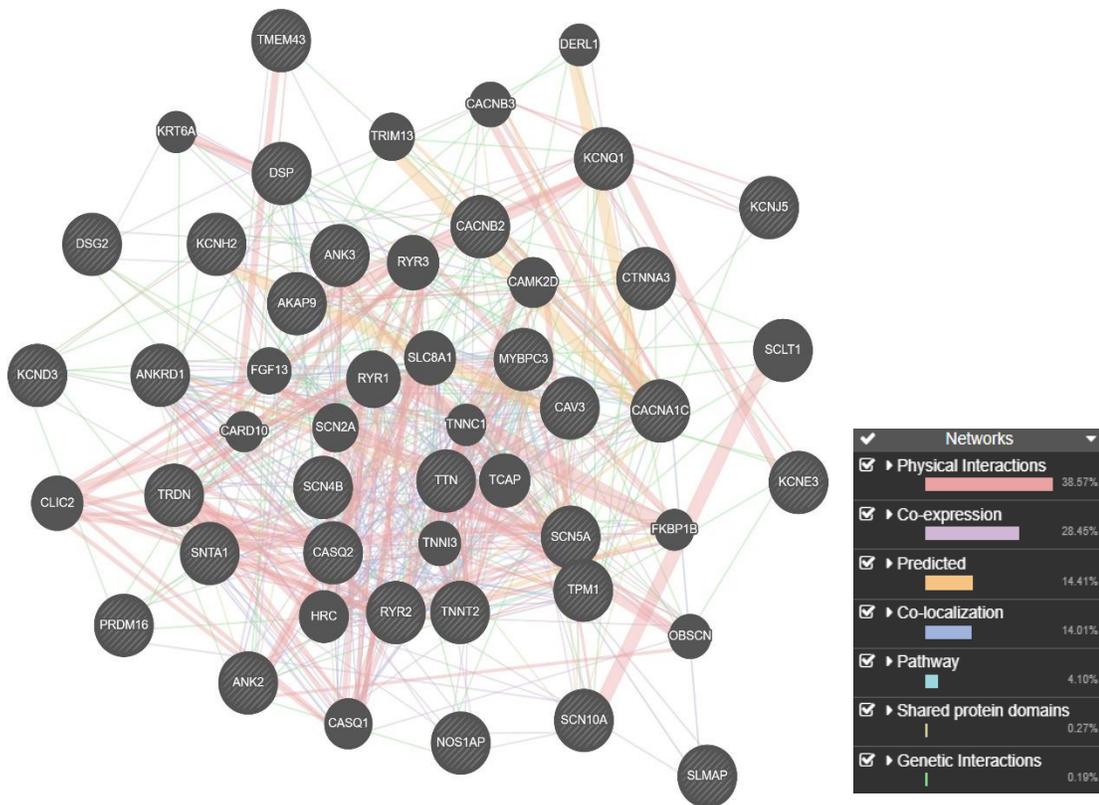


Figura 29 Red de interacción los genes AKAP9, ANK2, ANK3, ANKRD1, CACNA1C, CACNB2, CASQ2, CAV3, CTNNA3, DSG2, DSP, KCND3, KCNE3, KCNH2, KCNJ5, KCNQ1, MYBPC3, NOS1AP, PRDM16, RYR2, SCN10A, SCN4B, SCN5A, SLMAP, las En SNTA1, TMEM43, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPMP4 y TTN, con otros genes, proteínas asociadas a enfermedades cardíacas como cardiomiopatías y canalopatías,

adicional, se logró comprobar que las enfermedades cardiovasculares que desencadenan muerte súbita, no son causadas por un solo gen, en cambio es el resultado de la interacción de múltiples genes, por lo cual se puede decir que cada gen solo juega un pequeño papel en la aparición de la enfermedad (Roberts WC, 1990).

5. Conclusiones

5.1 Conclusiones Apoyo al diagnóstico molecular forense

Con este estudio se podría asociar las variantes: (i) AKAP9 (c.G4841A:p.R1614Q) y ANK3 (c.C11159T:p.T3720M y c.C4465T:p.P1489S) caso III y (ii) ANK2 (c.G6634A:p.G2212S) y CACNA1C (c.C5689T:p.R1897C) caso IV, con muerte súbita del lactante.

Después de una cuidadosa consideración, junto con un enfoque conservador, se concluyó de la variante KCNH2 (exón 2: c.G275C: R92P) homocigota contribuyo a la muerte del joven de 15 años (caso VI) en forma de LQTs tipo 2.

El análisis molecular apoyado por NGS permitió identificar variantes en los genes KCND3, CTDSP2, MYBP3, TTN y ACTN2 posiblemente relacionadas con MSC en un varón de quince años. Además, la variante homocigota en el gen KCNH2 asociada con el síndrome de QT largo tipo 2 sugiere que la muerte del paciente se debió a una canalopatía cardíaca.

Las variantes encontradas en los genes TRDN, TTN, CAV3, DSP, DSG2, TRPM4, AKAP9, ANK3, ANK2 y CACNA1C por sí solas no explicarían la causa de muerte, sin embargo, considerando las frecuencias poblacionales, los resultados de los predictores de patogenicidad, la presencia de dos o más variantes en el mismo gen o genes diferentes podría conducir a la muerte cardíaca súbita.

Cuando se trate de casos de muerte súbita en lactantes, se debe realizar investigación de otros genes asociados con otras enfermedades como podrían ser, genes congénitos de errores del metabolismo y enfermedades de inmunodeficiencia primaria y otras enfermedades hereditarias que puedan haber contribuido a la muerte.

La muerte súbita e inesperada de bebés o adultos puede atribuirse a una gran cantidad de enfermedades diferentes, de las cuales solo una es la enfermedad cardíaca hereditaria y

poder explorar las posibilidades de otras enfermedades en una persona fallecida trae muchos desafíos, especialmente cuando no se cuenta con la historia clínica.

Es importante que se mantenga una mente abierta sobre la(s) enfermedad(es), el(los) mecanismo(s) de la enfermedad y el(los) gen(es) que pueden estar asociados con la persona fallecida y contar con muestras de los padres resulta de gran importancia para realizar estudios de cosegregación e interpretación de los resultados.

La detección de variantes de significado incierto lleva a la necesidad de desarrollar guías forenses específicas que permitan una interpretación adecuada de las variantes genéticas raras, junto con un equipo multidisciplinario.

Finalmente, para evaluar mejor la prevalencia de estas variantes en los casos esporádicos de muerte súbita, es necesario realizar estudios moleculares en un número más significativo de casos.

5.2 Conclusiones del Análisis *in silico*

Las bases de datos son una fuente importante para conocer el estado de salud de las poblaciones, cuáles genes están interactuando y, para el tema de discusión, cuáles podrían ser de alto riesgo para desencadenar una cardiomiopatía o canalopatía que puede llevar a una muerte súbita de origen cardíaco.

Teniendo en cuenta que la base de datos de mil genomas es una buena representación de las poblaciones, se podría decir que por lo menos 48,56% de los individuos sanos presentan variantes asociadas a muerte súbita cardíaca y el 3,91% es portador de variantes patogénicas, este valor se puede incrementar a medida que logre dilucidar las variantes que presentan conflicto de interpretación de patogenicidad con los algoritmos de predicción.

Al observar la patogenicidad establecida en el presente estudio, por medio de los predictores de patogenicidad *in silico* de las bases de datos, se tiene que las poblaciones EUR, del SAS y AMR tienen un mayor riesgo de ser portadores de variantes asociadas a miocardiopatías, con frecuencias de 0.04076, 0.03885 y 0.01585, respectivamente, causada por el SNP (rs17604693) del gen DSP. Adicionalmente, se tiene que para las

poblaciones EUR, los Variantes (rs28763967 y rs78652302) ya se han establecido como causantes de miocardiopatías.

En cuanto a canalopatías cardíacas son las poblaciones AFR y las del EAS, con frecuencias de 0,08623 y 0.02213 correspondiente al SNP (rs7626962) del gen SCN5A, podrían ser las más afectadas, pero esto se debe evaluar, ya que este SNP presenta conflicto de interpretación de patogenicidad con los predictores.

Se deben realizar estudios más detallados encaminados a establecer el papel de variantes en las regiones 3' UTR y 5' UTR como posibles modificadores genéticos en cada uno de los genes, ya que esto permitirá en el futuro establecer protocolos de prevención o creación de dianas terapéuticas que permitan la disminución de casos de muerte súbita cardíaca a nivel mundial.

5.3 Conclusiones Prevalencia de variantes asociadas a canalopatías cardíacas y miocardiopatías

En este estudio se encontró una prevalencia de variantes en los principales genes asociados con enfermedades cardíacas, cardiomiopatías con (40.6%), hipercolesterolemia familiar con (5.4%), y a canalopatías cardíacas con (54%), adicionalmente del total de variantes, el 27% presentan conflictos de interpretación de patogenicidad que se deben estudiar con más detalle a futuro.

Con el estudio de cohorte retrospectivo de muerte súbita, se puede determinar una incidencia relativamente alta de enfermedades cardíacas genéticas desconocidas y más aún si tienen un componente familiar.

Con esta tesis, se sientan las bases de la importancia de incluir la autopsia molecular en todas las víctimas de SUD. Adicionalmente, se debe establecer con un grupo interdisciplinario, para el consejo genético que se le pueda brindar a miembros de la familia con el fin de prevenir futuros casos de SUD.

Hay varias cuestiones que deben abordarse en el futuro, incluida la implementación de las directrices nacionales para la investigación de autopsias de muerte súbita cardíaca en medicina forense, la recomendación de un panel de cribado genético molecular y la

implementación de un enfoque estandarizado para la recolección de los datos epidemiológicos en casos de muerte súbita inesperada.

5.4 Conclusiones del análisis funcional

Tanto el análisis de predicción de patogenicidad, como el análisis de enriquecimiento de funciones biológicas permiten determinar que el grupo de genes analizados participan en varios procesos biológicos y que la disfunción de estos genes puede conducir a la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Resulta de suma importancia cuando se presentan variantes patogénicas, probablemente patogénicas y de significado incierto, valerse de los análisis funcionales *in silico*, para tener una visión más amplia que permita un diagnóstico más acertado, dada la heterogeneidad genética y la variabilidad fenotípica que se presenta en este tipo de enfermedades.

El análisis de cosegregación con familiares en los casos de muerte súbita, resulta muy difícil, esta falencia se puede suplir con los análisis funcionales *in silico*, los análisis de predicción de patogenicidad, los análisis de enriquecimiento GO y la construcción de redes de interacción de proteína-proteína, ya que estos permiten comprender no solamente la contribución de los factores genéticos, sino también los mecanismos moleculares subyacentes a la muerte súbita cardíaca.

6. Limitantes en el estudio, perspectivas futuras y consideraciones éticas

6.1 Limitantes en el estudio

La secuenciación del exoma, mediante paneles de genes es una técnica útil para secuenciar un gran número de genes específicos y de forma rápida. En este estudio se partió de la selección de casos que posiblemente estaban asociados a muerte súbita cardiaca, por los estudios de autopsia médico legal. Este enfoque para el diagnóstico de casos, sin embargo, tiene limitaciones.

En primer lugar, estas técnicas tienen una tasa inherente de falsos negativos que es más alta, que la vista en la secuenciación de Sanger. Esto se debe a una combinación de baja cobertura en áreas particulares, secuencia faltante en áreas que no están cubiertas por tecnología de captura dirigida y secuenciación deficiente de áreas ricas en GC. Estos aspectos pueden explicar en parte por qué al menos el 30% de los casos permanecen sin diagnosticar. Una forma de minimizar estos problemas serían repetir la secuenciación en casos negativos usando diferentes tecnologías de captura para ver si eso revela otras variaciones perdidas con la primera ejecución de secuenciación.

En segundo lugar, las variantes que se detectan se pueden perder durante la etapa de filtrado, esto hace que variantes de importancia o variantes en nuevos genes se queden sin estudiar y que podrían proporcionar información valiosa para el diagnóstico de la causa de muerte.

Otro problema surge por las variantes que presentan conflictos de interpretación de patogenicidad, y para esto se deben desarrollar estrategias como análisis *in silico* adicionales que ayuden a discernir la patogenicidad o no de estas variantes.

La incapacidad de probar funcionalmente todas las variantes candidatas, en especial variante de secuencia (KCNH2: c.G275C:p.R92P) con estudios de cosegregación con familiares, para corroborar los resultados de patogenicidad realizados *in silico*. Puede ser que las variaciones en los casos no explicados residan en genes que no están

identificados, erróneamente identificados o en genes complementarios que codifican proteínas que interactúan con los canales iónicos, o que no eran el objetivo principal del estudio y por eso no se analizaron, para esta en el futuro se debería realizar una nueva secuenciación con el exoma clínico al segundo grupo de casos analizados y volver a analizar otros genes en los seis primeros casos.

Otros limitantes, que pudieron afectar la tipificación de las muestras, podría ser el almacenamiento de las muestras de sangre que, si bien están en refrigeración, no es el mejor método de almacenamiento, que deberían estar por lo menos a menos 20° centígrados, esto puede afectar la extracción del ADN y la construcción de las librerías.

En el país aún no cuenta con directrices para la investigación molecular de la autopsia de la muerte súbita cardíaca.

6.2 Perspectivas futuras

La investigación realizada dentro de esta tesis de doctorado forma una base sólida para un estudio genético forense prospectivo a largo plazo en casos de muerte súbita en Colombia.

Se deben explorar también las variaciones en el ADN mitocondrial (mtDNA), debido a su asociación emergente con la muerte súbita (Kytövuori L, et al. 2020; Kosho Y., et al. 2022) y como el mtDNA participa en gran medida en la producción de energía, que es vital para la supervivencia, muchas variantes del mtDNA no son compatibles con la vida (Kosho Y., et al. 2022).

Crear un protocolo para el abordaje molecular de casos de muertes inexplicadas, que pueden ser de diferente origen, cardíacas (cardiomiopatías y canalopatías), no cardíacas (epilepsia, trastornos metabólicos, etc.) y cuyos genes están interactuando constantemente en los diferentes procesos fisiológicos.

Diseñar un consentimiento informado para que los familiares de las víctimas de muerte súbita (SUDED), autoricen la toma de muestras para análisis molecular en caso de ser necesarias para el complemento de la autopsia médico legal.

Continuar con este tipo de análisis, con el fin de consolidar información genética que permita establecer una prevalencia de variantes patogénicas y de nuevos genes, en enfermedades cardíacas y no cardíacas que conlleven a una muerte súbita inexplicada.

Realizar cursos de capacitación a los médicos patólogos sobre la interpretación de los resultados genéticos que se obtengan en los casos de muerte súbita inexplicada.

6.3 Consideraciones éticas

En esta tesis de doctorado, es la primera investigación que se realiza en el país y que involucró el uso de muestras postmortem para el análisis molecular. La investigación requirió del uso de fluidos corporales lo que significa que se debía tener un consentimiento informado por parte de los miembros de la familia, esto se suplió en primer lugar, mediante la aprobación del comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y segundo lugar mediante el Decreto 0786 de 1990, haciendo énfasis en especial al Capítulo VI. De las Viscerotomías y los artículos 18, 19, y 20.

Bibliografía

Aksnes, H., Ree, R. y Arnesen, T. (2019). Funciones cotraduccionales, postraduccionales y no catalíticas de las acetiltransferasas N-terminales. *mol. Celda* 73, 1097–1114. doi: 10.1016/j.molcel.2019.02.007

A.N. Abou Tayoun, T. Pesaran, M.T. DiStefano, A. Oza, H.L. Rehm, L.G. Biesecker, ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion, *Hum. Mutat.* 39 (11) (2018) 1517–1524, <https://doi.org/10.1002/humu.23626>.

A.S. Amin, P.G. Meregalli, A. Bardai, A.A.M. Wilde, H.L. Tan, Fever increases the risk for cardiac arrest in the Brugada syndrome, *Ann. Intern. Med.* 149 (2008) 216–218. doi:10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00020.

Abbott GW. Novel exon 1 protein-coding regions N-terminally extend human KCNE3 and KCNE4. *FASEB J.* 2016 Aug;30(8):2959-69. doi: 10.1096/fj.201600467R. Epub 2016 May 9. PMID: 27162025; PMCID: PMC6137956.

Abriel, H., & Zaklyazminskaya, E. V. (2013). Cardiac channelopathies: Genetic and molecular mechanisms. *Gene*, 517(1), 1-11.

Ackerman M, Atkins DL, Triedman JK. Sudden cardiac death in the young. *Circulation* 2016;133:1006-26.

Ackerman, M. J., Priori, S. G., Willems, S., Berul, C., Brugada, R., Calkins, H. et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace* 13, 1077–1109 (2011).

Ackerman, MJ et al., 2011. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm.* 8: 1308–1339.

Adabag AS, Luepker RV, Roger VL, Gersh BJ. (2010). Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. *Nat Rev Cardiol* 7: 216–225.

Adam S. Helms and Andrea D. Thompson and Amelia A. Glazier and Neha Hafeez and Samat Kabani and Juliani Rodriguez and Jaime M. Yob and Helen Woolcock and Francesco Mazzarotto and Neal K. Lakdawala and Samuel G. Wittekind and Alexandre

C. Pereira and Daniel L. Jacoby and Steven D. Colan and Euan A. Ashley and Sara Saberi and James S. Ware and Jodie Ingles and Christopher Semsarian and Michelle Michels and Iacopo Olivotto and Carolyn Y. Ho and Sharlene M. Day. Spatial and Functional Distribution of *MYBPC3* Pathogenic Variants and Clinical Outcomes in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, volume 13 number 5, pages: 396-405, 2020, doi:10.1161/CIRCGEN.120.002929.

Adzhubei VA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting Pathogenic missense mutations. *Nature methods*. 2010; 7: 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248> PMID: 20354512.

Ahsan, T., Sajib, A.A. Missense variants in the TNFA epitopes and their effects on interaction with therapeutic antibodies—in silico analysis. *J Genet Eng Biotechnol* 20, 7 (2022). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00288-y>

Alabdulgader Abdullah. Genetics of Sudden Cardiac Death, the Channelopathies: Today's Perspective and the Future. *Cardiol Vasc Res*. 2021; 5(4): 1-13

Alders M, Bikker H, Christiaans I. Long QT Syndrome. 2003 Feb 20 [updated 2018 Feb 8]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1129/> Citation on PubMed

Ali J. Marian, Clinical Interpretation and Management of Genetic Variants, *JACC: Basic to Translational Science*, Volume 5, Issue 10, 2020, Pages 1029-1042, ISSN 2452-302X, <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.05.013>

Al-Khatib S, Stevenson W, Ackerman M, et al. 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. *J Am Coll Cardiol*. 2018 oct, 72 (14) e91–e220. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.10.054>.

American College of Cardiology Foundation Appropriate Use Criteria Task Force; American Society of Echocardiography; American Heart Association; American Society of Nuclear Cardiology; Heart Failure Society of America; Heart Rhythm Society; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Critical Care Medicine; Society of Cardiovascular Computed Tomography; Society for Cardiovascular Magnetic Resonance; American College of Chest Physicians, Douglas PS, Garcia MJ, Haines DE, Lai WW, Manning WJ, Patel AR, Picard MH, Polk DM, Ragosta M, Parker Ward R, Weiner

RB. ACCF/AHA/ASNC/HFSA/HRS/SCAI/SCCM/SCCT/SCMR 2011 Appropriate Use Criteria for Echocardiography. A Report of the American College of Cardiology Foundation Appropriate Use Criteria Task Force, American Society of Echocardiography, American Heart Association, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Failure Society of America, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Critical Care Medicine, Society of Cardiovascular Computed Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance American College of Chest Physicians. *J Am Soc Echocardiogr.* 2011 Mar;24(3):229-67. doi: 10.1016/j.echo.2010.12.008. PMID: 21338862.

Ameziane N, Sie D, Dentro S, Ariyurek Y, Kerkhoven L, Joenje H, et al. Diagnosis of fanconi anemia: mutation analysis by next-generation sequencing. *Anemia.* 2012;2012:132856.

Andreasen Charlotte, Lena Refsgaard, Jonas B. Nielsen, Ahmad Sajadieh, Bo G. Winkel, Jacob Tfelt-Hansen, Stig Haunsø, Anders G. Holst, Jesper H. Svendsen and Morten S. Olesen. 2013. Mutations in Genes Encoding Cardiac Ion Channels Previously Associated With Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) Are Present With High Frequency in New Exome Data. *Canadian Journal of Cardiology* 29: 1104-1109

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Angsutararux P, Zhu W, Voelker TL, Silva JR. Molecular Pathology of Sodium Channel Beta-Subunit Variants. *Front Pharmacol.* 2021 Nov 19;12:761275. doi: 10.3389/fphar.2021.761275.

Ankala, A., et al., A comprehensive genomic approach for neuromuscular diseases gives a high diagnostic yield. *Ann Neurol*, 2015. 77(2): p. 206-14.

Arif, M., Nabavizadeh, P., Song, T. et al. Genetic, clinical, molecular, and pathogenic aspects of the South Asian-specific polymorphic MYBPC3 Δ 25bp variant. *Biophys Rev* 12, 1065–1084 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00725-1>

Asatryan B, Medeiros-Domingo A. Emerging Implications of Genetic Testing in Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Cardiol Rev.* 2019;27:23–33.

Awad MM, Dalal D, Cho E, et al. DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *American Journal of Human Genetics.* 2006 Jul;79(1):136-142. DOI: 10.1086/504393. PMID: 16773573; PMCID: PMC1474134.

Azevedo, P.S.; Polegato, B.F.; Minicucci, M.F.; Paiva, S.A.; Zornoff, L.A. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq. Bras Cardiol.* 2016, 106, 62–69.

B.M. Kroncke, J. Mendenhall, D.K. Smith, C.R. Sanders, J.A. Capra, A.L. George, J. D. Blume, J. Meiler, D.M. Roden, Protein structure aids predicting functional perturbation of missense variants in SCN5A and KCNQ1, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17 (2019) 206–214, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.01.008>. PMID: 30828412; PMCID: PMC6383132.

B.M. Kroncke, T. Yang, P. Kannankeril, M.B. Shoemaker, D.M. Roden, Exploiting ion channel structure to assess rare variant pathogenicity, *Heart Rhythm* 15 (6) (2018) 890–894, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.01.021>.

Bagnall R.D., K J.D., Duflou J., Semsarian C. Exome Analysis–Based Molecular Autopsy in Cases of Sudden Unexplained Death in the Young. *Heart Rhythm.* 2014;11:655–662. doi: 10.1016/j.hrthm.2014.01.017.

Bagnall, Richard D. and Weintraub, Robert G. and Ingles, Jodie and Duflou, Johan and Yeates, Laura and Lam, Lien and Davis, Andrew M. and Thompson, Tina and Connell, Vanessa and Wallace, Jennie and Naylor, Charles and Crawford, Jackie and Love, Donald R. and Hallam, Lavinia and White, Jodi and Lawrence, Christopher and Lynch, Matthew and Morgan, Natalie and James, Paul and du Sart, Desir^e and Puranik, Rajesh and Langlois, Neil and Vohra, Jitendra and Winship, Ingrid and Atherton, John and McGaughran, Julie and Skinner, Jonathan R. and Semsarian, Christopher, A Prospective Study of Sudden Cardiac Death among Children and Young Adults, *New England Journal of Medicine*, vol. 374: 25, pag. 2441-2452, 2016, doi10.1056/NEJMoa1510687

Bahrudin U, Morisaki H, Morisaki T, Ninomiya H, Higaki K, Nanba E, Igawa O, Takashima S, Mizuta E, Miake J, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Kitakaze M, Carrier L, Hisatome I. Ubiquitin-proteasome system impairment caused by a missense cardiac myosin-binding protein C mutation and associated with cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Biol.* 2008 Dec 26;384(4):896-907. doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.070. Epub 2008 Oct 7. PMID: 18929575.

Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Molecular Aspects of Medicine.* 2016; 51:1–15.

Basso C, Burke M, Fornes P, et al. 2008. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Arch.* 452: 11-8.

Basso, C., Aguilera, B., Banner, J. et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch* 471, 691–705 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2221-0>

Behere SP, Weindling SN. Inherited arrhythmias: The cardiac channelopathies. *Ann Pediatr Cardiol*. 2015 Sep-Dec;8(3):210-20. doi: 10.4103/0974-2069.164695. PMID: 26556967; PMCID: PMC4608198.

Bengtsson L, Otto H. LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci*. 2008; 121: 536- 548.

Bick AG, et al. Burden of rare sarcomere gene variants in the Framingham and Jackson Heart Study cohorts. *Am J Hum Genet*. 2012;91(3):513–519. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.07.017.

Boccuto, L. et al. A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation. *Hum Mol Genet* (2013).

Bock, D. G., Kantar, M. B., Caseys, C., Matthey-Doret, R., & Rieseberg, L. H. (2018). Evolution of invasiveness by genetic accommodation. *Nature Ecology and Evolution*, 2(6), 991–999. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0553-z>

Bohnen MS, Peng G, Robey SH, Terrenoire C, Iyer V, Sampson KJ, Kass RS. Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiol Rev*. 2017 Jan;97(1):89-134. Review. Citation on PubMed

Bonaventura J, Polakova E, Vejtasova V, Veselka J. Genetic Testing in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 27;22(19):10401. doi: 10.3390/ijms221910401. PMID: 34638741; PMCID: PMC8509044.

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635.

Brodehl A, Meshkov A, Myasnikov R, Kiseleva A, Kulikova O, Klauke B, Sotnikova E, Stanasiuk C, Divashuk M, Pohl GM, Kudryavtseva M, Klingel K, Gerull B, Zharikova A, Gummert J, Koretskiy S, Schubert S, Mershina E, Gärtner A, Pilus P, Laser KT, Sinitsyn V, Boytsov S, Drapkina O, Milting H. Hemi- and Homozygous Loss-of-Function Mutations in DSG2 (Desmoglein-2) Cause Recessive Arrhythmogenic Cardiomyopathy with an Early Onset. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 6;22(7):3786. doi: 10.3390/ijms22073786.

Brugada P, Brugada J., 1992. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: A distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol.* 20:1391-6.

Brugada, R., et al., 2003. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 109, r151–r156.

Burkett EL, Hershberger RE. 2005. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 45:969- 81.

C. Basso, D. Corrado, G. Thiene Cardiovascular causes of sudden death in young individuals including athletes *Cardiology in review*, 7 (1999), pp. 127-135

C.L. Anderson, B.P. Delisle, B.D. Anson, J.A. Kilby, M.L. Will, D.J. Tester, Q. Gong, Z. Zhou, M.J. Ackerman, C.T. January Most LQT2 mutations reduce Kv11.1 (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism *Circulation*, 113 (3) (2006), pp. 365-373, 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.570200

Cai Z., Wang Z., Yuan R., Cui M., Lao Y., Wang Y., et al. (2021). Redox-sensitive Enzyme SENP3 Mediates Vascular Remodeling via De-SUMOylation of β -catenin and Regulation of its Stability. *EBioMedicine* 67, 103386. 10.1016/j.ebiom.2021.103386.

Campuzano O, Sanchez-Molero O, Mademont-Soler I, Riuró H, Allegue C, Coll M, Pérez-Serra A, Mates J, Picó F, Iglesias A, Brugada R. Rare Titin (TTN) Variants in Diseases Associated with Sudden Cardiac Death. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 27;16(10):25773-87. doi: 10.3390/ijms161025773. PMID: 26516846; PMCID: PMC4632826.

Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Brugada R, Brugada J. Genetics of channelopathies associated with sudden cardiac death. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2015 Oct 13;2015(3):39. doi: 10.5339/gcsp.2015.39. PMID: 26566530; PMCID: PMC4625210.

Campuzano O., Beltramo P., Fernandez A., Iglesias A., García L., Allegue C., Sarquella-Brugada G., Coll M., Perez-Serra A., Mademont-Soler I., et al. Molecular Autopsy in a Cohort of Infants Died Suddenly at Rest. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018;37:54–63. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.07.023.

Campuzano, O., Allegue, C., Fernandez, A. et al. Determining the Pathogenicity of Genetic Variants Associated with Cardiac Channelopathies. *Sci Rep* 5, 7953 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep07953>

Campuzano, O.; Allegue, C.; Partemi, S.; Iglesias, A.; Olivo, A.; Brugada, R. Autopsia negativa y muerte súbita cardiaca. En t. *J. Pierna. Medicina. Rev.* 2014, 128, 599–606.

Campuzano, U.; Sanchez-Molero, U.; Alegue, C.; Coll, M.; Mademont-Soler, I.; Selga, E.; Ferrer-Costa, C.; Mates, J.; Iglesias, A.; Sarquella-Brugada, G.; et al. Post-mortem genético analysis en juveniles casas del surden cardiaco death. *Forensic. Sci. Int.* 2014, 245, 30–37.

Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. (2005). I-Mutant 2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res.* 33: W306–W310.

Castets, P.; Lescure, A.; Guicheney, P.; Allamand, V. Selenoprotein N in Skeletal Muscle: From Diseases to Function. *J. Mol. Med.* 2012, 90, 1095–1107

Castiglione V, Modena M, Aimo A, Chiti E, Botto N, Vittorini S, Guidi B, Vergaro G, Barison A, Rossi A, Passino C, Giannoni A, Di Paolo M, Emdin M. Molecular Autopsy of Sudden Cardiac Death in the Genomics Era. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jul 30;11(8):1378. doi: 10.3390/diagnostics11081378. PMID: 34441312; PMCID: PMC8394514.

Chauveau C, Rowell J, Ferreiro A. A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat.* 2014 Sep;35(9):1046-59. doi: 10.1002/humu.22611.

Chen Y., Xu T., Li M., Li C., Ma Y., Chen G., et al. (2021). Inhibition of SENP2-Mediated Akt deSUMOylation Promotes Cardiac Regeneration via Activating Akt Pathway. *Clin. Sci. (Lond)* 135, 811–828. 10.1042/CS20201408

Cheng J, Randall A, Baldi P. (2006). Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins* 62:1125–32.

Chiang CE. Congenital and acquired long QT syndrome. Current concepts and management. *Cardiol Rev.* 2004 Jul-Aug;12(4):222-34. doi: 10.1097/01.crd.0000123842.42287.cf. PMID: 15191637.

Cho, S.J.; Roman, G.; Yeboah, F.; Konishi, Y. The road to advanced glycation end products: A mechanistic perspective. *Curr. Med. Chem.* 2007, 14, 1653–1671.

Chockalingam, P., Crotti, L., Girardengo, G., Johnson, J. N., Harris, K. M., van der Heijden, J. F., . . . Wilde, A. A. M. (2012). Not all beta-blockers are equal in the management of long QT syndrome types 1 and 2: Higher recurrence of events under metoprolol. doi:10.1016/j.jacc.2012.07.046

Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, et al. (2008). Epidemiology of sudden cardiac death: Clinical and research implications. *Prog Cardiovasc Dis.* Vol. 51: 213-28.

Chun S, Fay JC. (2009). Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* 19(9):1553-1561. doi:10.1101/gr.092619.109

Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff:

Variantes in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118; iso-2; iso-3. *Landes Bioscience*. vol 2: 1–13.

CLINVAR Database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/36329/>; Last evaluated: Aug 18, 2011 [accessed 18.01.17].

Cooke JP, Tsao PS. Arginine: a new therapy for atherosclerosis? *Circulation*. 1997; 95:311–312

Cooper GM, Goode DL, Ng SB, Sidow A, Bamshad MJ, Shendure J, Nickerson DA. (2010). Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations. *Nat Methods*. Apr;7(4):250-1. doi: 10.1038/hmeth0410-250. PMID: 20354513; PMCID: PMC3145250.

Corrado D, Wichter T, Link MS, Hauer RN, Marchlinski FE, Anastasakis A, Bauce B, Basso C, Brunckhorst C, Tsatsopoulou A, Tandri H, Paul M, Schmied C, Pelliccia A, Duru F, Protonotarios N, Estes NM 3rd, McKenna WJ, Thiene G, Marcus FI, Calkins H. Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. *Circulation*. 2015 Aug 4;132(5):441-53. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017944. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26216213; PMCID: PMC4521905.

Cronk, L. B., Ye, B., Kaku, T., Tester, D. J., Vatta, M., Makielski, J. C., Ackerman, M. J. Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm* 4: 161-166, 2007.

Czepluch FS, Wollnik B, Hasenfuß G. Genetic determinants of heart failure: facts and numbers. *ESC Heart Fail*. 2018 Jun;5(3):211-217. doi: 10.1002/ehf2.12267. Epub 2018 Feb 19. PMID: 29457878; PMCID: PMC5933969.

D. Garrod, M. Chidgey, Desmosome structure, composition and function, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr*. 1778 (2008) 572–587. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.014

D. Manase et al., High throughput exome coverage of clinically relevant cardiac genes. *BMC Med Genomics* 7, 67 (2014).

D.S. Herman, L. Lam, M.R. Taylor, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 366 (2012), pp. 619-628 <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1110186>.

Daumy, X., Amarouch, M. Y., Lindenbaum, P., Bonnaud, S., Charpentier, E., Bianchi, B., et al. (2016). Targeted resequencing identifies TRPM4 as a major gene predisposing to progressive familial heart block type i. *Int. J. Cardiol*. 207, 349–358. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.01.052

de Boer, R.A., Heymans, S., Backs, J., Carrier, L., Coats, A.J.S., Dimmeler, S., Eschenhagen, T., Filippatos, G., Gepstein, L., Hulot, J.-S., Knöll, R., Kupatt, C., Linke, W.A., Seidman, C.E., Tocchetti, C.G., van der Velden, J., Walsh, R., Seferovic, P.M. and Thum, T. (2022), Targeted therapies in genetic dilated and hypertrophic cardiomyopathies: from molecular mechanisms to therapeutic targets. A position paper from the Heart Failure Association (HFA) and the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail*, 24: 406-420. <https://doi.org/10.1002/ejhf.2414>

Dechat, T., Korbei, B., Vaughan, O. A., Vlcek, S., Hutchison, C. J. and Foisner, R. (2000). Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J. Cell Sci.* 113, 3473-3484.

Dehghani-Samani A, Madreseh-Ghahfarokhi S, Dehghani-Samani A. Mutations of Voltage-Gated Ionic Channels and Risk of Severe Cardiac Arrhythmias. *Acta Cardiol Sin.* 2019 Mar;35(2):99-110. doi: 10.6515/ACS.201903_35(2).20181028A. PMID: 30930557; PMCID: PMC6434417.

Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, Liu X. (2015) Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet.* 15;24(8):2125-37. doi: 10.1093/hmg/ddu733. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25552646; PMCID: PMC4375422.

Dong X, Fan P, Tian T, Yang Y, Xiao Y, Yang K, Liu Y, Zhou X. Recent advancements in the molecular genetics of left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Clin Chim Acta.* 2017 Feb;465:40-44. doi: 10.1016/j.cca.2016.12.013. Epub 2016 Dec 15.

Dong Y, Du R, Fan LL, Jin JY, Huang H, Chen YQ, Bi DD, Xiang R. Whole-Exome Sequencing Identifies a Novel TRPM4 Mutation in a Chinese Family with Atrioventricular Block. *Biomed Res Int.* 2021 Apr 17;2021:9247541. doi: 10.1155/2021/9247541. PMID: 33959666; PMCID: PMC8075657.

Dozio, E.; Di Gaetano, N.; Findeisen, P.; Corsi Romanelli, M.M. Glycated albumin: From biochemistry and laboratory medicine to clinical practice. *Endocrine* 2017, 55, 682–690

Dubois-Deruy, E.; Belliard, A.; Mulder, P.; Bouvet, M.; Smet-Nocca, C.; Janel, S.; Lafont, F.; Beseme, O.; Amouyel, P.; Richard, V.; et al. Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosaminylation in ischaemic heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2015, 107, 56–65.

Duncan G, Firth K, George V, Hoang MD, Staniforth A, Smith G, Denning C. Drug-Mediated Shortening of Action Potentials in LQTS2 Human Induced Pluripotent Stem Cell-

Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Dev.* 2017 Dec 1;26(23):1695-1705. doi: 10.1089/MS.C.2017.0172. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28992755; PMCID: PMC5706629.

Durbin RM, Altshuler DL, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467:1061-73. <https://doi.org/10.1038/nature09534>.

Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, Alfares A, Kelly MA, Pugh TJ, Funke BH, Rehm HL, Lebo MS. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clin Genet.* 2013 Nov;84(5):453-63. doi: 10.1111/cge.12257.

E.J. Ciampa, R.C. Welch, C.G. Vanoye, A.L. George, KCNE4 juxtamembrane region is required for interaction with calmodulin and for functional suppression of KCNQ1, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 4141–4149. doi:10.1074/jbc.M110.158865.

Ellingford, J.M., Ahn, J.W., Bagnall, R.D. et al. Recommendations for clinical interpretation of variants found in non-coding regions of the genome. *Genome Med* 14, 73 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01073-3>

Ellison SR. Sudden cardiac death in adolescents. *Prim Care.* 2015 Mar;42(1):57-76. doi: 10.1016/j.pop.2014.09.012. PMID: 25634705.

Eloisa Arbustini, Elijah R Behr, Lucie Carrier, Cornelia van Duijn, Paul Evans, Valentina Favalli, Pim van der Harst, Kristina Hermann Haugaa, Guillaume Jondeau, Stefan Käåb, Juan Pablo Kaski, Maryam Kavousi, Bart Loeys, Antonis Pantazis, Yigal Pinto, Heribert Schunkert, Alessandro Di Toro, Thomas Thum, Mario Urtis, Johannes Waltenberger, Perry Elliott, Interpretation and actionability of genetic variants in cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Council on cardiovascular genomics, *European Heart Journal*, Volume 43, Issue 20, 21 May 2022, Pages 1901–1916, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab895>

Erickson, J.R.; Pereira, L.; Wang, L.; Han, G.; Ferguson, A.; Dao, K.; Copeland, R.J.; Despa, F.; Hart, G.W.; Ripplinger, C.M.; et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 2013, 502, 372–376.

European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society; Douglas P Zipes, et al., (2006). ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *J Am Coll Cardiol* 5:48(5):e247-346. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.07.010

F. Dudbridge, Power and predictive accuracy of polygenic risk scores, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003348. doi:10.1371/journal.pgen.1003348.

Fallavollita J, Apesado B, MLuisi A, JMichelek S, Mbaldwa s, Mashtare T, LAnuncio de Hutson, Dekemp R, AHaka M, SSajjad M, Cimato T, RCurtis A, BCaín Y, Ocanty jm (2014) La denervación simpática miocárdica regional predice el riesgo de paro cardíaco súbito en la miocardiopatía isquémica *Revista del Colegio Americano de Cardiología* 63 :141–149.

FastQC. Web: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Federici G, Soddu S. Variants of uncertain significance in the era of high-throughput genome sequencing: a lesson from breast and ovary cancers. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Mar 4;39(1):46. doi: 10.1186/s13046-020-01554-6. PMID: 32127026; PMCID: PMC7055088.

Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R, Campuzano O. Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology (Basel).* 2017 Jan 29;6(1):7. doi: 10.3390/biology6010007. PMID: 28146053; PMCID: PMC5372000.

Finsterer J, Stöllberger C, Towbin JA. Left ventricular noncompaction cardiomyopathy: cardiac, neuromuscular, and genetic factors. *Nat Rev Cardiol.* 2017 Apr;14(4):224-237. doi: 10.1038/nrcardio.2016.207.

Fonseca DJ, NdO, Silva MJ, Lvd. Canalopatias cardíacas: o papel das mutações nos canais de sódio. *Rev Port Cardiol.* 2018;37:179-199

Frank-Hansen R, Larsen LA, Andersen P, Jespersgaard C, Christiansen M. Mutations in the genes *KCND2* and *KCND3* encoding the ion channels Kv4.2 and Kv4.3, conducting the cardiac fast transient outward current (I_{TO,f}), are not a frequent cause of long QT syndrome. *Clin Chim Acta.* 2005 Jan;351(1-2):95-100. doi: 10.1016/j.cccn.2004.08.017. PMID: 15563876.

Fricovsky, E.S.; Suarez, J.; Ihm, S.H.; Scott, B.T.; Suarez-Ramirez, J.A.; Banerjee, I.; Torres-Gonzalez, M.; Wang, H.; Ellrott, I.; Maya-Ramos, L.; et al. Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012, 303, R689–R699

Fukuyama M, Wang Q, Kato K, Ohno S, Ding WG, Toyoda F, Itoh H, Kimura H, Makiyama T, Ito M, Matsuura H, Horie M. Long QT syndrome type 8: novel *CACNA1C* mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. *Europace.* 2014 Dec;16(12):1828-37. doi: 10.1093/europace/euu063.

G. McConnachie, L.K. Langeberg, J.D. Scott, AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter, *Trends Mol. Med.* 12 (2006) 317–323. doi:10.1016/j.molmed.2006.05.008.

Gaertner A., Klauke B., Stork I., Niehaus K., Niemann G., Gummert J., Milting H. Análisis funcionales in vitro de las variaciones de desmogleína-2-missense asociadas a la miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho. *Más uno.* 2012; 7:e47097. doi: 10.1371/journal.pone.0047097

Garber M, Guttman M, Clamp M, Zody MC, Friedman N, Xie X. (2009). Identifying novel constrained elements by exploiting biased substitution patterns. *Bioinformatics.* Jun 15;25(12):i54-62. doi: 10.1093/bioinformatics/btp190. PMID: 19478016; PMCID: PMC2687944.

García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, Sainz R, Martín M, Morís C. Espectro mutacional de los genes sarcoméricos MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3 y TPM1 en pacientes con miocardiopatía hipertrófica [Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Rev Esp Cardiol.* 2009 Jan;62(1):48-56. Spanish. PMID: 19150014.

Gardner RJM, Crozier IG, Binfield AL, Love DR, Lehnert K, Gibson K, Lintott CJ, Snell RG, Jacobsen JC, Jones PP, Waddell-Smith KE, Kennedy MA, Skinner JR. Penetrance and expressivity of the R858H CACNA1C variant in a five-generation pedigree segregating an arrhythmogenic channelopathy. *Mol Genet Genomic Med.* 2019 Jan;7(1):e00476. doi: 10.1002/mgg3.476

Garrison, E. & Marth, G. Detección de variantes basada en haplotipos a partir de secuenciación de lectura corta. arXiv: 1207.3907 (2012). (freebayes)

Gazzerro E, Sotgia F, Bruno C, Lisanti MP, Minetti C. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Hum Genet.* 2010 Feb;18(2):137-45. doi: 10.1038/ejhg.2009.103. Epub 2009 Jul 8. Review. Erratum in: *Eur J Hum Genet.* 2009 Dec;17(12):1692.

Geisterfer-Lowrance AA.T, Kass S, Tanigawa G, Vospert HP, McKenna W, Seidman JG, et al. 1999. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain missense mutation. *Cell* 62:999-1006.

Gelinas, R.; Mailleux, F.; Dontaine, J.; Bultot, L.; Demeulder, B.; Ginion, A.; Daskalopoulos, E.P.; Esfahani, H.; Dubois-Deruy, E.; Lauzier, B.; et al. AMPK activation counteracts cardiac hypertrophy by reducing O-GlcNAcylation. *Nat. Commun.* 2018, 9, 374.

Gema Mondéjar-Parreño, James W.S. Jahng, Nadjat Belbachir, Blake C. Wu, Xiaolan Zhang, Marco V. Perez, Nitish Badhwar, Joseph C. Wu, Generation of three heterozygous KCNH2 mutation-carrying human induced pluripotent stem cell lines for modeling LQT2 syndrome, *Stem Cell Research*, Volume 54, 2021, 102402, ISSN 1873-5061, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102402>.

Gerrard G, Valgañón M, Foong HE, Kasperaviciute D, Iskander D, Game L, et al. Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2013;162(4):530-6.

Giudicessi JR, Ye D, Kritzer CJ, Nesterenko VV, Tester DJ, Antzelevitch C, Ackerman MJ. Novel mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 K⁺ channel associated with autopsy-negative sudden unexplained death. *Hum Mutat*. 2012 Jun;33(6):989-97. doi: 10.1002/humu.22058. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22457051; PMCID: PMC3518919.

Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Crotti L, Mugione A, Nesterenko VV, Albertson RM, Antzelevitch C, Schwartz PJ, Ackerman MJ. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm*. 2011 Jul;8(7):1024-32. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.02.021. Epub 2011 Feb 22. PMID: 21349352; PMCID: PMC3150551.

Gollob MH, Redpath CJ, Roberts JD. 2011. The short QT syndrome: proposed diagnostic criteria. *J Am Coll Cardiol*. Vol.57: 802–812.

Graph theory-based simulation tools for protein structure networks, *Simulation Modelling Practice and Theory*, Volume 121, 2022, 102640, ISSN 1569-190X, <https://doi.org/10.1016/j.simpat.2022.102640>.

Gruenbaum, Y.; Foisner, R. Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annu. Rev. Biochem*. 2015, 84, 131–164.

H.-J. Choi, S. Park-Snyder, L.T. Pascoe, K.J. Green, W.I. Weis, Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure, *Nat. Struct. Biol*. 9 (2002) 612–620. doi:10.1038/nsb818.

Hancox, J.C., James, A.F., Walsh, M.A. et al. Triadin mutations - a cause of ventricular arrhythmias in children and young adults. *J Congenit Heart Dis* 1, 9 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40949-017-0011-9>

Harris AM, DeGiorgio M. An Unbiased Estimator of Gene Diversity with Improved Variance for Samples Containing Related and Inbred Individuals of any Ploidy. *G3*

(Bethesda). 2017 Feb 9;7(2):671-691. doi: 10.1534/g3.116.037168. PMID: 28040781; PMCID: PMC5295611.

Hastings R, et al. Combination of whole genome sequencing, linkage, and functional studies implicates a missense mutation in titin as a cause of autosomal dominant cardiomyopathy with features of left ventricular noncompaction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9(5):426–435. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001431.

Hata Y., Kinoshita K., Mizumaki K., Yamaguchi Y., Hirono K., Ichida F., Takasaki A., Mori H., Nishida N. Postmortem Genetic Analysis of Sudden Unexplained Death Syndrome under 50 Years of Age: A next-Generation Sequencing Study. *Heart Rhythm*. 2016;13:1544–1551. doi: 10.1016/j.hrthm.2016.03.038.

Hayashi, T., Arimura, T., Ueda, K., Shibata, H., Hohda, S., Takahashi, M., Hori, H., Koga, Y., Oka, N., Imaizumi, T., Yasunami, M., Kimura, A. Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 313: 178-184, 2004.

Helga Thorvaldsdóttir, James T. Robinson, Jill P. Mesirov, Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration, *Briefings in Bioinformatics*, Volume 14, Issue 2, March 2013, Pages 178–192, <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>

Hellenthal N., Gaertner-Rommel A., Klauke B., Paluszkiwicz L., Stuhr M., Kerner T., Farr M., Püschel K., Milting H. Molecular Autopsy of Sudden Unexplained Deaths Reveals Genetic Predispositions for Cardiac Diseases among Young Forensic Cases. *EP Eur*. 2017;19:1881–1890. doi: 10.1093/europace/euw247.

Heng L. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM, 2013: arXiv: Genomics.

Herman DS, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012;366(7):619–628. doi: 10.1056/NEJMoa1110186.

Herring NKalla, MPaterson DJ (2019) The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: current concepts and emerging therapies *Nature Reviews. Cardiology* 16:707–726.

Heusch G. (2020). Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury and Cardioprotection in Perspective. *Nat. Rev. Cardiol*. 17, 773–789. 10.1038/s41569-020-0403-y

Hu Y, Li Q, Shen Y, Fujita T, Zhu X, Inoue R. Theoretical Investigation of the Mechanism by which A Gain-of-Function Mutation of the TRPM4 Channel Causes

Conduction Block. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 7;22(16):8513. doi: 10.3390/ijms22168513. PMID: 34445219; PMCID: PMC8395173.

Hu, Y.; Belke, D.; Suarez, J.; Swanson, E.; Clark, R.; Hoshijima, M.; Dillmann, W.H. Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. *Circ. Res.* 2005, 96, 1006–1013.

Hwang, S., Kim, E., Lee, I. et al. Systematic comparison of variant calling pipelines using gold standard personal exome variants. *Sci Rep* 5, 17875 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep17875>

Ichikawa M, Aiba T, Ohno S, Shigemizu D, Ozawa J, Sonoda K, Fukuyama M, Itoh H, Miyamoto Y, Tsunoda T, Makiyama T, Tanaka T, Shimizu W, Horie M. Phenotypic Variability of ANK2 Mutations in Patients With Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Circ J.* 2016 Nov 25;80(12):2435-2442. doi: 10.1253/circj.CJ-16-0486. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27784853.

Imai-Okazaki A, Li Y, Horpaopan S, Riazalhosseini Y, Garshasbi M, Mosse YP, Zhang D, Schrauwen I, Sharma A, Fann CSJ, Leal SM, Lathrop M, Ott J. Heterozygosity mapping for human dominant trait variants. *Hum Mutat.* 2019 Jul;40(7):996-1004. doi: 10.1002/humu.23765. Epub 2019 Apr 24. PMID: 31018026; PMCID: PMC6617796.

Ingles J, Goldstein J, Thaxton C, Caleshu C, Corty EW, Crowley SB, et al. Evaluating the Clinical Validity of Hypertrophic Cardiomyopathy Genes. *Circ Genom Precis Med.* 2019;12:e002460.

J. Filiano, H. Kinney, A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model., *Biol. Neonate.* 65 (1994) 194–197. doi:10.1159/000244052.

Jain S, Bader GD. An improved method for scoring protein-protein interactions using semantic similarity within the gene ontology. *BMC Bioinformatics* 2010;11:562.

James T. Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, Jill P. Mesirov. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24–26 (2011).

Jesse D. Riordan, and Joseph H. Nadeau. From Peas to Disease: Modifier Genes, Network Resilience, and the Genetics of Health. *The American Journal of Human Genetics* 101, 177–191, August 3, 2017.

Ji Sun, Roderick MacKinnon, Structural Basis of Human KCNQ1 Modulation and Gating, *Cell*, Volume 180, Issue 2, 2020, Pages 340-347.e9, ISSN 0092-8674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.003>.

Jianding Cheng, MD, Jonathan C. Makielski, Ping Yuan, MD, Nianqing Shi, Feng Zhou, Bin Ye, Bi-Hua Tan, and Stacie Kroboth. 2011. Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome in Southern China. *Am J Forensic Med Pathol* 32: 359-363.

Jonathan R. Skinner, Annika Winbo, Dominic Abrams, Jitendra Vohra, Arthur A. Wilde, Channelopathies That Lead to Sudden Cardiac Death: Clinical and Genetic Aspects, *Heart, Lung and Circulation*, Volume 28, Issue 1, 2019, Pages 22-30, ISSN 1443-9506, <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.09.007>.

Jonathan R. Skinner, Jackie Crawford, Warren Smith, Andrew Aitken, David Heaven, Cary-Anne Evans, Ian Hayes, Katherine R. Neas, Simon Stables, Timothy Koelmeyer, Lloyd Denmark, Jane Vuletic, Fraser Maxwell, Kate White, Tao Yang, Dan M. Roden, Trond P. Leren, Andrew Shelling, Donald R. Love, 2011. Prospective, population-based long QT molecular autopsy study of postmortem negative sudden death in 1 to 40 year olds. *Heart Rhythm*, vol 8(3): 412-419.

Jose´ P. Llongueras, Samir Das, MSc, Jolien De Waele, Lucio Capulzini, Antonio Sorgente, Filip Van Petegem and Frank Bosmans. Biophysical Investigation of Sodium Channel Interaction with b-Subunit Variants Associated with Arrhythmias. *BIOELECTRICITY*. Volume 2, Number 3, 2020. DOI: 10.1089/bioe.2020.0030

Joseph Alape Ariza, Arbey Hernán Medina Rocha, Rodrigo Cabrera Pérez, Clara Isabel Bermudez-Santana. Next-generation sequencing of postmortem molecular markers to support for medicolegal autopsy, *Forensic Science International: Reports*. Volume 6, 2022, 100300, ISSN 2665-9107, <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2022.100300>.

Julia C. Isbister, Natalie Nowak, Laura Yeates, Emma S. Singer, Raymond W. Sy, Jodie Ingles, Hariharan Raju, Richard D. Bagnall, Christopher Semsarian, Concealed Cardiomyopathy in Autopsy-Inconclusive Cases of Sudden Cardiac Death and Implications for Families, *Journal of the American College of Cardiology*, Volume 80, Issue 22, 2022, Pages 2057-2068, ISSN 0735-1097, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2022.09.029>.

K. Hong, P. Bjerregaard, I. Gussak, R. Brugada, Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 16 (2005) 394–396, <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2005.40621.x>.

K.A. Dufendach, K. Timothy, M.J. Ackerman, B. Blevins, A. Pflaumer, S. Etheridge, J. Perry, N.A. Blom, J. Temple, D. Chowdhury, J.R. Skinner, C. Johnsrude, A. Bratincsak, J.M. Bos, M. Shah, Clinical outcomes and modes of death in Timothy syndrome, *JACC Clin. Electrophysiol.* 4 (2018) 459–466. doi:10.1016/j.jacep.2017.08.007.

Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., and Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298, 229–317. doi: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7

Kaltman JR, Thompson PD, Lantos J, et al., 2011. Screening for sudden cardiac death in the young: Report from a national heart, lung, and blood institute working group. *Circulation.* 123:1911-8.

Kamga MVK, Reppel M, Hescheler J, Nguemo F. Modeling genetic cardiac channelopathies using induced pluripotent stem cells - Status quo from an electrophysiological perspective. *Biochem Pharmacol.* 2021 Oct;192:114746. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114746.

Kanan Y., Al-Ubaidi M.R. Tyrosine-O-sulfation: An overview. *JSM Biotechnol. Bioeng.* 2013;1:1003.

Kanan Y., Siefert J.C., Kinter M., Al-Ubaidi M.R. Complement factor H, vitronectin, and opticin are tyrosine-sulfated proteins of the retinal pigment epithelium. *PLoS One.* 2014;9:e105409. doi: 10.1371/journal.pone.0105409.

Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, Carr JL, Harris-Kerr C, Pollevick GD, Wilde AA, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm.* 2009 Sep;6(9):1297-303. doi: 10.1016/j.hrthm.2009.05.021. Epub 2009 Jun 23. PMID: 19716085; PMCID: PMC3049907.

Karlijn Bouman, Madelief Gubbels, Frederik M.A. van den Heuvel, Jan T. Groothuis, Corrie E. Erasmus, Robin Nijveldt, Floris E.A. Udink ten Cate, Nicol C. Voermans, Cardiac involvement in two rare neuromuscular diseases: LAMA2-related muscular dystrophy and SELENON-related myopathy, *Neuromuscular Disorders*, Volume 32, Issue 8, 2022, Pages 635-642, ISSN 0960-8966, <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2022.06.004>.

Kaufman, E. S. (2009). Mechanisms and clinical management of inherited channelopathies: Long QT syndrome, brugada syndrome, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and short QT syndrome. *Heart Rhythm*, 6(8), S51-S55.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006. doi: 10.1101/gr.229102. PMID: 12045153; PMCID: PMC186604.

Keren A, Syrris P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008 Mar;5(3):158-68. doi: 10.1038/ncpcardio1110.

Kevin Ng, Erron W. Titus, Krystien V. Lieve, Thomas M. Roston, Andrea Mazzanti, Frederick H. et al. 2020. An International Multicenter Evaluation of Inheritance Patterns, Arrhythmic Risks, and Underlying Mechanisms of *CASQ2*-Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. Journal Article 2020 Circulation pg: 932-947. V142. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.045723.

Kho C., Lee A., Jeong D., Oh J. G., Chaanine A. H., Kizana E., et al. (2011). SUMO1-dependent Modulation of SERCA2a in Heart Failure. Nature 477, 601–605. 10.1038/nature10407

Kia et al., Improved genome sequencing using an engineered transposase. BMC Biotechnol 17, 6 (2017).

Kim E. Y., Zhang Y., Ye B., Segura A. M., Beketaev I., Xi Y., et al. (2015b). Involvement of Activated SUMO-2 Conjugation in Cardiomyopathy. Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1852, 1388–1399. 10.1016/j.bbadis.2015.03.013

Kitts A, Sherry S. Chapter 5 The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. The NCBI Handbook [Internet].2002. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>>.

Kolokotronis K, Kühnisch J, Klopocki E, Dartsch J, Rost S, Huculak C, Mearini G, Störk S, Carrier L, Klaassen S, Gerull B. Biallelic mutation in MYH7 and MYBPC3 leads to severe cardiomyopathy with left ventricular noncompaction phenotype. Hum Mutat. 2019 Aug;40(8):1101-1114. doi: 10.1002/humu.23757. Epub 2019 Apr 24. PMID: 30924982.

Koning T, Jongbloed J, Sikkema-Raddatz B, Sinke R. Targeted next-generation sequencing panels for monogenic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. Expert Rev Mol Diagn. 2015;15(1):61-70.

Konno T, Chang S, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy. Curr Opin Cardiol. 2010 May;25(3):205-9. doi: 10.1097/HCO.0b013e3283375698. PMID: 20124998; PMCID: PMC2932754.

Kytövuori L, Junttila J, Huikuri H, Keinänen-Kiukaanniemi S, Majamaa K, Martikainen MH. Mitochondrial DNA variation in sudden cardiac death: a population-based study. Int J Legal Med. 2020 Jan;134(1):39-44. doi: 10.1007/s00414-019-02091-4. Epub 2019 May 31. PMID: 31152278; PMCID: PMC6949201.

Kosho Yoshida, Hiroaki Sato, Satoshi Kimura, Toshiko Tanaka, Kentaro Kasai, A case of sudden cardiac death due to mitochondrial disease, Legal Medicine, Volume 55, 2022, 102026, ISSN 1344-6223, <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2022.102026>.

Konstantinos F. Kantelis, Vassilios Asteriou, Aliko Papadimitriou-Tsantarliotou, Anthi Petrou, Lefteris Angelis, Petros Nicopolitidis, Georgios Papadimitriou, Ioannis S. Vizirianakis, Krahn, A. D., Sanatani, S., Gardner, M. J., & Arbour, L. (2013). Inherited heart rhythm disease: Negotiating the minefield for the practicing cardiologist. *Canadian Journal of Cardiology*, 29(1), 122-125.

Kulikova O, Brodehl A, Kiseleva A, et al. The Desmin (DES) Mutation p.A337P Is Associated with Left-Ventricular Non-Compaction Cardiomyopathy. *Genes*. 2021 Jan;12(1):121. DOI: 10.3390/genes12010121.

Kulikovskaya I, McClellan GB, Levine R, Winegrad S. Multiple forms of cardiac myosin-binding protein C exist and can regulate thick filament stability. *J Gen Physiol*. 2007.

Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols*. 2009; 4: 1073–1082. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86> PMID: 19561590.

L. Chen, R.S. Kass, A-Kinase anchoring protein 9 and IKs channel regulation, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 58 (2011) 459–413. doi:10.1097/FJC.0b013e318232c80c.

Langmead, B., Salzberg, S. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359 (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25 (2009). <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>

Larissa M. Dorsch, Diederik W.D. Kuster, Jan D.H. Jongbloed, Ludolf G. Boven, Karin Y. van Spaendonck-Zwarts, Albert J.H. Suurmeijer, Aryan Vink, Gideon J. du Marchie Sarvaas, Maarten P. van den Berg, Jolanda van der Velden, Bianca J.J.M. Brundel, Paul A. van der Zwaag, The effect of tropomyosin variants on cardiomyocyte function and structure that underlie different clinical cardiomyopathy phenotypes, *International Journal of Cardiology*, Volume 323, 2021, Pages 251-258, ISSN 0167-5273, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.08.101>.

Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., and Kinet, J. P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109, 397–407. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00719-5

Lazo, J. S.; Aslan, D. C.; Southwick, E. C.; Cooley, K. A.; Ducruet, A. P.; Joo, B.; Vogt, A.; Leopold JA, Maron BA, Loscalzo J. The application of big data to cardiovascular disease: paths to precision medicine. *J Clin Invest*. 2020 Jan 2;130(1):29-38. doi: 10.1172/JCI129203. PMID: 31895052; PMCID: PMC6934200.

Li H. Fast construction of FM-index for long sequence reads. *Bioinformatics*. 2014 Nov 15; 30(22):3274-5.

Li Q, Wang K. (2017). InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet*. Feb 2;100(2):267-280. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.004. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28132688; PMCID: PMC5294755.

Li X, Li Z, Wang DW, Wang DW and Wang Y. A Novel Gain-of-Function KCND3 Variant Associated with Brugada Syndrome. *Cardiology* 2020;145:623–632. <https://doi.org/10.1159/000508033>.

Li, C., Zhi, D., Wang, K. et al. MetaRNN: differentiating rare pathogenic and rare benign missense SNVs and InDels using deep learning. *Genome Med* 14, 115 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01120-z>

Li, H. y col. El formato Sequence Alignment / Map y SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079 (2009). (Samtools mpilup)

Li, R.-G., Wang, Q., Xu, Y.-J., Zhang, M., Qu, X.-K., Liu, X., Fang, W.-Y., Yang, Y.-Q. Mutations of the SCN4B-encoded sodium channel beta-4 subunit in familial atrial fibrillation. *Int. J. Molec. Med.* 32: 144-150, 2013

Liao P, Yong TF, Liang MC, Yue DT, Soong TW. Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles. *Cardiovasc Res*. 2005 Nov 1;68(2):197-203. Epub 2005 Jul 27.

Li-Smerin Y, Hackos DH, Swartz KJ. elementos estructurales alfa-helicoidales dentro de los dominios de detección de voltaje de un canal K (+). *J Gen Physiol*. 2000; 115: 33–50.

Liu C, Zhao Q, Su T, et al. Postmortem molecular analysis of KCNQ1, KCNH2, KCNE1 and KCNE2 genes in sudden unexplained nocturnal death syndrome in the Chinese Han population. *Forensic Sci Int* 2013;231:82-7.

Loporcaro Christina G., S., David J. Tester, Joseph J. Maleszewski, Teresa Kruesselbrink, Michael J. Ackerman. 2014. Confirmation of Cause and Manner of Death Via a Comprehensive Cardiac autopsy Including Whole Exome Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 138: 1083-1089.

Luca Ponzoni, Daniel A Peñaherrera, Zoltán N Oltvai, Ivet Bahar, Rhapsody: predicting the pathogenicity of human missense variants, *Bioinformatics*, Volume 36, Issue 10, 15 May 2020, Pages 3084–3092, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa127>

Lundby A, Olesen SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Aug 4;346(3):958-67. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.004. Epub 2006 Jun 9. PMID: 16782062.

Masson, E., Zou, WB., Génin, E. et al. Expandir las pautas de clasificación de variantes de ACMG en un marco general. *Hum Genomics* 16, 31 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40246-022-00407-x>

M. Burrows and D. J. Wheeler, A Block-sorting Lossless Data Compression Algorithm, May 1994.

M. Lek, K.J. Karczewski, E.V. Minikel, et al., Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans, *Nature* 536 (7616) (2016) 285–291, <https://doi.org/10.1038/nature19057>.

M. Savarese, J. Sarparanta, A. Vihola, B. Udd, P. Hackman. Increasing role of titin mutations in neuromuscular disorders. *J Neuromuscul Dis*, 3 (2016), pp. 293-308 <http://dx.doi.org/10.3233/JND-160158>.

M.A. Makara, J. Curran, E.R. Lubbers, N.P. Murphy, S.C. Little, H. Musa, S. A. Smith, S.D. Unudurthi, M.V.S. Rajaram, P.M.L. Janssen, P.A. Boyden, E. A. Bradley, T.J. Hund, P.J. Mohler, Novel mechanistic roles for ankyrin-G in cardiac remodeling and heart failure, *JACC Basic Transl. Sci.* 5 (2018) 675–689, <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.07.008>. PMID: 30456339; PMCID: PMC6234521.

M.C. Trudeau, J.W. Warmke, B. Ganetzky, et al. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family *Science*, 269 (1995), pp. 92-95

M.L. Marks, S.L. Whisler, C. Clericuzio, M. Keating, A new form of long QT syndrome associated with syndactyly., *J. Am. Coll. Cardiol.* 25 (1995) 59–64. doi:10.1016/0735-1097(94)00318-K.

M.M. LeWinter, Y. Wu, S. Labeit, H. Granzier. Cardiac titin: Structure, functions and role in disease. *Clin Chim Acta*, 375 (2007), pp. 1-9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2006.06.035>.

MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, Junkins H, McMahon A, Milano A, Morales J, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog) *Nucleic Acids Research.* 2017;45:D896–D901. (Database issue).

Maejima Y., Sadoshima J. (2014). SUMOylation. *Circ. Res.* 115, 686–689. 10.1161/CIRCRESAHA.114.304989

Magi, S., Lariccia, V., Maiolino, M. et al. Sudden cardiac death: focus on the genetics of channelopathies and cardiomyopathies. *J Biomed Sci* 24, 56 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0364-6>

Mak C.M., Mok N.S., Shum H.C., Siu W.K., Chong Y.K., Lee H.H.C., Fong N.C., Tong S.F., Lee K.W., Ching C.K., et al. Sudden Arrhythmia Death Syndrome in Young Victims: A Five-Year Retrospective Review and Two-Year Prospective Molecular Autopsy Study by next-Generation Sequencing and Clinical Evaluation of Their First-Degree Relatives. *Hong Kong Med. J.* 2019;25:21–29. doi: 10.12809/hkmj187256.

Man, Yilong MS; Yi, Changying BS; Fan, Meili MS; Yang, Tianyu MD; Liu, Peng BS; Liu, Shiguang BS; Wang, Guangxin. Identification of a novel missense mutation in the TPM1 gene via exome sequencing in a Chinese family with dilated cardiomyopathy: A case report and literature review. *Medicine* 101(2):p e28551, January 14, 2022. | DOI: 10.1097/MD.00000000000028551

Manrai AK, et al. Genetic misdiagnoses and the potential for health disparities. *N Engl J Med.* 2016;375(7):655–665. doi: 10.1056/NEJMsa1507092.

Markwerth et al., 2020 P. Markwerth, T. Bajanowski, I. Tzimas, R. Dettmeyer Sudden cardiac death-update *International Journal of Legal Medicine*, 135 (2) (2020), pp. 483-495

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. 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):785–789. doi: 10.1161/01.CIR.92.4.785.

Maron BJ, Maron MS, Maron BA, Loscalzo J. Moving beyond the sarcomere to explain heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(15):1978–1986. doi: 10.1016/j.jacc.2019.01.061.

Marston S, Copeland O, Gehmlich K, Schlossarek S, Carrier L. How do MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy? *J Muscle Res Cell Motil.* 2012 May;33(1):75-80. doi: 10.1007/s10974-011-9268-3.

Martínez-Barrios E, Cesar S, Cruzalegui J, Hernandez C, Arbelo E, Fiol V, Brugada J, Brugada R, Campuzano O, Sarquella-Brugada G. Clinical Genetics of Inherited Arrhythmogenic Disease in the Pediatric Population. *Biomedicines.* 2022 Jan 5;10(1):10

Maxwell, A. J. & Cooke, J. P. (1998) Cardiovascular effects of L-arginine. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7:63–70.

Mazurová S, Tesařová M, Magner M, Houšťková H, Hansíková H, Augustínová J, Tomek V, Vondráčková A, Zeman J, Honzík T. Prague. Novel mutations in the TAZ gene in patients with Barth syndrome. *Prague Med Rep* 2013;114(3):139-53.

Mazzaccara C, Lombardi R, Mirra B, Barretta F, Esposito MV, Uomo F, Caiazza M, Monda E, Losi MA, Limongelli G, D'Argenio V, Frisso G. Next-Generation Sequencing Gene Panels in Inheritable Cardiomyopathies and Channelopathies: Prevalence of Pathogenic Variants and Variants of Unknown Significance in Uncommon Genes. *Biomolecules*. 2022 Oct 3;12(10):1417. doi: 10.3390/biom12101417. PMID: 36291626; PMCID: PMC9599286.

McKenna, A. et al. El kit de herramientas de análisis del genoma: un marco MapReduce para analizar datos de secuenciación de ADN de próxima generación. *Genome Res* 20, 1297-1303 (2010). (GAKT)

McNally E, MacLeod H, Dellefave-Castillo L. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. April 18, 2005 [updated May 25, 2017]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Mirzaa GM, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1131/> PubMed citation

Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, et al., 2009. The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: A comprehensive open reading frame mutational analysis. *J Am Coll Cardiol*. 54:2065-74

Mering V. (2005). STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res*. 33(Suppl. 1): D433-D7.

Messer, A. E., Bayliss, C. R., El-Mezgueldi, M., Redwood, C. S., Ward, D. G., Leung, M.-C., et al. (2016). Mutations in Troponin T Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy Increase Ca²⁺-Sensitivity and Suppress the Modulation of Ca²⁺-Sensitivity by Troponin I Phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys*. 601, 113–120. doi:10.1016/j.abb.2016.03.027

Michael A. Makara, Jerry Curran, Sean C. Little, Hassan Musa, Iuliia Polina, Sakima A. Smith, Patrick J. Wright, Sathya D. Unudurthi, Jed Snyder, Vann Bennett, Thomas J. Hund and Peter J. Mohler Ankyrin-G Coordinates Intercalated Disc Signaling Platform to Regulate Cardiac Excitability In Vivo. *Circulation Research*. 2014;115:929–938. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.305154>

Miga KH, Newton Y, Jain M, Altemose N, Willard HF, Kent WJ. Centromere reference models for human chromosomes X and Y satellite arrays. *Genome Res.* 2014; 24: 697–707. <https://doi.org/10.1101/gr.159624.113> PMID: 24501022.

Modell SM, Bradley DJ, Lehmann MH. Genetic testing for long QT syndrome and the category of cardiac ion channelopathies. *PLoS Curr.* 2012 May 3:e4f9995f69e6c7. doi: 10.1371/4f9995f69e6c7. Citation on PubMed or Free article on PubMed Central

Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V. Ankyrins. *J Cell Sci.* 2002 Apr 15;115(Pt 8):1565-6. doi: 10.1242/jcs.115.8.1565. PMID: 11950874.

Mohler PJ, Le Scouarnec S, Denjoy I, Lowe JS, Guicheney P, Caron L, Driskell IM, Schott JJ, Norris K, Leenhardt A, Kim RB, Escande D, Roden DM. Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes. *Circulation.* 2007 Jan 30;115(4):432-41. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.656512. Epub 2007 Jan 22. PMID: 17242276.

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogné K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 2003 Feb 6;421(6923):634-9. doi: 10.1038/nature01335. PMID: 12571597.

Møller DV, Andersen PS, Hedley P, Ersbøll MK, Bundgaard H, Moolman-Smook J, Christiansen M, Køber L. The role of sarcomere gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet.* 2009 Oct;17(10):1241-9. doi: 10.1038/ejhg.2009.34.

Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R. Estructura cristalina y análisis funcional del extremo N del canal de potasio HERG: un dominio PAS eucariota. *Célula.* 1998; 95 :649–655.

Morini et al., 2015. E. Morini, F. Sangiuolo, D. Caporossi, G. Novelli, F. Amati. Application of Next Generation Sequencing for personalized medicine for sudden cardiac death *Frontiers in genetics*, 6 (2015), p. 55.

Morris, S. M., Jr. Arginine: beyond protein. *The American journal of clinical nutrition* 2006, 83, 508S-512S

Mullaney JM, Mills RE, Pittard WS, Devine SE. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Hum Mol Genet.* 2010;19:R131-R136.

Nakano Y, Shimizu W. Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet.* 2016 Jan;61(1):51-5. doi: 10.1038/jhg.2015.74. Epub 2015 Jun 25. Review. Citation on PubMed

Napolitano C, Antzelevitch C. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circ Res*. 2011 Mar 4;108(5):607-18. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.224279.

Napolitano C, Mazzanti A, Bloise R, et al. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. 2004 Oct 14 [Updated 2022 Jun 23]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1289/>

Narula, N., Tester, D. J., Paulmichl, A., Maleszewski, J. J. & Ackerman, M. J. Postmortem whole exome sequencing with gene-specific analysis for autopsy-negative sudden unexplained death in the young: a case series. *Pediatr. Cardiol*. 36, 768–778 (2015).

Nassal D, Yu J, Min D, Lane C, Shaheen R, Gratz D, Hund TJ. Regulation of Cardiac Conduction and Arrhythmias by Ankyrin/Spectrin-Based Macromolecular Complexes. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021 Apr 29;8(5):48. doi: 10.3390/jcdd8050048.

Neale, B.M. (2008). *Statistical Genetics: Gene Mapping Through Linkage and Association*. Taylor & Francis Group, 574 p.

Necropsia medicolegal: DG-M-P-016- V3-2021. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses.

Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*. 1970 Mar;48(3):443-53. doi: 10.1016/0022-2836(70)90057-4. PMID: 5420325.

Neetu Singh Yadav, Pawan Kumar, Indra Singh, Chapter 12 - Structural and functional analysis of protein, Editor(s): Dev Bukhsh Singh, Rajesh Kumar Pathak, Bioinformatics, Academic Press, 2022, Pages 189-206, ISBN 9780323897754, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00026-2>.

Neubauer J., Lecca M.R., Russo G., Bartsch C., Medeiros-Domingo A., Berger W., Haas C. Exome Analysis in 34 Sudden Unexplained Death (SUD) Victims Mainly Identified Variants in Channelopathy-Associated Genes. *Int. J. Leg. Med*. 2018;132:1057–1065. doi: 10.1007/s00414-018-1775-y.

Neubauer, J., Haas, C., Bartsch, C., Medeiros-Domingo, A. & Berger, W. Post-mortem whole-exome sequencing (WES) with a focus on cardiac disease-associated genes in five young sudden unexplained death (SUD) cases. *Int. J. Legal Med*. 130, 1011–1021 (2016).

Neubauer, J., Lecca, M.R., Russo, G. *et al.* Exome analysis in 34 sudden unexplained death (SUD) victims mainly identified variants in channelopathy-associated genes. *Int J Legal Med* **132**, 1057–1065 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1775-y>

Ng D, Johnston JJ, Teer JK, Singh LN, Peller LC, Wynter JS, Lewis KL, Cooper DN, Stenson PD, Mullikin JC, Biesecker LG; NIH Intramural Sequencing Center (NISC) Comparative Sequencing Program. Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013 Aug;6(4):337-46. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000039. Epub 2013 Jul 16. PMID: 23861362; PMCID: PMC3887521.

Ng PC, Henikoff S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* Jul 1;31(13):3812-4. doi: 10.1093/nar/gkg509. PMID: 12824425; PMCID: PMC168916.

Nilius, B., Prenen, J., Tang, J., Wang, C., Owsianik, G., Jannsens, A., et al. (2005). Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J. Biol. Chem.* 280, 6423–6433. doi: 10.1074/jbc.M411089200

Norton N, Li D, Rampersaud E, Morales A, Martin ER, Zuchner S, Guo S, Gonzalez M, Hedges DJ, Robertson PD, Krumm N, Nickerson DA, Hershberger RE; National Heart, Lung, and Blood Institute GO Exome Sequencing Project and the Exome Sequencing Project Family Studies Project Team. Exome sequencing and genome-wide linkage analysis in 17 families illustrate the complex contribution of TTN truncating variants to dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013 Apr;6(2):144-53. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.000062.

Novocraft, T. S. B. (2014). <http://www.novocraft.com/products/novoalign/>.

O'Neill, M.J., Yuko Wada, Lynn D. Hall, Devyn W. Mitchell, Andrew M. Glazer and Dan M. Roden. Functional Assays Reclassify Suspected Splice-Altering Variants of Uncertain Significance in Mendelian Channelopathies, *Circulation: Genomic and Precision Medicine.* 2022;15. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.122.003782>

Ohno S, Toyoda F, Zankov DP, Yoshida H, Makiyama T, Tsuji K, Honda T, Obayashi K, Ueyama H, Shimizu W, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Kita T, Horie M. Novel KCNE3 mutation reduces repolarizing potassium current and associated with long QT syndrome. *Hum Mutat.* 2009 Apr;30(4):557-63. doi: 10.1002/humu.20834. PMID: 19306396.

Okuda H, Noguchi A, Kobayashi H, Kondo D, Harada KH, Youssefian S, Shioi H, Kabata R, Domon Y, Kubota K, Kitano Y, Takayama Y, Hitomi T, Ohno K, Saito Y, Asano T, Tominaga M, Takahashi T, Koizumi A. Infantile Pain Episodes Associated with Novel Nav1.9 Mutations in Familial Episodic Pain Syndrome in Japanese Families. *PLoS One*. 2016 May 25;11(5):e0154827. doi: 10.1371/journal.pone.0154827. ECollection 2016.

Olesen MS, Refsgaard L, Holst AG, Larsen AP, Grubb S, Haunsø S, Svendsen JH, Olesen SP, Schmitt N, Calloe K. A novel KCND3 gain-of-function mutation associated with early-onset of persistent lone atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2013 Jun 1;98(3):488-95. doi: 10.1093/cvr/cvt028. Epub 2013 Feb 11. PMID: 23400760.

Oliveri, L.M.; Buzaleh, A.M.; Gerez, E.N. An increase in O-GlcNAcylation of Sp1 down-regulates the gene expression of pi class glutathione S-transferase in diabetic mice. *Biochem. Biophys. Rep*. 2021, 27, 101049

O'Mahony C, Akhtar MM, Anastasiou Z, et al. Effectiveness of the 2014 European Society of Cardiology guideline on sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis. *Heart* 2019;105:623-31.

O'Mahony C, Jichi F, Pavlou M, et al. A novel clinical risk prediction model for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy (HCM risk-MS). *Eur Heart J* 2014;35:2010-20.

Orland, KM, Anderson, KB Autopsia molecular para muerte súbita cardíaca: estado actual y consideraciones. *Curr Genet Med Rep* 7, 145–152 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40142-019-00170-x>

Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH (mayo de 2001). "La fisiología molecular de la corriente de potasio saliente transitoria cardíaca (I (a)) en el miocardio normal y enfermo". *J. Mol. Célula. Cardiol* . 33 (5): 851–72. doi: 10.1006/jmcc.2001.1376

Oulas, A., Minadakis, G., Zachariou, M. et al. Selecting variants of unknown significance through network-based gene-association significantly improves risk prediction for disease-control cohorts. *Sci Rep* 9, 3266 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39796-w>

Paul Khairy, Michael J Silka, Jeremy P Moore, James A DiNardo, Jim T Vehmeijer, Mary N Sheppard, Alexander van de Bruaene, Marie-A Chaix, Margarita Brida, Benjamin M Moore, Maully J Shah, Blandine Mondésert, Seshadri Balaji, Michael A Gatzoulis, Magalie Ladouceur, Sudden cardiac death in congenital heart disease, *European Heart*

Journal, Volume 43, Issue 22, 7 June 2022, Pages 2103–2115, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac104>

P. Garg, A. Oikonomopoulos, H. Chen, Y. Li, C.K. Lam, K. Sallam, M. Perez, R.L. Lux, M.C. Sanguinetti, J.C. Wu Genome editing of induced pluripotent stem cells to decipher cardiac channelopathy variant *J Am Coll Cardiol*, 72 (1) (2018), pp. 62-75, [10.1016/j.jacc.2018.04.041](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.04.041).

P.L. Jia, Y.B. Wang, H. Fu, W.L. Huang, S.R. Zhong, L. Ma, Y.H. Li, Y. Dong, Z. C. Sun, L. Yang, P.F. Qu, S. Zhao, Y.Q. Qu, Y.M. Xi, S.W. Wang, X. Tang, P.P. Lei, Postmortem analysis of 4 mutation hotspots of KCNQ1, KCNH2, and SCN5A genes in sudden unexplained death in Southwest of China, *Am. J. Forensic Med Pathol.* 39 (3) (2018) 218–222, <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000411>. PMID: 29851656.

R. Walsh, K. Paar V, Jirak P, Larbig R, Zagidullin NS, Brandt MC, Lichtenauer M, Hoppe UC, Motloch LJ. Pathophysiology of Calcium Mediated Ventricular Arrhythmias and Novel Therapeutic Options with Focus on Gene Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 24;20(21). pii: E5304. doi: [10.3390/ijms20215304](https://doi.org/10.3390/ijms20215304)

Pacheco Bautista, D., González Pérez, M. and Algreto Badillo, I. 2015. From sequencing to hardware acceleration of DNA alignment software: A integral review. *Mexican Journal of Biomedical Engineering.* 36, 3 (Sep. 2015), 257-275. DOI:<https://doi.org/10.17488/RMIB.36.3.6>.

Pahl E, Sleeper LA, Canter CE, et al. Incidence of and risk factors for sudden cardiac death in children with dilated cardiomyopathy: a report from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:607-15.

Palladino A, Papa AA, Petillo R, Scutifero M, Morra S, Passamano L, Nigro V, Politano L. The Role of TRPM4 Gene Mutations in Causing Familial Progressive Cardiac Conduction Disease: A Further Contribution. *Genes (Basel).* 2022 Jan 28;13(2):258. doi: [10.3390/genes13020258](https://doi.org/10.3390/genes13020258). PMID: 35205305; PMCID: PMC8871839.

Pamuła-Piłat, J., Tęcza, K., Kalinowska-Herok, M. et al. Genetic 3'UTR variations and clinical factors significantly contribute to survival prediction and clinical response in breast cancer patients. *Sci Rep* 10, 5736 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62662-z>

Paolo Ferragina and Giovanni Manzini. Opportunistic data structures with applications. *Proceedings 41st Annual Symposium on Foundations of Computer Science.* 2000:390-398

Patel DM, Green KJ Desmosomas en el corazón: una revisión de los análisis clínicos y mecánicos. *Comun de celular Adhesivos* 2014; 21 :109–128. doi: 10.3109/15419061.2014.906533

Pejaver V, Urresti J, Lugo-Martinez J, Pagel KA, Lin GN, Nam H, Mort M, Cooper DN, Sebat J, Iakoucheva LM, Mooney SD, Radivojac P. Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nat. Commun.* 11, 5918 (2020)

PJ Mohler, I. Rivolta, C. Napolitano, et al. La mutación Nav1.5 E1053K que causa el síndrome de Brugada bloquea la unión a la anquirina-G y la expresión de Nav1.5 en la superficie de los cardiomiocitos *Proc Natl Acad Sci USA* , 101 (2004) , págs. 17533 – 17538

Poloni, Giulia; De Bortoli, Marzia; Calore, Martina; Rampazzo, Alessandra; Lorenzon, Alessandra. Arrhythmogenic right-ventricular cardiomyopathy: molecular genetics into clinical practice in the era of next generation sequencing. *Journal of Cardiovascular Medicine*: June 2016 - Volume 17 - Issue 6 - p 399-407 doi: 10.2459/JCM.0000000000000385

Prakoso, D.; Lim, S.Y.; Erickson, J.R.; Wallace, R.S.; Lees, J.G.; Tate, M.; Kiriazis, H.; Donner, D.G.; Henstridge, D.C.; Davey, J.R.; et al. Fine-tuning the cardiac O-GlcNAcylation regulatory enzymes governs the functional and structural phenotype of the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* 2021.

Previs MJ, Beck Previs S, Gulick J, Robbins J, Warshaw DM. Molecular mechanics of cardiac myosin-binding protein C in native thick filaments. *Science.* 2012 Sep 7;337(6099):1215-8. doi: 10.1126/science.1223602

Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, et al., 2005. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res.* 96: 800-807.

Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, et al. 2001. Genotype-phenotype correlation in the long QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103: 89-95.

Priori SG, Wilde AA, Horie M, et al. 2013. HRS/EHRA/APHR expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: Expert consensus statement on inherited primary arrhythmia syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHR in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm.* e75-106.

Priori SG. 2009. Arrhythmias: Unexplained sudden cardiac death—back to clinical evaluation. *Nat Rev Cardiol.* 6: 678-9.

Qin, C.X.; Sleaby, R.; Davidoff, A.J.; Bell, J.R.; De Blasio, M.J.; Delbridge, L.M.; Chatham, J.C.; Quarta G, Syrris P, Ashworth M, Jenkins S, Zuborne Alapi K, Morgan J, Muir A, Pantazis A, McKenna WJ, Elliott PM. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2012 May;33(9):1128-36. doi: 10.1093/eurheartj/ehr451. Epub 2011 Dec 23.

Raquel Neves, MD, David J. Tester, BS, Michael A. Simpson, PhD, Elijah R. Behr, MD, Michael J. Ackerman, MD, PhD, John R. Giudicessi, MD, PhD. Exome Sequencing Highlights a Potential Role for Concealed Cardiomyopathies in Youthful Sudden Cardiac Death. *Genomic and Precision Medicine*. 2022;15 <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.121.003497>Circulation.

R. De Zio, A. Gerbino, C. Forleo, M. Pepe, S. Milano, S. Favale, G. Procino, M. Svelto, M. Carosino Functional study of a KCNH2 mutant: Novel insights on the pathogenesis of the LQT2 syndrome *J Cell Mol Med*, 23 (9) (2019), pp. 6331-6342, 10.1111/jcmm.14521

Radusky L, Modenutti C, Delgado J, Bustamante JP, Vishnopolska S, Kiel C, Serrano L, Marti M and Turjanski A (2018) VarQ: A Tool for the Structural and Functional Analysis of Human Protein Variants. *Front. Genet*. 9:620. doi: 10.3389/fgene.2018.00620

Ramsey, I. S., Delling, M., and Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 619–647. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431

Reva, B., Antipin, Y., & Sander, C. 2011. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Research*, 39(17), e118-e118. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr407>.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL (2015). ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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*. May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.

Ritchie, R.H. Insights into the role of maladaptive hexosamine biosynthesis and O-GlcNAcylation in development of diabetic cardiac complications 2017, 116, 45–56.

Roberts AM, et al. Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med*. 2015 Jan 14;7(270):270ra6. doi: 10.1126/scitranslmed.3010134

Romero J, Mejia-Lopez E, Manrique C, et al. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A systematic literature review. *Clin Med Insights Cardiol* 2013;7:97-114

Rong Huo, Yue Sheng, Wen-Ting Guo & De-Li Dong (2014) The potential role of Kv4.3 K⁺ channel in heart hypertrophy, *Channels*, 8:3, 203-209, DOI: 10.4161/chan.28972

Roquemore, E.P.; Chevrier, M.R.; Cotter, R.J.; Hart, G.W. Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry* 1996, 35, 3578–3586

Sessa, Francesco, Massimiliano Esposito, Giovanni Messina, Giulio Di Mizio, Nunzio Di Nunno, and Monica Salerno. 2021. "Sudden Death in Adults: A Practical Flow Chart for Pathologist Guidance" *Healthcare* 9, no. 7: 870. <https://doi.org/10.3390/healthcare9070870>

S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, Standards and guide- lines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommenda- tion of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet. Med.* 17 (5) (2015) 405–423, <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.

S.J. Carlus, I.S. Almuzaini, M. Karthikeyan, L. Loganathan, G.S. Al-Harbi, F.H. Carlus, A.H. Al-Mazroea, M.M. Morsy, H.M. Abo-Haded, A.M. Abdallah, K.M. Al-Harbi . A novel homozygous TPM1 mutation in familial pediatric hypertrophic cardiomyopathy and in silico screening of potential targeting drugs *Eur Rev Med Pharmacol Sci*

S.M. Purcell, International Schizophrenia Consortium; Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, Sklar P. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 2009 Aug 6;460(7256):748-52. doi: 10.1038/nature08185. Epub 2009 Jul 1. PMID: 19571811; PMCID: PMC3912837.

S.O. Marx, J. Kurokawa, S. Reiken, H. Motoike, J. D'Armiento, A.R. Marks, R.S. Kass, requirement of a macromolecular signaling complex for β adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel, *Science*. 295 (2002) 496–499. doi:10.1126/science.1066843.

Salavert J, Tomás A, Tárraga J, Medina I, Dopazo J, Blanquer I. Fast inexact mapping using advanced tree exploration on backward search methods. *BMC Bioinformatics*. 2015 Jan 28;16:18. doi: 10.1186/s12859-014-0438-3. PMID: 25626517; PMCID: PMC4384339.

Samuel Chauveau, Alexandre Janin, Marianne Till, Elodie Morel, Philippe Chevalier, Gilles Millat. Early repolarization syndrome caused by de novo duplication of KCND3 detected by next-generation sequencing. *HeartRhythm Case Reports*, Volume 3, Issue 12, 2017 Pages 574-578 ISSN 2214-0271, <https://doi.org/10.1016/j.hrcre.2017.08.003>.

Sanchez O., Campuzano O., Fernández-Falgueras A., Sarquella-Brugada G., Cesar S., Mademont I., Mates J., Pérez-Serra A., Coll M., Pico F., et al. Natural and Undetermined Sudden Death: Value of Post-Mortem Genetic Investigation. *PLoS ONE*. 2016;11:e0167358. doi: 10.1371/journal.pone.0167358.

Sarquella-Brugada, G et al (2016) Sudden infant death syndrome caused by cardiac arrhythmias: only a matter of genes encoding ion channels *Int J Legal Med* 130:415-420

Schlüter, K. D., Schulz, R. & Schreckenber, R. Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart. *Front. Physiol.* 6, 65 (2015).

Schmidt, T. L., Jasper, M.-E., Weeks, A. R., & Hoffmann, A. A. (2021). Unbiased population heterozygosity estimates from genome-wide sequence data. *Methods in Ecology and Evolution*, 12, 1888–1898. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13659>

Schober T, Huke S, Venkataraman R, Gryshchenko O, Kryshtal D, Hwang HS, Baudenbacher FJ, Knollmann BC. 2012. Myofilament Ca sensitization increases cytosolic Ca binding affinity, alters intracellular Ca homeostasis, and causes pause-dependent Ca-triggered arrhythmia. *Circ Res*. Vol. 111: 170–179.

Schwartz PJ, Ackerman MJ, George AL Jr, Wilde AAM. Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jul 16;62(3):169-180. doi: 10.1016/j.jacc.2013.04.044. Epub 2013 May 15. PMID: 23684683; PMCID: PMC3710520.

Schwartz, C. E. & Chen, C. F. Progress in detecting genetic alterations and their association with human disease. *J Mol Biol* 425, 3914–8 (2013).

Schwarz, J., Cooper, D., Schuelke, M. et al. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11, 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>

Schwarz, JM., Cooper, DN., Schuelke, M., & Seelow, D. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*, 11(4), 361-362.

Shafaattalab Sanam, Li Alison Y, Gunawan Marvin G, Kim BaRun, Jayousi Farah, Maaref Yasaman, Song Zhen, Weiss James N, Solaro R. John, Qu Zhilin, Tibbits Glen F. Mechanisms of Arrhythmogenicity of Hypertrophic Cardiomyopathy-Associated Troponin T (TNNT2) Variant I79N. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Vol. 9, 2021,

ISSN=2296-634X.DOI:10.3389/fcell.2021.787581.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.787581>

Shanks G.W., Tester D.J., Ackerman J.P., Simpson M.A., Behr E.R., White S.M., Ackerman M.J. Importance of Variant Interpretation in Whole-Exome Molecular Autopsy. *Circulation*. 2018;137:2705–2715. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031053.

Shaun Purcell., PLIN(1.07) Documentation. 2010. <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/pdf.shtml> and <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/dist/plink-doc-1.07.pdf>.

Shifu Chen, Yanqing Zhou, Yaru Chen, Jia Gu., 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, Vol 34: i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.

Shihab HA, Gough J, Cooper DN, et al. (2013). Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat*. 13;34(1):57-65. doi:10.1002/humu.22225

Shinomiya, H, Kato, H, Kuramoto, Y, et al. Aberrant accumulation of TMEM43 accompanied by perturbed transmural gene expression in arrhythmogenic cardiomyopathy. *FASEB J*. 2021; 35:e21994. doi:10.1096/fj.202100800R

Shorvon and Tomson, 2011 S. Shorvon, T. Tomson Sudden unexpected death in epilepsy *The Lancet*, 378 (9808) (2011), pp. 2028-2038

Siepel A, Pollard K, Haussler D (2006) New methods for detecting lineage-specific selection. In: *Proc. 10th Int'l Conf. on Research in Computational Molecular Biology*. Berlin: Springer-Verlag, pp.190–205.

Siragam V, Cui X, Masse S, et al. TMEM43 mutation p. S358L alters intercalated disc protein expression and reduces conduction velocity in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *PLoS ONE*. 2014; 9:e109128.

Smith, T.F. and Waterman, M.S. (1981) Identification of Common Molecular Subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 147, 195-197. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)

Song, J., Kang, JS., Kim, YE. et al. Identification of pathogenic variants in genes related to channelopathy and cardiomyopathy in Korean sudden cardiac arrest survivors. *J Hum Genet* 62, 615–620 (2017). <https://doi.org/10.1038/jhg.2017.8>

Spielmann, N., Miller, G., Oprea, T.I. et al. Extensive identification of genes involved in congenital and structural heart disorders and cardiomyopathy. *Nat Cardiovasc Res* 1, 157–173 (2022). <https://doi.org/10.1038/s44161-022-00018-8>

Stefl, S., Nishi, H., Petukh, M., Panchenko, A. R. & Alexov, E. Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. *J Mol Biol* 425, 3919–36 (2013).

Steri M, Orrù V, Idda ML, Pitzalis M, Pala M, Zara I, Sidore C, Faà V, Floris M, Deiana M, et al. Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med*. 2017 Apr 27;376(17):1615–1626. doi: 10.1056/NEJMoa1610528.

Steven Xijin Ge and others, ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants, *Bioinformatics*, Volume 36, Issue 8, April 2020, Pages 2628–2629, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>

Sucharski HC, Dudley EK, Keith CBR, El Refaey M, Koenig SN, Mohler PJ. Mechanisms and Alterations of Cardiac Ion Channels Leading to Disease: Role of Ankyrin-B in Cardiac Function. *Biomolecules*. 2020 Jan 31;10(2):211. doi: 10.3390/biom10020211. PMID: 32023981; PMCID: PMC7072516.

Sun B, Sheng Y, Huo R, Hu CW, Lu J, Li SL, Liu X, Wang YC, Dong DL. Bone morphogenetic protein-4 contributes to the down-regulation of Kv4.3 K⁺ channels in pathological cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jul 12;436(4):591-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.113. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23747723.

Swayne LA, Murphy NP, Asuri S, Chen L, Xu X, McIntosh S, Wang C, Lancione PJ, Roberts JD, Kerr C, Sanatani S, Sherwin E, Kline CF, Zhang M, Mohler PJ, Arbour LT. Novel Variant in the ANK2 Membrane-Binding Domain Is Associated With Ankyrin-B Syndrome and Structural Heart Disease in a First Nations Population With a High Rate of Long QT Syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017 Jan;10(1):e001537. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001537. PMID: 28196901; PMCID: PMC5312931.

T. D. Wu and S. Nacu, “Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 7, pp. 873–881, 2010. (GSNAP)

T.J. Pugh, M.A. Kelly, S. Gowrisankar, et al. The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genet Med.*, 16 (2014), pp. 601-608 <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2013.204>.

Takayama K, Ohno S, Ding WG, Ashihara T, Fukumoto D, Wada Y, et al. A de novo gain-of-function KCND3 mutation in early repolarization syndrome. *Heart Rhythm*. 2019 Nov;16(11):1698–1706. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2019.05.033>.

Taylor, M.R.G.; Slavov, D.; Gajewski, A.; Vlcek, S.; Ku, L.; Fain, P.R.; Carniel, E.; Di Lenarda, A.; Sinagra, G.; Boucek, M.M.; et al. Thymopoietin (Lamina-Associated

Polypeptide 2) Gene Mutation Associated with Dilated Cardiomyopathy. *Hum. Mutat.* 2005, 26, 566–574.

Teng, S., Michonova-Alexova, E. & Alexov, E. Approaches and resources for prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphism on protein function and interactions. *Curr Pharm Biotechnol* 9, 123–33 (2008).

Tester David J., Argelia Medeiros-Domingo, Melissa L. Will, Carla M. Haglund, and Michael J. Ackerman, (2012). Cardiac Channel Molecular Autopsy: Insights From 173 Consecutive Cases of Autopsy-Negative Sudden Unexplained Death Referred for Postmortem Genetic Testing. *Mayo Clin. Proc.* 87(6): 524-539.

Tester DJ, Ackerman MJ. 2011. Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation.* 123: 1021-37.

Tester DJ, Medeiros-Domingo A, Will ML, et al., 2011. Unexplained drownings and the cardiac channelopathies: A molecular autopsy series. *Mayo Clin Proc.* 86:941-7.

Toepfer CN, et al. Hypertrophic cardiomyopathy mutations in MYBPC3 dysregulate myosin. *Sci Transl Med.* 2019;11(476): eaat1199. doi: 10.1126/scitranslmed.aat1199.

Tomé Esteban M, Garcia Pinilla J, McKenna WJ. 2004. Update in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: genetic, clinical presentation and risk stratification. *Rev Esp Cardiol* 57(8):757-67.

Towbin JA. Inherited cardiomyopathies. *Circ J* 78: 2347–2356, 2014. doi: 10.1253/circj.cj-14-0893

Trujillano D, Ramos MD, González J, et al. Next generation diagnostics of cystic fibrosis and CFTR-related disorders by targeted multiplex high-coverage resequencing of CFTR. *J Med Genet.* 2013;50:455-62.

Trujillano D, Perez B, González J, et al. Accurate molecular diagnosis of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninurias using high-throughput targeted sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:528-34.

Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, Boehme AK, Buxton AE, Carson AP, Commodore-Mensah Y, Elkind MSV, Evenson KR, Eze-Nliam C, Ferguson JF, Generoso G, Ho JE, Kalani R, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Levine DA, Lewis TT, Liu J, Loop MS, Ma J, Mussolino ME, Navaneethan SD, Perak AM, Poudel R, Rezk-Hanna M, Roth GA, Schroeder EB, Shah SH, Thacker EL, VanWagner LB, Virani SS, Voecks JH, Wang N-Y, Yaffe K, Martin SS; on behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2022 update: a report from the

American Heart Association [published online ahead of print Wednesday, January 26, 2022]. *Circulation*. doi: 10.1161/CIR.0000000000001052

Ullrich ND, Fischer D, Kornblum C, Walter MC, Niggli E, Zorzato F, Treves S. Alterations of excitation-contraction coupling and excitation coupled Ca(2+) entry in human myotubes carrying CAV3 mutations linked to rippling muscle. *Hum Mutat*. 2011 Mar;32(3):309-17. doi: 10.1002/humu.21431. Epub 2011 Feb 3. Citation on PubMed or Free article on PubMed Central

Vadrot, Nathalie, Flavie Ader, Maryline Moulin, Marie Merlant, Françoise Chapon, Estelle Gandjbakhch, Fabien Labombarda, Pascale Maragnes, Patricia Réant, Caroline Rooryck, Vincent Probst, Erwan Donal, Pascale Richard, Ana Ferreiro, and Brigitte Buendia. 2023. "Abnormal Cellular Phenotypes Induced by Three TMPO/LAP2 Variants Identified in Men with Cardiomyopathies" *Cells* 12, no. 2: 337. <https://doi.org/10.3390/cells12020337>

Vaidyanathan R, Vega AL, Song C, Zhou Q, Tan BH, Berger S, Makielski JC, Eckhardt LL. The interaction of caveolin 3 protein with the potassium inward rectifier channel Kir2.1: physiology and pathology related to long qt syndrome 9 (LQT9). *J Biol Chem*. 2013 Jun 14;288(24):17472-80. doi: 10.1074/jbc.M112.435370. Epub 2013 May 2. Erratum in: *J Biol Chem*. 2013 Oct 4;288(40):28948. Tan, Bihua [corrected to Tan, Bi-Hua]. PMID: 23640888; PMCID: PMC3682547.

Valdivia CR, Medeiros-Domingo A, Ye B, Shen WK, Algiers TJ, Ackerman MJ, et al., 2010. Loss-of-function mutation of the SCN3B-encoded sodium channel {beta} 3 subunit associated with a case of idiopathic ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*. 86:392-400.

Valle, G., Arad, M. & Volpe, P. Molecular adaptation to calsequestrin 2 (CASQ2) point mutations leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT): comparative analysis of R33Q and D307H mutants. *J Muscle Res Cell Motil* 41, 251–258 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10974-020-09587-2>

Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Nov 2;44(9):1903-10. doi: 10.1016/j.jacc.2004.07.045. PMID: 15519027.

Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant caveolin-3 induces persistent

late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation*. 2006 Nov 14;114(20):2104-12.

Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G. (2010). Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC bioinformatics*. 11: 548.

Verma R, Ghosh JK. Structural and functional changes in a synthetic S5 segment of KvLQT1 channel as a result of a conserved amino acid substitution that occurs in LQT1 syndrome of human. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1798(3):461-70. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.12.014. Epub 2010 Jan 4. PMID: 20044973.

Vriesendorp PA, Schinkel AF, Liebrechts M, et al. Validation of the 2014 European Society of Cardiology guidelines risk prediction model for the primary prevention of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2015;8:829-35

W. Wong, J.D. Scott, AKAP signalling complexes: focal points in space and time, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 959–970. doi:10.1038/nrm1527.

Waldmüller S, Erdmann J, Binner P, Gelbrich G, Pankuweit S, Geier C, Timmermann B, Haremza J, Perrot A, Scheer S, Wachter R, Schulze-Waltrup N, Dermintzoglou A, Schönberger J, Zeh W, Jurmann B, Brodherr T, Börgel J, Farr M, Milting H, Blankenfeldt W, Reinhardt R, Özcelik C, Osterziel KJ, Loeffler M, Maisch B, Regitz-Zagrosek V, Schunkert H, Scheffold T; German Competence Network Heart Failure. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure. *Eur J Heart Fail*. 2011 Nov;13(11):1185-92. doi: 10.1093/eurjhf/hfr074.

Wang X, et al. O-GlcNAcase deficiency suppresses skeletal myogenesis and insulin sensitivity in mice through the modulation of mitochondrial homeostasis. *Diabetologia*. 2016;59(6):1287–1296

Wang, J., et al., Diagnostic yield of clinical next-generation sequencing panels for epilepsy. *JAMA Neurol*, 2014. 71(5): p. 650-1.

Wang, K., Li, M. and Hakonarson, H. (2010) ANNOVAR: Functional Annotation of Genetic Variants from High-Throughput Sequencing Data. *Nucleic Acids Research*, 38, e164. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq603>

Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*. 38: W214–20.

Ware JS, et al. Shared Genetic Predisposition in Peripartum and Dilated Cardiomyopathies. *N Engl J Med*. 2016 Jan 6. Doi: 10.1056/NEJMoa1505517.

Ware JS, Walsh R, Cunningham F, Birney E, Cook SA. Paralogous annotation of disease-causing variants in long QT syndrome genes. *Hum Mutat*. 2012 Aug;33(8):1188-1191. doi: 10.1002/humu.22114. Epub 2012 Jun 7. PMID: 22581653; PMCID: PMC4640174.

Watanabe H, Minamino T. Rare Variants in ANK2 Associated With Various Inherited Arrhythmia Syndromes. *Circ J*. 2016 Nov 25;80(12):2423-2424. doi: 10.1253/circj.CJ-16-1085. Epub 2016 Nov 3. PMID: 27818464.

Wei, Jinhuan; Ni, Xuejun; Dai, Yanfei; Chen, Xi; Ding, Sujun; Bao, Jingyin; Xing, Lingyan. 2021. Identification of genes associated with sudden cardiac death: a network- and pathway-based approach *JF. Journal of Thoracic Disease*; Vol 13, No 6 (June 28, 2021): <https://jtd.amegroups.com/article/view/53234>

Wei, Q., Wang, L., Wang, Q., Kruger, W. D. & Dunbrack, R. L., Jr Testing computational prediction of missense mutation phenotypes: functional characterization of 204 mutations of human cystathionine beta synthase. *Proteins* 78, 2058–74 (2010).

Wemhöner K, Friedrich C, Stallmeyer B, Coffey AJ, Grace A, Zumhagen S, Seebohm G, Ortiz-Bonnin B, Rinné S, Sachse FB, Schulze-Bahr E, Decher N. Gain-of-function mutations in the calcium channel CACNA1C (Cav1.2) cause non-syndromic long-QT but not Timothy syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Mar;80:186-95. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.002

Wende AR. Post-translational modifications of the cardiac proteome in diabetes and heart failure. *Proteomics Clinical Applications*. 2016;10(1):25–38.

Wilde AAM, Amin AS, Postema PG Diagnosis, management and therapeutic strategies for congenital long QT syndrome *Heart* 2022;108:332-338.

Wolf A, Zalpour C, Theilmeyer G, Wang BY, Ma A, Anderson B, Tsao PS, Cooke JP. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Mar 1;29(3):479-85. doi: 10.1016/s0735-1097(97)00523-8

Wu CT, Qi XY, Huang H, Naud P, Dawson K, Yeh YH, Harada M, Kuo CT, Nattel S. Disease and region-related cardiac fibroblast potassium current variations and potential functional significance. *Cardiovasc Res*. 2014 Jun 1;102(3):487-96. doi: 10.1093/cvr/cvu055. Epub 2014 Mar 4. PMID: 24596399; PMCID: PMC4030513.

Y. Kobayashi, S. Yang, K. Nykamp, J. Garcia, S.E. Lincoln, S.E. Topper, Pathogenic variant burden in the ExAC database: an empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation, *Genome Med.* 9 (1) (2017) 13. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0403-7>.

Y. Li, L. Chen, R.S. Kass, C.W. Dessauer, The A-kinase anchoring protein Yotiao facilitates complex formation between adenylyl cyclase type 9 and the IKs potassium channel in heart, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 29815–29824. doi:10.1074/jbc.M112.380568.

Y.G. Yap, A.J. Camm, Drug induced QT prolongation and torsades de pointes, *Heart.* 89 (2003) 1363–1372. doi:10.1136/heart.89.11.1363.

Yamakage M, Namiki A. Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth.* 2002 Feb;49(2):151-64

Yang, H. and Wang, K. (2015) Genomic Variant Annotation and Prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nature Protocols*, 10, 1556-1566. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.105>

Year: 2020 Vol. 24 - N. 14 Pages: 7732-7744 DOI: 10.26355/eurrev_202007_22299.

Yeung CY, Lam KS, Li SW, et al. Sudden cardiac death after myocardial infarction in type 2 diabetic patients with no residual myocardial ischemia. *Diabetes Care* 2012;35:2564-9.

Zhang S, Lei L, Fan Z, Su S, Duo J, Luan Q, Lu Y, Di L, Wang M, Da Y. Delayed Respiratory Insufficiency and Extramuscular Abnormalities in Selenoprotein N-Related Myopathies. *Front Neurol.* 2021 Nov 19;12:766942. doi: 10.3389/fneur.2021.766942. PMID: 34867752; PMCID: PMC8639696.

Zhang, Z. et al. A Y328C missense mutation in spermine synthase causes a mild form of Snyder-Robinson syndrome. *Hum Mol Genet* 22, 3789–97 (2013).

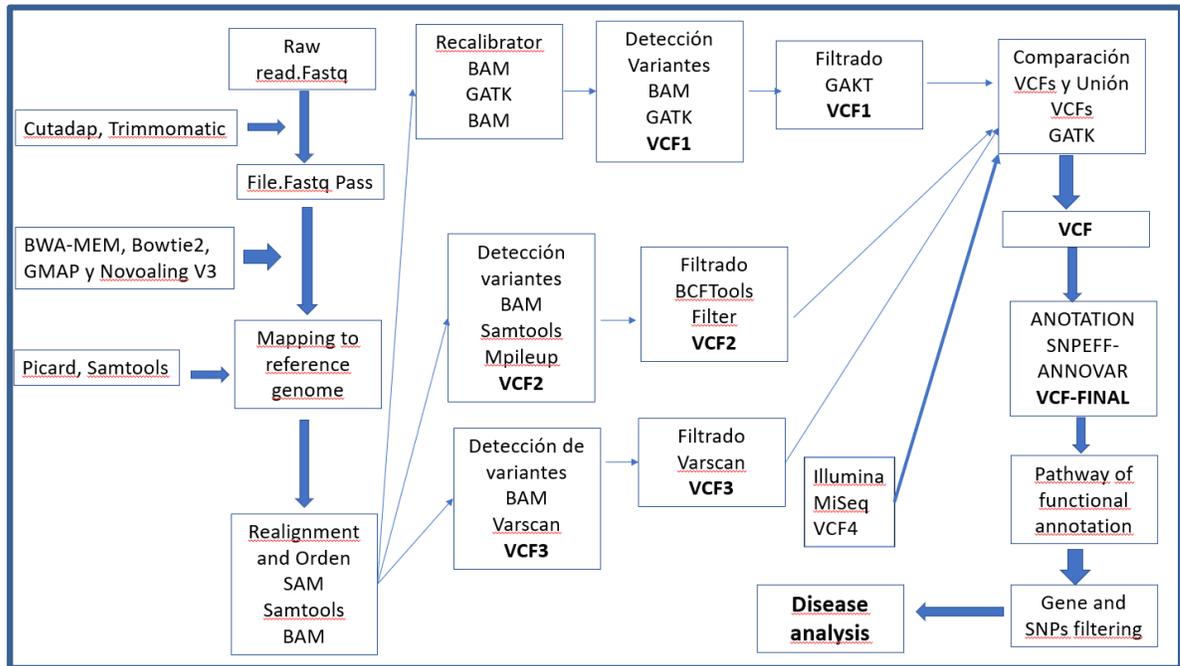
Zhang, Z., Teng, S., Wang, L., Schwartz, C. E. & Alexov, E. Computational analysis of missense mutations causing Snyder-Robinson syndrome. *Hum Mutat* 31, 1043–9 (2010).

Zipes et al., 2006. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death. *Circulation.* 114:e385-484.

Zou, C., Gong, J., & Li., H. 2013. An improved sequence based prediction protocol for DNAbinding proteins using SVM and comprehensive feature analysis. *BMC Bioinformatics*, 14(1). 1. <http://doi.org/10.1186/1471-2105--14-90>

Anexos.

Anexo A. Pipeline ad hoc para el análisis de los datos de secuenciación



Anexo B. Artículos que se desprenden de la tesis



Next-generation sequencing of postmortem molecular markers to support for medicolegal autopsy

Joseph Alape Ariza^{a,b,e,*}, Arbey Hernán Medina Rocha^c, Rodrigo Cabrera Pérez^{d,e}, Clara Isabel Bermudez-Santana^{f,g}

^a Forensic Sciences Research Group, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Calle 7A No. 12A 51, Bogotá, D.C., Colombia

^b Forensic Genetics Research Group, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Calle 7A No. 12A 51, Bogotá, D.C., Colombia

^c Forensic Pathology Group, Bogotá Regional Directorate, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Calle 7A No. 12A 51, Bogotá, D.C., Colombia

^d Center for Research in Genetics and Genomics (CIGUG), Institute of Translational Medicine (IMT), Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

^e Molecular Biology Laboratory, Fundación Cardio Infantil – Instituto de Cardiología, Calle 165A No. 13 B 80, Bogotá, D.C., Colombia

^f Theoretical and Computational RNomics group, Department of Biology, Faculty of Sciences, National University of Colombia, Carrera 45, Bogotá, D.C., Colombia

^g Center of Excellence in Scientific Computing, National University of Colombia, Carrera 45, Bogotá, D.C., Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

SUD
 Cardiac Channelopathies
 LQTS
 NGS

ABSTRACT

In most cases, sudden unexplained death (SUD) is caused by hereditary cardiac arrhythmias that standard forensic autopsy procedures cannot prove. For this reason, forensics analysis must apply other methodologies to uncover related factors. For example, postmortem molecular analysis (molecular autopsy) based on next-generation sequencing represents a promising and effective tool for diagnosing SUD. This analysis allows scientists to detect well-known, new, and rare pathogenic exonic variants or those with unknown significance that could be related to the cause of sudden death. Using exome sequencing, we identified rare exon variants in MYBPC3, KCND3, TTN, and ANK3 in a fifteen-year-old male SUD case with negative toxicology analysis and autopsy showing microscopic abnormality of heart fiber disarray. Our findings suggested that this case might be associated with cardiac channelopathy long QT syndrome, type 2, as a potential causative factor.

1. Introduction

Cardiovascular diseases are one of the leading causes of sudden cardiac death (SCD), with an estimated incidence of around 20% in industrialized countries. Nowadays, it is becoming a public health problem worldwide [1,2]. Uncovering inherited cardiomyopathies and channelopathies is challenging in postmortem examinations. Nevertheless, they are known to be causally linked to sudden unexplained death (SUD). Cardiomyopathies such as hypertrophic, dilated, and arrhythmogenic, can present with minimal structural changes in the heart in SCD [3,4] and channelopathies are not associated with anatomical differences but affect heart rate and cardiac electrical conduction, triggering sudden cardiac arrest [3,5].

In recent years, genetic studies to establish the genetic basis of SCD include the analysis of gene mutations from four main families of proteins: sarcomeric (associated with hypertrophic cardiomyopathy) [6], cytoskeletal (associated with dilated cardiomyopathy) [7], desmosomal

(associated with arrhythmogenic right ventricular dysplasia) [8] and ion channels (associated with hereditary arrhythmias such as long and short QT syndrome) [9,10], Brugada syndrome (BrS) [11], Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) [12], Early Repolarization Syndrome and Idiopathic Ventricular Fibrillation (PRSYLVF) [13]. However, the genetic basis for SCD has not been fully deciphered, leading to it being classified among conditions with complex inheritance [14].

Additionally, SCD has become a public health problem given its high incidence in young people worldwide [15]; therefore, its study is of the utmost importance given its genetic heterogeneity and pleiotropy.

Standard protocols to determine the correct cause of death are 1. analysis of antemortem clinical data, 2. an inspection of the scene where the death occurred, 3. autopsy with dissection of the major organs (brain, heart, lungs, liver, and kidneys) 4. toxicology assays, 5. microbiologic cultures, and 6. metabolic screening in newborns [16]. After many efforts, the cause of death is still unsuccessful in some cases. As a

* Corresponding author at: Forensic Sciences Research Group, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Calle 7A No. 12A 51, Bogotá, D.C., Colombia.

E-mail address: jalape@medicinalegal.gov.co (J.A. Ariza).

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.100300>

Received 6 September 2022; Received in revised form 10 October 2022; Accepted 11 November 2022

Available online 14 November 2022

2665-9107/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

J.A. Ariza et al.

Forensic Science International: Reports 6 (2022) 100300

result, those deaths are suggested to have a high probability of being associated with channelopathy-type cardiac arrhythmias [17,18], making the diagnosis problematic since they cannot be detected during an autopsy. Besides, for further genetic counseling, an accurate post-mortem identification of the disease-causing mutation could be used to assess if there is a risk in other family members to the onset of SCD [19].

Channelopathies are known to be caused by mutations in ion channels. They present a Mendelian inheritance pattern and variable expression with incomplete penetrance [20]. These discoveries have changed how pathologists approach sudden death in autopsies. Molecular diagnoses might become a practical methodology to enrich the diagnosis of the causes of SCD [21,22]. Researchers are encouraged to incorporate molecular tests to understand the breadth and depth of heart disease.

Our findings are a specific example of the role and advantages of using molecular analysis in cases of sudden unexplained death. It has turned out to be very important for studying complex diseases such as diabetes, cancer, and conditions of cardiac origin (channelopathies) associated with SCD, among others [7]. For that, the development of massively parallel or next-generation sequencing (NGS) allows the analysis of a patient's complete genome/exome sequence and, as a result, permits the analysis of a bigger pool of genes. In this study, clinical exome sequencing was applied to support the potential diagnosis of SUD as the probable causative of the death of a fifteen-year-old male. The teenager died in 2016, and his results were negative for toxicology and virology. Furthermore, there were negative forensic autopsy results, i.e., no structural heart damage. Finally, our approach enriched the markers suggested to be associated with this SUD.

2. Materials and methods

2.1. Subject

A fifteen-year-old male showed microscopic abnormality of heart fiber disarray and negative toxicological tests after an autopsy without family records of heart disease. He died in the dormitory while sleeping.

2.2. Autopsy and pathology testing

A forensic scientist performed the autopsy. The heart, brain, liver, kidney, lung, and other primary organ tissues were collected for histopathological examination. Blood from the heart was collected for toxicological analyses.

2.2.1. DNA sampling

DNA extraction was performed from blood taken from a male fifteen-year-old who died in 2016, with the QIAamp®DNA Blood Midi/Maxi kit, following the manufacturer's recommendation. The blood was stored and refrigerated in the Evidence Center of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences of the Bogotá Regional Directorate.

2.2.2. Construction of libraries and NGS sequencing

Sample library preparation was performed using the TruSight One Sequencing Panel Series (Illumina), which includes 4834 clinically relevant genes, using the Nextera XT Kit (Illumina). The libraries were quantified using the Quantitating dsDNA kit in the Quantus™ Fluorometer instrument and following the manufacturer's recommendations. Subsequently, the libraries were sequenced as paired reads of 2 × 150 bp with the MiSeq kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) using MiSeq Reagent V3 (150 cycles), following the manufacturer's recommendations.

2.2.3. Bioinformatic analysis

The quality of the sequences was performed using the FASTQC [23] and FASTP [24] software, the alignment algorithms BWA-Backtrack

(MiSeq Reporter-Illumina), Bowtie2 [25], BWA-MEM [26], GSNAP [27] and NovoAlign [28], HaplotypeCaller-GATK-HC [29], Samtools mpileup [30] and Freebayes [31] were used for variant calling. DNA read alignment was performed against the reference genome GRCH37/hg19.

2.2.4. Variant annotation

The annotation of the exome variants was carried out through the integration of the SnpEff [32] and ANNOVAR [33,34] bioinformatic tools that integrate the population databases: dbSNP [35], (the 1000 Genomes Project Consortium), NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) [36], database [37], and the gnomAD and exomAD databases (<http://gnomad.broadinstitute.org>). Information related to the association between human phenotype and causative genes was added from ClinVar [38,39].

2.2.5. Pathogenicity association of variants

Twelve types of in silico predictive algorithms were included: SIFT [40], PolyPhen-2 [41], MutationTaster [42], LRT [43], Mutation Assessor [44], FATHMM (Functional Analysis Through Hidden Markov Models) [45], MetaSVM [46], RadialSVM, LR, CADD, GERP+ + [47], phyloP [48], SiPhy [49], to assess the pathogenicity of identified variants. Filtering considered exome variants with a MAF < 0.01. The norms and guidelines for interpreting sequence variants suggested by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) were followed to classify the causality of each of the variants [50].

2.2.6. Prediction of SNP impact on protein stability

I-Mutant3.0 tools were used to predict the stability of a protein based on the presence and

type of microvariant, available at (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/>). For MuPro, structural analysis allowing calculation of protein stability variations at arbitrary SNPs is available at (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>).

The HOPE server was used to analyze the effect of the SNP on the 3D structure of proteins and to calculate physicochemical properties. This tool searches for 3D structures of proteins by collecting structural information from a series of sources, including calculations in the 3D coordinates of the protein. UniProt base sequence annotations and predictions from DAS services are available at <http://www.cmbi.ru.nl/hope/>.

Additionally, we analyzed protein-protein interaction and functional networks to investigate the direct physical and functional relationships between identified genes, using the (STRING) database available at <http://string.embl.de>. The GeneMANIA server, available at <http://www.genemania.org/>, was also used; it is an approach to recognizing the protein's function by integrating multiple genomics and proteomics sources to make inferences about the role of unknown proteins. The input was the keywords MYBkeywords3, TTN, ANK3, KCNH2, and CTDSP2. The output was an image showing the biological network interaction between those genes and their correlated genes.

3. Results

3.1. Case features

A male teenager, fifteen years old, passes away in his room while sleeping. His toxicology results were negative for ethyl alcohol, cocaine, derivatives, opiates, carboxyhemoglobin, and cyanide. The histopathology report established the brain without specific alterations, a lung with edema, and sections of the heart show foci of fiber disarray, without fibrosis or inflammatory changes or lesions from a previous infarction, and some myocytes with contraction bands indicating recent ischemia. The forensic analysis and conclusion state: "In the absence of other findings, concluding that death is due to cardiovascular causes is not possible. It is considered that the cause of death is undetermined and

probably natural."

After recovering the necropsy findings, a genetic study was carried out using NGS to determine whether the cause of death could probably be a cardiac channelopathy.

From the molecular autopsy performed by next-generation sequencing (NGS) on clinical exome analysis, a total of 8851 sequence variants were identified. Bioinformatic filtering was performed with the quality of the variants, population frequency, the information provided by the various databases, and in silico prediction, and following the recommendations of the ACMG/AMP group [51]. Table 1 shows the relevant variants found during the study where the variants were selected for further analysis according to the $MAF \leq 0.1$ calculated for four different population sources ExAC, sources AD, gnomAD, and 1000 genome project. Five genetic variants were identified: C2992G, G1712A, C49424A, G275C, and G6955A present in the MYBPC3, KCND3, TTN, KCNH2, and ANK3 genes, respectively.

3.2. Functional prediction of pathogenic variant

Using in silico pathogenic predictors, pathogenic (D), probably pathogenic (Pp), and benign (T) variants were determined. A cut-off point of 20 was used for the CADD algorithm. Prediction of conservation of the sequence used a cut-off point greater than 4.4. Results are shown in Table 2.

3.3. Protein stability prediction

Protein stability analysis was performed with I. Mutant 3.0 and MUPro software. The change in free energy caused by the pathogenic variant in the protein was calculated by I.Mutant. For MUPro, values < 0 mean stability decreases, and scores > 0 indicate increased protein stability. The results of these predictions are shown in Table 3. MuPro predictor results indicate reductions in stability for all the mutations. Nevertheless, this trend changed in ANK3 and MYBPC3 when the predictor, the I-Mutator was used.

3.4. Server-based 3D structural modeling project hope

The MYBPC3 gene variant (rs11570112: NM_000256.3: Q998E) lies in a UniProt domain as Ig-like C2-type 6 and introduces a glutamic acid at this position. The mutant residue is positively charged, and the wild-type residue is neutrally charged. The wild-type residue is highly conserved, but other residue types have also been observed at this position. Neither the mutant nor any other kind of residue with similar properties was observed in different homologous sequences at this position. Based on conservation scores, this pathogenic variant likely damages the protein. In Fig. 1, a close-up of the pathogenic variant is shown. Position 998 with the change Q by E is highlighted.

The KCND3 gene variant (rs186194682: NM_172198: R571H) introduces histidine at this position. The mutant residue is minor and neutrally charged, while the wild-type residue is positively charged. The wild-type residue is highly conserved, but other residue types have also been observed at this position. The mutant residue was not found among different residues observed at this position in other homologous proteins.

Table 1
Variants selected for analysis according to population frequencies with a $MAF \leq 0.1$.

rsID	Chr	Gen	Func. Ref Gene	Genetic variant	Change protein level	zygosity	MAF			
							ExAC	exome AD	gnomAD	1000 g
rs11570112	chr11	MYBPC3	exon27	c.C2992G	p.Q998E	het	0,0052	0,0072	0,0021	0,0061901
rs186194682	chr1	KCND3	exon7	c.G1712A	p.R571H	het	0,04701	0,04917	0,03232	0,00039936
rs541464855	chr2	TTN	exon154	c.C49424A	p.P16475Q	het	Absent	Absent	0,03236	0,00019968
.	chr7	KCNH2	exon2	c.G275C	p.R92P	hom	Absent	Absent	Absent	Absent
rs140463162	chr10	ANK3	exon37	c.G6955A	p.D2319N	het	0,0028	0,0033	0,0033	0,00139776

The TTN gene variant (rs541464855: NM_003319: P16475Q) is within one domain, annotated in UniProt as Ig-120. The pathogenic variant will cause the loss of hydrophobic interactions in the core of the protein. The mutant residue is larger and less hydrophobic. In Fig. 2, a close-up of the pathogenic variant is shown where the change P by Q is highlighted in the 16,475 positions.

The ANK3 gene variant (rs140463162: NM_020987: D2319N) introduces asparagine at this position. The mutant residue is charge neutral, while the wild-type residue is negative; there is a loss of charge from the wild-type residue. The mutant residue was not found among the other residue types observed at this position in different homologous sequences. No structural information was found on the HOPE server.

KCNH2 gene variant (NM_000238.4) (exon 2: c.G275C: R92P) introduces proline at this position. The mutant residue is located on the Surface of a domain with an unknown function. The mutant residue is smaller, more hydrophobic than the wild type, and neutral in charge. The wild-type residue forms a hydrogen bond with glutamine at position 84. It forms a salt bridge with glutamic acid at position 90. 3D modeling is shown in Fig. 3, a close-up of the pathogenic variant. The pathogenic variant introduces proline at this position. Position 92 with the change of arginine to proline is highlighted.

3.5. Protein-protein interaction analysis

The Functional networks of the six proteins of interest were built by STRING and covered some known functional networks. In Fig. 4, a hub represents a cardiac channelopathy caused by the KCNH2 where other network proteins converged. Interesting, the network's vertices correspond gene associated with Voltage-gated Potassium channels, Phase 0 – rapid depolarization, Phase 1 – inactivation of fast Na⁺ channels, Potassium channel, voltage dependent, Kv3.1, Voltage gated Potassium channels, Phase 3 – rapid repolarization, originating Long QT syndrome 2 and in addition to other related pathologies. Proteins have more interactions with each other than expected from a random set of proteins of the same size and degree of distribution drawn from the genome. Such enrichment indicates that the proteins are partially biologically connected as a group.

3.6. Gene-gene interaction

The analysis by GeneMANIA showed that MYBPC3, KCND3, TTN, ANK3, and KCNH2 have many vital functions and interact with a network of genes- Any alteration in one or more of them can alter the gene interaction and cause an illness. The genes were co-expressed, shared a similar protein domain, or contributed to similar functions, as shown in Fig. 5.

4. Discussion

Of the 8851 variants identified by NGS on a clinical exome, five relevant SNPs, in the MYBPC3, KCND3, TTN, ANK3, and KCNH2 genes, were found after applying the different bioinformatic filters based on recommendations from the ACMG/AMP group [51]. All five rare potentially pathogenic exome variants were classified as poorly tolerated by at least two variant prediction algorithms. Therefore, it was

Table 2

Prediction of pathogenicity of SNPs in silico for SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster, LRT, Mutation Assessor, FATHMM, MetaSVM, RadialSVM, LR, CADD, GERP+ +, PhyloP, and SiPhy.

Gene	AA change	rsID	SIFT	Polyphen2	LRT	Mutation Taster	Mutation Assessor	FATHMM	RadialSVM
KCND3	R571H	rs186194682	D	Pp	D	Pp	Medium	D	D
TTN	P16475Q	rs541464855	D	Pp	.	Pp	High	T	D
KCNH2	R92P	.	T	Pp	T	Pp	Medium	D	D
ANK3	D2319N	rs140463162	T	Pp	D	Pp	Medium	T	T
MYBPC	Q998E	rs11570112	D	Pp	.	Pp	Medium	T	T
Gene	AA change	rsID	LR	CADD	GERP+ +RS	phyloP	SiPhy	IMPACT	
KCND3	R571H	rs186194682	D	28.7	5.63	2814	19639	Moderate	
TTN	P16475Q	rs541464855	D	12.28	5.56	2608	19497	Moderate	
KCNH2	R92P	.	D	20.7	3.49	811	11994	High	
ANK3	D2319N	rs140463162	T	23.8	5.94	2816	20359	Moderate	
MYBPC	Q998E	rs11570112	T	21.2	4.1	1311	14449	Moderate	

Table 3

Protein stability of the SNPs by I-Mutant 3.0 and Mupro.

Gen	SNP ID	Change AA	I-Mutant 3.0 Prediction	RI	DDG valor predicción	MuPro Prediction	MuPro Score
KCNH2	.	R92P	Decrease	6	0.52	Decreases	0.5125869
ANK3	rs140463162	D2319N	Increase	2	-0.22	Decreases	-0.60154872
TTN	rs541464855	P16475Q	Decrease	8	1.29	Decreases	1.0325811
KCND3	rs186194682	R571H	Decrease	6	1.20	Decreases	0.7320396
MYBPC3	rs11570112	Q998E	Increase	4	-0.16	Decreases	-0.73155586

DDG: free energy change value; RI: reliability index

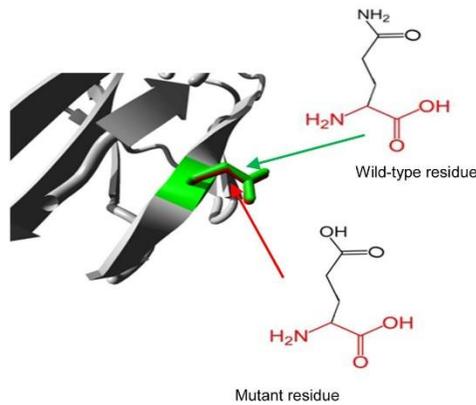


Fig. 1. Close-up of the pathogenic variant. The protein is shown in gray, and the side chains of the wild type and mutant residues are shown and colored green and red, respectively. MYBPC3 variant: rs11570112: Q998E, protein position 998 change from glutamine to glutamic acid.

decided to perform further analyses. Predicted decrease or increase in protein stability caused by the pathogenic variants was shown in Table 3. Those results are consistent with the physicochemical characteristics of each variant.

- MYBPC3: rs11570112 is a missense and splicing region variant associated with primary dilated cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction cardiomyopathy, primary familial hypertrophic cardiomyopathy, familial hypertrophic cardiomyopathy 4, cardiovascular phenotype, cardiomyopathy dilated and dominant diabetic myopathy [52].
- KCND3: rs186194682 is a variant with a conflicting interpretation of pathogenicity. The KCND3 gene (Potassium Voltage-Gated Channel

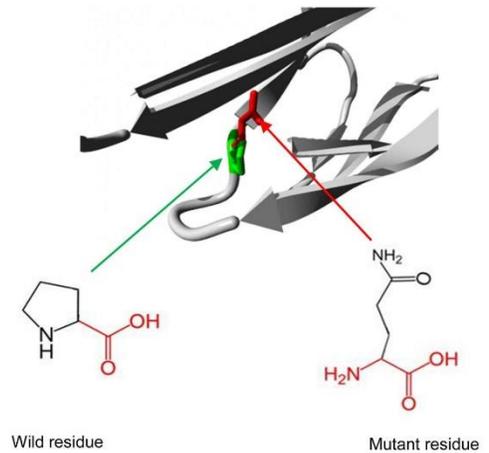


Fig. 2. Close-up of the pathogenic variant. The protein is shown in gray, and the side chains of the wild type and mutant residues are shown and colored green and red, respectively. TTN variant: rs541464855: P16475Q, protein position 92 changed from proline to glutamine.

Subfamily D Member 3) is associated with diseases such as Brugada syndrome, a cardiac channelopathy with high genetic heterogeneity that has a high incidence of sudden death in patients with a structurally normal heart [53].

- TTN: rs541464855 is a missense variant. The TTN gene encodes the sarcomere titin protein found in cardiac and skeletal muscle, and its mutations are associated with hypertrophic and dilated cardiomyopathy and various skeletal muscle diseases [54].
- ANK3: rs140463162 may participate in the maintenance/direction of ion channels and cell adhesion molecules at the nodes of Ranvier and initial axon segments. It regulates the activity of the KCNA1

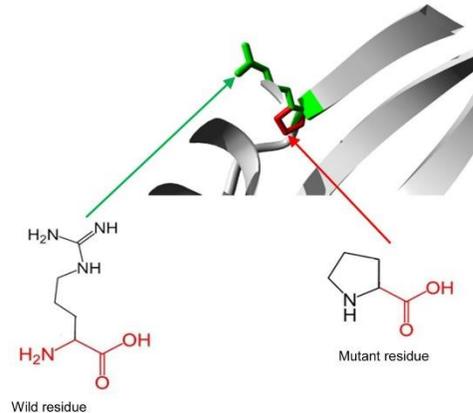


Fig. 3. Close-up of the pathogenic variant. The protein is shown in gray, and the side chains of the wild type and mutant residues are shown and colored green and red, respectively. Variant (KCNH2: NM_000238.4: R92P), protein position 92 changed from an arginine to a proline.

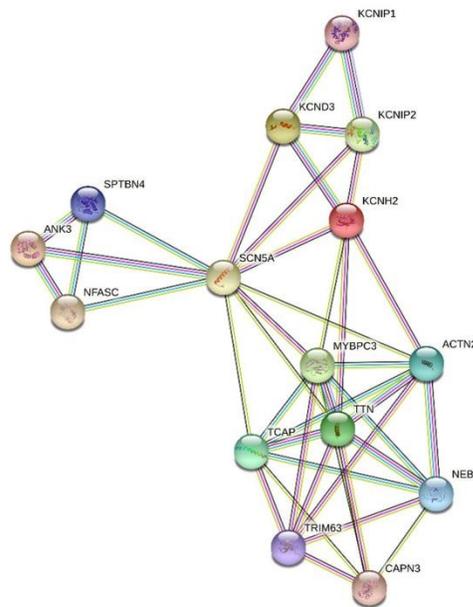


Fig. 4. Functional interaction between MYBPC3, KCND3, TTN, ANK3, and KCNH2 genes and related genes.

channel depending on the levels of Mg (2+) in the diet and, therefore, contributes to the regulation of renal reabsorption of Mg (2+). ANK3 (ANKG) is required for the localization of NaV1.5 and CaMKII in the intercalated disc of cardiomyocytes [57]. A variant of the SCNSA gene in the ANKG-binding motif of NaV1.5 has been associated with Brugada syndrome and arrhythmia [58]. This same variant

is a loss-of-function variant when expressed in primary cardiomyocytes. AnkG variants have been associated with Brugada syndrome and, more recently, dilated cardiomyopathy [59].

- KCNH2 (exon 2: c.G275C: R92P): Analysis of this variant reveals that the mutated residue is found in a MiLD_Hotspot region for type 2 LQT syndrome that contains highly lethal variants [60]. Variants in exon 7 of the KCNH2 gene have previously been reported to cause sudden death [61], which is consistent with the structural effects of the mutations in the protein. The mutation in this gene could be responsible for the cause of death.

Since conformational changes are vital to the function of many proteins, conformational flexibility and stiffness must be very well balanced [62]. SNPs rs11570112, rs186194682, rs541464855, rs140463162, and R92P were validated as highly conserved by the HOPE algorithm, suggesting that they have deleterious effects on protein structure and therefore likely to be pathogenic. This is consistent with the observation that harmful SNPs are more common in conserved sites [63]. Furthermore, if mutated residues are found in internal domains of a protein's structure, incorrect folding may decrease protein stability, leading to effects mimicking the presence of deleterious nonsense variants [64].

The R92, P16475, R571, and Q998 residues, found in essential domains for each protein structure, will cause a loss of hydrophobic interaction and changes in size, which will not allow for correct molecular interactions, affecting the function of protein complexes [65].

Although functional and clinical studies are required for definitive classification of deleterious variants, it can take a long time to obtain data on all variants. Different approaches with a certain degree of reliability predict highly dangerous SNPs [66]. The methods used in our present study offer evidence of the applicability of these approaches to infer variant pathogenicity.

Protein-protein interaction calculated with STRING (Fig. 4) showed that KCNH2 has strong interactions with KCND3, ACTN2, MYBPC3, and TTN. Furthermore, the variants found in the genes MYBPC3, TTN, and ACTN2 have been associated with hypertrophic cardiomyopathy, channelopathies such as the Brugada syndrome, and other arrhythmias [67–69]. If they are simultaneously presented, those pathogenic variants might be strong candidates to trigger sudden cardiac death. Although ANK3 is not included in the network prediction, it is known that it is associated with the NaV1.5 cardiac sodium channel of the SCNSA gene, which is expressed in the ventricular intercalated disc and the membranes of cardiomyocyte T tubules. As described, alterations in the Nav1.5 protein that block ANK3 binding and surface expression of Nav1.5 in cardiomyocytes can lead to the cardiac arrhythmia known as Brugada syndrome [67].

Finally, the gene interaction network built by GeneMANIA shown in Fig. 5 shows a robust physical interaction and a relationship between domains with some co-expressed genes. These findings might indicate that alterations in the proteins of the genes KCNH2, KCND3, ACTN2, MYBPC3, and TTN together could be potential factors associated with sudden cardiac death. Our results recommend further molecular dynamics studies among these genes [68,69].

We claim that other experiments should be performed to assess if the protein localization triggers SUD and other electrophysiologist assays. While our survey shows that it is possible to detect variants with NGS of exomes, functional analysis are required to determine their pathogenicity using mice and other model organisms. Finally, the complexity of the variants, such as their heterogeneity and the variable expression, must also be considered in further analysis. In this context, substantial challenges to complete the SUD diagnosis remain. Hence, our study gives a set of candidates to further validate their pathogenic role in SUD. Our screening demonstrates the potential that NGS technology has to be applied to increase the number of markers to be analyzed in SUDs [69] and forensic science [70,71].

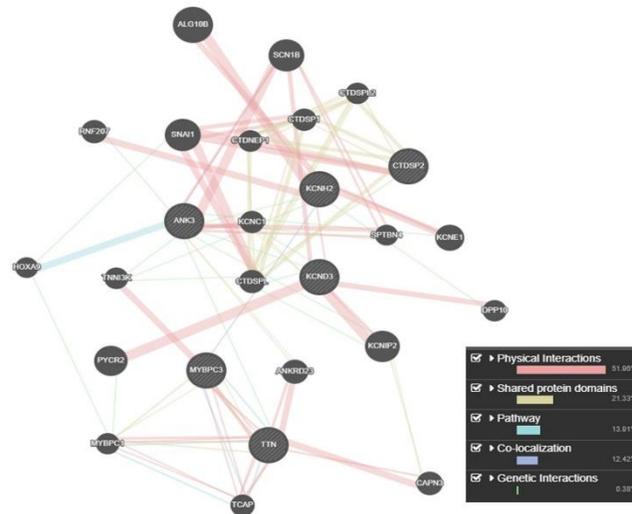


Fig. 5. Biological network of interaction between MYBP3, KCND3, TTN, ANK3, and KCN12 genes and other related genes, predicted by GeneMANIA.

5. Conclusion

We present a molecular autopsy supported by next-generation sequencing of the clinical exome that includes 4834 clinically relevant genes for a suspected case of SCD. Genetic analysis using NGS was performed on the blood sample recovered during an autopsy to identify the causal variants of the phenotype and the reason for sudden death.

The molecular analysis supported by NGS allowed us to identify variants in the KCND3, CTDSP2, MYBP3, TTN, and ACTN2 genes possibly related to SUD in a fifteen-year-old male. Additionally, the homozygous variant in the KCNH2 gene associated with long QT syndrome type 2 suggests the patient's death was due to a cardiac channelopathy. Our results support the diagnosis of this death as potentially associated with SCD due to genetic variants detected that affect the structure and function of the proteins and mild disarray found in the individual's cardiomyocyte fibers. Finally, to better assess the prevalence of these variants in sporadic SUD, molecular studies need to be performed on a more significant number of cases.

Ethical approval

Ethical approval for this study was granted by the local committee of the Science Faculty of the National University of Colombia. Principles contained in the updated Declaration of Helsinki were followed, as well as Laws, Decrees, and Resolutions related to viscerotomies and the use of forensic samples for research and teaching at the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank the University of Magdalena and the University of

Applied and Environmental Sciences UDCA, for their financial support, within their agreement with the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences as well as the National University of Colombia Faculty of Science and the Center of Excellence in Scientific Computing at the National University of Colombia.

References

- [1] C. Basso, M. Burke, P. Fornes, et al., Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death, *Virchows Arch.* 452 (2008) 11–18, <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0505-5>.
- [2] A.S. Adabag, R.V. Luepker, V.L. Roger, B.J. Gersh, Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors, *Nat. Rev. Cardiol.* 7 (2010) 216–225, <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.3>.
- [3] S.S. Clough, K. Reimier, C. Teodorescu, et al., Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 51 (2008) 213–228, <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2008.06.003>.
- [4] J.R. Kallman, P.D. Thompson, J. Lantos, et al., Screening for sudden cardiac death in the young: Report from a national heart, lung, and blood institute working group, *Circulation* 123 (2011) 1911–1918, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.017228>.
- [5] J. Tester David, Argelia Medeiros-Domingo, Melissa L. Will, Carla M. Haglund, Michael J. Ackerman, Cardiac channel molecular autopsy: insights from 173 consecutive cases of autopsy-negative sudden unexplained death referred for postmortem genetic testing, *Mayo Clin. Proc.* 87 (6) (2012) 524–539, <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2012.02.017>.
- [6] M.J. Ackerman, S.G. Priori, S. Willems, C. Berul, R. Brugada, H. Galkins, et al., HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA), *Heart Rhythm* 8 (8) (2011) 1308–1339, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.05.020>.
- [7] N. Narula, D.J. Tester, A. Paulmichl, J.J. Maleszewski, M.J. Ackerman, Postmortem whole exome sequencing with gene-specific analysis for autopsy-negative sudden unexplained death in the young: a case series, *Pediatr. Cardiol.* 36 (2015) 768–778, <https://doi.org/10.1007/s00246-014-1082-4>.
- [8] J. Neubauer, C. Haas, C. Bartsch, A. Medeiros-Domingo, W. Berger, Postmortem whole-exome sequencing (WES) with a focus on cardiac disease-associated genes in five young sudden unexplained death (SUD) cases, *Int. J. Leg. Med.* 130 (2016) 1011–1021, <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1317-4>.
- [9] A.A.T. Geisterfer-Lowrance, S. Kass, G. Tanigawa, H.P. Vospert, W. McKenna, J. G. Seidman, et al., A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain missense mutation, *Cell* 62 (1999) 999–1006, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90274-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90274-i).
- [10] E.L. Burkett, R.E. Hershberger, Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.* 45 (2005) 969–981, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.11.066>.

- [11] M. Toné Esteban, J. Garcia Pinilla, W.J. McKenna, Update in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: genetic, clinical presentation and risk stratification, *Rev. Esp. Cardiol.* 57 (8) (2004) 757–767, [https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(06\)60310-1](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(06)60310-1).
- [12] P.Zipes Douglas, et al., ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European society of cardiology committee for practice guidelines (Writing committee to develop guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death), *J. Am. Coll. Cardiol.* 548 (5) (2006) e247–e346, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.010> (Heart Rhythm Society, European Heart Rhythm Association).
- [13] S.G. Priori, S.V. Pandit, I. Rivolta, O. Berenfeld, E. Ronchetti, A. Dhamoon, C. Napolitano, J. Anumonwo, M.R. Di Barletta, S. Gudappakkam, G. Bosti, M. Stramba Badiale, J. Jalife, A novel form of short QT syndrome (SQTS) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene, *Circ. Res.* 96 (7) (2005) 800–807, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000162101.76263.8c>.
- [14] O. Campuzano, C. Allegue, S. Parteni, A. Iglesias, A. Oliva, R. Brugada, Negative autopsy and sudden cardiac death, *Int. J. Leg. Med.* 128 (4) (2014) 599–606, <https://doi.org/10.1007/s00414-014-0966-4>.
- [15] Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Franco S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Huffman M.D., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Magid D., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McGuire D.K., Mohler E.R., Moy C.S., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Schreiner P.J., Sorlie P.D., Stein J., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D., Woo D., Turner M.B.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2013). Heart disease and stroke statistics - 2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 1;127(1): e6-e245. DOI: 10.1161/CIR.0b013e31828124ad.
- [16] C.R. Bezzina, N. Lahrouchi, S.G. Priori, Genetics of sudden cardiac death, *Circ. Res.* 116 (2015) 1919–1936, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304030>.
- [17] Yingying Tang, Jay Stahl-Herz, Barbara A. Sampson, Molecular diagnostics of cardiovascular diseases in sudden unexplained death, *Cardiovasc. Pathol.* 23 (1) (2014) 1–4, <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2013.09.002>.
- [18] M.J. Ackerman, et al., HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the heart rhythm society (HRS) and the European heart rhythm association (EHRA), *Heart Rhythm* 8 (2011) 1308–1339, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.05.020>.
- [19] C. Sensarian, R.M. Hamilton, Key role of the molecular autopsy in sudden unexpected death, *Heart Rhythm* 9 (2012) 145–150, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.07.034>.
- [20] J.R. Giudicessi, M.J. Ackerman, Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes, *Transl. Res.* 161 (1) (2013) 1–14, <https://doi.org/10.1016/j.tnstr.2012.08.005>.
- [21] C. Sensarian, J. Ingles, A.A. Wilde, Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives, *Eur. Heart J.* 36 (2015) 1290–1296, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv063>.
- [22] S.G. Priori, A.A. Wilde, M. Horie, et al., HRS/EHRA/APHS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: expert consensus statement on inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEP in June 2013, *Heart Rhythm* 10 (12) (2013) 1932–1963, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.05.014>.
- [23] Andrews, S., 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- [24] S. Chen, Y. Zhou, Y. Chen, J. Gu, fastp: an ultra fast all in one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics* 34 (17) (2018) i884–i890, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
- [25] B. Langmead, S. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods* 9 (357–359) (2012) 2012, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- [26] Li H., 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:1303.3997v2 [q-bio.GN]. (if you use the BWA-MEM algorithm or the fastmap command or want to cite the whole BWA package). DOI: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1303.3997>.
- [27] T.D. Wu, S. Nacu, Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads, *Bioinformatics* 26 (7) (2010) 873–881, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq057>.
- [28] Novocraft., 2017. Novocraft & NovocraftCS Reference Manual. Release 3.07.00, 9th January. <https://www.novocraft.com/userfiles/file/Novocraft.pdf>
- [29] J.E. Lunshof, et al., Personal genomes in progress: from the human genome project to the personal genome project, *Dialog. Clin. Neurosci.* 12 (2010) 47–60, <https://doi.org/10.31887/DCNS.2010.12.1/jlunshof>.
- [30] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Honer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, The sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools, *Bioinformatics* 25 (16) (2009) 2078–2079, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> (1000 Genome Project Data Processing Subgroup).
- [31] Garrison, E. & Marth, G., 2012. Haplotype based variant detection from short read sequencing. arXiv preprint, arXiv:1207.3907 [q-bio.GN]: <https://doi.org/10.48550/arXiv.1207.3907>.
- [32] P. Cingolani, A. Platts, L.L. Wang, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, et al., A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnPEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118; iso-2; iso-3, *Landes Biosci.* 2 (2012) 1–13, <https://doi.org/10.4161/ly.19695>.
- [33] K. Wang, M. Li, H. Hakonarson, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010), e164, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn643>.
- [34] H. Yang, K. Wang, Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 1556–1566, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.105>.
- [35] S.T. Sherry, M.H. Ward, M. Holodov, J. Baker, L. Phan, E.M. Smigielski, K. Sirotkin, dbSNP: the NCBI database of genetic variation, *Nucleic Acids Res.* 29 (1) (2001) 308–311, <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>.
- [36] W. Fu, T.D. O'Connor, G. Jun, H.M. Kang, G. Abecasis, S.M. Leal, S. Gabriel, M. J. Rieder, D. Altshuler, J. Shendure, D.A. Nickerson, M.J. Banushad, Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants, *Nature* 493 (7431) (2013) 216–220, <https://doi.org/10.1038/nature11690>.
- [37] Erratum in: *Nature*. 2013 Mar 14;495(7440):270. Rieder, Mark J [added]. PMID: 23201682; PMCID: PMC3676746.
- [38] Konrad J. Karczewski, Ben Weisburd, Brett Thomas, Matthew Solomonson, Douglas M. Ruderfer, David Kavanagh, Tynor Hamamy, Monkol Lek, Kaitlin E. Samocha, Beryl B. Cummings, Daniel Birnbaum, The Exome Aggregation Consortium, Mark J. Daly, Daniel G. MacArthur, The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes, *Nucleic Acids Res.* 45 (D1) (2017) D840–D845, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw971>.
- [39] M.J. Landrum, J.M. Lee, M. Benson, G.R. Brown, C. Chao, S. Chitipiralla, B. Gu, J. Hart, D. Hoffman, W. Jang, K. Karapetyan, K. Katz, C. Liu, Z. Maddipati, A. Malheiro, K. McDaniel, M. Oretsky, G. Riley, G. Zhou, J.B. Holmes, B. L. Kattman, D.R. Maglott, ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence, *Nucleic Acids Res.* 46 (D1) (2018) D1062–D1067, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>. PMID: 29165669; PMCID: PMC5753237.
- [40] P.C. Ng, S. Henikoff, SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function, *Nucleic Acids Res.* 31 (13) (2003) 3812–3814, <https://doi.org/10.1093/nar/gkg509>. PMID: 12824425; PMCID: PMC168916.
- [41] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, S. Kondrashov, S.R. Sunyaev, A method and server for predicting damaging missense mutations, *Nat. Methods* 7 (4) (2010) 248–249, https://doi.org/10.1038/nmeth0410_248. PMID: 20354512; PMCID: PMC2855889.
- [42] J. Schwarz, D. Cooper, M. Schuelke, et al., MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age, *Nat. Methods* 11 (2014) 361–362, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>.
- [43] S. Chun, J.C. Fay, Identification of deleterious mutations within three human genomes, *Genome Res.* 19 (9) (2009) 1553–1561, <https://doi.org/10.1101/gr.092619.109>.
- [44] B. Reva, Y. Antipin, C. Sander, Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011), e118, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr407>.
- [45] H.A. Shihab, J. Gough, D.N. Cooper, et al., Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models, *Hum. Mutat.* 34 (1) (2013) 57–65, <https://doi.org/10.1002/humu.22225>.
- [46] C. Dong, P. Wei, X. Jian, R. Gibbs, E. Boerwinkel, K. Wang, X. Liu, Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies, *Hum. Mol. Genet.* 24 (8) (2015) 2125–2137, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi733>. Epub 2011 Dec 30. PMID: 2552646; PMCID: PMC4375422.
- [47] G.M. Cooper, D.L. Goode, S.B. Ng, A. Sidow, M.J. Bamshad, J. Shendure, D. A. Nickerson, Single nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease causing mutations, *Nat. Methods* 7 (4) (2010) 250–251, https://doi.org/10.1038/nmeth0410_250. PMID: 20354513; PMCID: PMC3145250.
- [48] Siepel A., Pollard K., Haussler D., 2006. New methods for detecting lineage-specific selection. In: Proceedings of the 10th Int'l Conference on Research in Computational Molecular Biology. Berlin: Springer-Verlag, pp.190–205. DOI: 10.1007/11732990_17.
- [49] M. Garber, M. Guttman, M. Clamp, M.C. Zody, N. Friedman, X. Xie, Identifying novel constrained elements by exploiting biased substitution patterns, *Bioinformatics* 25 (12) (2009) 154–162, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp190>. PMID: 19478016; PMCID: PMC2687944.
- [50] S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, 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.* 17 (5) (2015) 405–424, <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30> (ACMG Laboratory Quality Assurance Committee., Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753).
- [51] A.N. About Tayoun, T. Pesaran, M.T. DiStefano, A. Oza, H.L. Rehm, L.G. Biesecker, Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion, *Hum. Mutat.* 39 (11) (2018) 1517–1524, <https://doi.org/10.1002/humu.23626> (ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group).
- [52] H. Duzkalel, J. Shen, H. McLaughlin, A. Alfares, M.A. Kelly, T.J. Pugh, B. H. Funke, H.L. Rehm, M.S. Lebo, A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants, *Clin. Genet.* 84 (5) (2013) 453–463, <https://doi.org/10.1111/cge.12257>.
- [53] Jennifer J. David Ng, Jamie K. Johnston, Larry N. Teer, Lindsey C. Singh, Janila S. Peller, Katie L. Wynter, David N. Lewis, Peter D. Cooper, James C. Stenson, Mullikin, G. Leslie, Biesecker, Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6 (4) (2013), <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000039>.
- [54] M. Savarese, J. Sarparanta, A. Vilhola, B. Urd, P. Hacknau, Increasing role of titin mutations in neuromuscular disorders, *J. Neuromuscul. Dis.* 3 (3) (2016) 293–308, <https://doi.org/10.3233/JND160158>. PMID: 27854229; PMCID: PMC5123623.

J.A. Ariza et al.

Forensic Science International: Reports 6 (2022) 100300

- [57] M.A. Makara, J. Curran, E.R. Lubbers, N.P. Murphy, S.C. Little, H. Musa, S. A. Smith, S.D. Unudurthi, M.V.S. Rajaram, P.M.L. Janssen, P.A. Boyden, E. A. Bradley, T.J. Hund, P.J. Mohler, Novel mechanistic roles for ankyrin-G in cardiac remodeling and heart failure, *JACC Basic Transl. Sci.* 5 (2018) 675–689, <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2018.07.008>. PMID: 30456339; PMCID: PMC6234521.
- [58] B.M. Kroncke, T. Yang, P. Kannankeril, M.B. Shoemaker, D.M. Roden, Exploiting ion channel structure to assess rare variant pathogenicity, *Heart Rhythm* 15 (6) (2018) 890–894, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2018.01.021>.
- [59] K. Hong, P. Bjerregaard, I. Gussak, R. Brugada, Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 16 (2005) 394–396, <https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2005.40621.x>.
- [60] B.M. Kroncke, J. Mendenhall, D.K. Smith, C.R. Sanders, J.A. Capra, A.L. George, J. D. Blume, J. Meiler, D.M. Roden, Protein structure aids predicting functional perturbation of missense variants in SCN5A and KCNQ1, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17 (2019) 206–214, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.01.008>. PMID: 30828412; PMCID: PMC6383132.
- [61] P.L. Jia, Y.B. Wang, H. Fu, W.L. Huang, S.R. Zhong, L. Ma, Y.H. Li, Y. Dong, Z. C. Sun, L. Yang, P.F. Qu, S. Zhao, Y.Q. Qu, Y.M. Xi, S.W. Wang, X. Tang, P.P. Lei, Postmortem analysis of 4 mutation hotspots of KCNQ1, KCNH2, and SCN5A genes in sudden unexplained death in Southwest of China, *Am. J. Forensic Med Pathol.* 39 (3) (2018) 218–222, <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000411>. PMID: 29851656.
- [62] R. Walsh, K.L. Thomson, J.S. Ware, B.H. Funke, J. Woodley, K.J. McGuire, F. Mazzarotto, E. Blair, A. Seller, J.C. Taylor, E.V. Minikel, Consortium Exome Aggregation, D.G. MacArthur, M. Farrall, S.A. Cook, H. Watkins, Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples, *Genet. Med.* 19 (2) (2017) 192–203, <https://doi.org/10.1038/gim.2016.90>. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27532257; PMCID: PMC5116235.
- [63] F. Robert, J. Pelletier, Exploring the impact of single nucleotide polymorphisms on translation, *Front. Genet.* 9 (2018) 507, <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00507>. PMID: 30425729; PMCID: PMC6218417.
- [64] P.J. Wijnker, F.W. Friedrich, A. Dutsch, S. Reischmann, A. Eder, I. Mannhardt, G. Mearini, T. Eschenhagen, J. van der Velden, L. Carrier, Comparison of the effects of a truncating and a missense MYBPC3 mutation on contractile parameters of engineered heart tissue, *J. Mol. Cell Cardiol.* 97 (2016) 82–92, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.03.003>.
- [65] Maksymilian Prondzyski, Marc D. Lemoine, Antonia T.L. Zech, András Horváth, Vittoria Di Mauro, Jussi T. Koivunäki, Nico Kresin, Josefine Busch, Tobias Krause, Elisabeth Krämer, Saskia Schlossarek, Michael Spohn, Felix W. Friedrich, Julia Münch, Sandra D. Lauffer, Charles Redwood, Alexander E. Volk, Arne Hansen, Giulia Mearini, Daniele Catalucci, Christian Meyer, Torsten Christ, Monica Patten, Thomas Eschenhagen, Lucie Carrier (2019). Disease modeling of a mutation in α -actinin 2 guides clinical therapy in hypertrophic cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* 1: e11115. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911115>.
- [66] P.J. Mohler, I. Rivolta, C. Napolitano, G. LeMaillet, S. Lambert, S.G. Priori, V. Bennett, Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (50) (2004) 17533–17538, <https://doi.org/10.1073/pnas.0403711101>.
- [67] P.J. Wijnker, F.W. Friedrich, A. Dutsch, S. Reischmann, A. Eder, I. Mannhardt, G. Mearini, T. Eschenhagen, J. van der Velden, L. Carrier, Comparison of the effects of a truncating and a missense MYBPC3 mutation on contractile parameters of engineered heart tissue, *J. Mol. Cell Cardiol.* 97 (2016) 82–92, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.03.003>.
- [68] Maksymilian Prondzyski, Marc D. Lemoine, Antonia T.L. Zech, András Horváth, Vittoria Di Mauro, Jussi T. Koivunäki, Nico Kresin, Josefine Busch, Tobias Krause, Elisabeth Krämer, Saskia Schlossarek, Michael Spohn, Felix W. Friedrich, Julia Münch, Sandra D. Lauffer, Charles Redwood, Alexander E. Volk, Arne Hansen, Giulia Mearini, Daniele Catalucci, Christian Meyer, Torsten Christ, Monica Patten, Thomas Eschenhagen, Lucie Carrier (2019). Disease modeling of a mutation in α -actinin 2 guides clinical therapy in hypertrophic cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* 1: e11115. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911115>.
- [69] Chun Wang, Shan Duan, Guoli Lv, Xiaoping Lai, Rui Chen, Hanguang Lin, Shengyuan Qiu, Jianpin Tang, Wenjian Kuang, Chuanchao Xu, Using whole exome sequencing and bioinformatics in the molecular autopsy of a sudden unexplained death syndrome (SUIDS) case, *Forensic Sci. Int.* 257 (2015) e20–e25, <https://doi.org/10.1016/j.foresint.2015.08.022>.
- [70] D. Ballard, J. Winkler, Galicki, J. Wesoly, Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects, *Int. J. Leg. Med.* 134 (2020) 1291–1303, <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02294-0>.
- [71] V. Castiglione, M. Modena, A. Aimo, E. Chiti, N. Botto, S. Vittorini, B. Guidi, G. Vergaro, A. Barison, A. Rossi, C. Passino, A. Giannoni, M. Di Paolo, M. Emdin, Molecular autopsy of sudden cardiac death in the genomics era, *Diagnostics* 11 (8) (2021) 1378, <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081378>. PMID: 34441312; PMCID: PMC8394514.

Retrospective Molecular Analysis in Five Cases Probably Associated with Sudden Death the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences of Colombia

Alape Ariza J^{*1,2,5}, Medina Rocha AH³, Cabrera Pérez R⁴ and Bermúdez-Santana CI^{5,6}

¹Forensic Sciences Research Group, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Colombia

²Forensic Genetics Research Group, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Colombia

³Forensic Pathology Group, Bogotá Regional Directorate, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Colombia

⁴Institute of Cardiology, Fundación Cardio Infantil, Colombia

⁵Department of Biology, Faculty of Sciences, National University of Colombia, Colombia

⁶Center of Excellence in Scientific Computing, National University of Colombia, Colombia

***Corresponding author:** Joseph Alape Ariza, Forensic Sciences Research Group, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Bogotá, D.C. Colombia, Email: jalape@medicinalegal.gov.co; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5764-4873>

Research Article

Volume 8 Issue 2

Received Date: March 09, 2023

Published Date: May 11, 2023

DOI: 10.23880/ijfsc-16000304

Abstract

In recent years, significant advances have been made in understanding the genetic factors that predispose to sudden cardiac death, finding multiple affected genes that cause arrhythmic disorders, which could trigger sudden death in structurally normal hearts, to determine these genetic variants. It has an important role as a complement in autopsies of deaths to be determined. Cases and controls were analyzed through the study of the exome by next-generation sequencing. The variants were filtered following international recommendations, different software was used to determine the possible variants associated with cardiomyopathies and cardiac channelopathies. Twelve structural variants were found in six genes associated with different types of cardiomyopathies. Seven variants were found in six genes associated with cardiac channelopathies, and additionally, twenty-one variants were found in twelve genes of uncertain significance, four variants may be of clinical relevance. In deaths whose causes remain to be determined after performing the autopsy and considering negative toxicological, virologic, and microscopy results, it is extremely important to carry out a molecular analysis because the cause of death is possibly due to a channelopathy or an arrhythmia that is difficult to detect during the autopsy.

Keywords: SCD; Myocardiopathies; Channelopathies; NGS

- **Highlights**

In cases of sudden unexplained death, molecular studies can be extremely important to discern the possible cause of death.

When there are no cosegregation studies, in silico prediction studies of protein stability are very important.

Each of these variants alone may not have contributed significantly to the death, but variants taken together may partially contribute to a general genetic predisposition.

Introduction

The from a forensic point of view, sudden death is mainly defined as a quick, unexpected and natural death. When confronted with the study of a case of sudden cardiac death in an adult or in a child over one year of age, the pathologist generally places the case in one of the following three categories in order of frequency: 1) ischemic heart disease, 2) conditions or diseases grossly associated with sudden death, and 3) hearts that are normal at least on gross examination [1].

Heart disease is the most frequent cause of sudden death and, in turn, of these ischemic heart diseases in adults. Non-ischemic causes are, for example, respiratory diseases (pulmonary embolism and asthma), neurological diseases (cerebral hemorrhage and epilepsy). Even so, no cause of death is determined after a thorough post-mortem examination in approximately 5% of cases [2].

The genetic diagnosis of SCD is very complex, since it is still not easy to identify the causal pathogenic variant, since there are many genes involved, as in the case of channelopathies that present a Mendelian pattern of inheritance with different degrees of penetrance and variable expressivity of the disease [3], turning them into complex diseases, favoring the advancement of molecular tests that can understand the breadth and depth of heart diseases. These discoveries have directly affected the approach to snapshot autopsies by pathologists [4].

Molecular diagnosis has become especially useful in the investigation of SCD, not only to elucidate the cause of death, but also to identify risk factors because this type of disease has a family basis, of genetic origin. That can be monogenic and autosomal dominant, recessive, sex-linked, etc., and the autopsy can be the only possibility that a family can be referred to a cardiology hospital to receive adequate genetic counseling [5-7].

Studies to date have shown that ion channels can function as part of large complexes of macromolecules that

International Journal of Forensic Sciences

play crucial roles in the transcription, translation, post-translational modification, degradation of all cardiac ion channels, among others [8-10].

Therefore, understanding the structure and dynamic signaling of multiprotein assemblies is vital to understanding heart function during disease processes [11], and exome analysis can help elucidating some of these aspects that can modify domains in proteins can cause certain pathogenicity.

For this, the hypothesis will be handled: Given the high genetic addition that the Colombian population presents, it is possible to find new gene switches of the ion channels and that may be associated with the events of MSC. Our objective was to identify groups of genes that are possibly associated with sudden cardiac death, through the analysis of five people who died due to sudden death with a negative toxicological result, for which the TruSight One panel (clinical exome) was obtained

Materials and Methods

Subjects

Five (5) cases associated with sudden cardiac death and five (5) controls were selected. The corresponding review of the autopsy protocols was carried out, considering the circumstances of death, clinical history, macro and microscopic studies, toxicology and virology analysis as appropriate, during the autopsy.

Inclusion and Exclusion Criteria

Negative cases in structural coronary heart disease, with microscopically normal cardiomyocytes, negative for toxicology and virology, under 40 years of age. Controls whose death was caused by violent death, excluding those by suicide.

DNA Extraction

Total DNA extraction was performed from blood that was in the evidence center of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, using the QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi kit, following the manufacturer's recommendations.

Preparation of Libraries

Sample library preparation was performed with the TruSight One Sequencing Panel Series (Illumina), which includes 4834 clinically relevant genes, using the Nextera XT Kit (Illumina). The quantification of the libraries was carried out using the Quantitating dsDNA Kit using the Quantus™

Fluorometer Instrument and following the manufacturer's recommendations.

NGS Sequencing

Paired-end NGS sequencing of 2x150 bp with the MiSeq kit (Illumina Inc., San Diego, CA. USA) using MiSeq Reagent V3 (150 cycles), according to the protocol of the commercial house, was performed. The alignment of DNA readings was performed against the reference genome GRCH37/hg19.

Variant Annotation

The detected variants were annotated using the bioinformatic tools SnpEff [12-14], which integrate the population databases: dbSNP [15], of the 1000 genomes project (1000 Genomes Project Consortium), the NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) [16], database [17], and the gnomAD and exomAD databases (<http://gnomad.broadinstitute.org>). Variants with a MAF of 0.01 were filtered out. Information related to the association between human phenotype and causative genes was added with ClinVar [18,19]. In silico predictive algorithms were included: SIFT [20], PolyPhen-2 [21], MutationTaster [22], LRT [23], Mutation Assessor [24], FATHMM (Functional Analysis Through Hidden Markov Models) [25], MetaSVM [26], RadialSVM, LR, VEST3, CADD, GERP++ [27-29], to assess the pathogenicity of the identified variants. Determining the minor allele frequency (MAF) to filter variants. The norms and guidelines for the interpretation of sequence variants suggested by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) were followed for the classification of causality of each of the variants [30].

Prediction of SNP Impact on Protein Stability

I-Mutant3.0 tools were used to predict the stability of a protein-based on the presence and type of microvariant. For MuPro structural analysis allows the calculation of protein stability variations at arbitrary SNPs.

For the final predictive results of the I-Mutant 3.0 and Mupro tools, the results of the two previous bioinformatics tools were integrated, considering that if the prediction for the SNP is that stability decreases in two tools, the SNP would be considered as a high-risk ARX pathogen.

For the analysis of the effect of the SNP on the 3D structure of proteins and physicochemical properties, the HOPE server was used, which searches for 3D structures of proteins by collecting structural information from a series of sources, including calculations in the 3D coordinates of the protein. UniProt base sequence annotations and predictions from DAS services, are available at <http://www.cmbi.ru.nl/hope/>.

Results

Clinical exome sequencing was performed in five unrelated SUD cases, although the data provided covered sequence variants in 4834 genes, the analysis focused on 184 genes associated with heart disease or sudden death. Bioinformatics filtering was performed considering the quality of the variants, population frequency, information provided by the various databases and in silico prediction and following the recommendations of the ACMG/AMP group. Once the different filters were made, relevant variants were found in ten genes that are presented in (Table 1).

Cases	Gene	rsID	Func	Genetic Variant	Change AA	zygosity	MAF			
							ExAC	1000g	gnomAD exome	gnomAD genome
I	TRDN	rs372169818	exon2	c.G196A	p.V66I	het	0,04971	0.00019968	0,06909	Absent
	TTN	rs746749916	exon154	c.G48780T	p.W16260C	het	0,008302	Absent	0,01633	Absent
	TTN	.	exon186	c.T73979C	p.I24660T	het	Absent	Absent	0,004069	3.23E-05
	CAV3	rs753990961	exon2	c.A185G	p.Y62C	hom	0,008264	Absent	0,004063	Absent
I, II	DSP	rs78652302	exon24	c.A3701T	p.E1234V	het	0.0095	0.00399361	0.0095	0.0112
II	TTN	rs776534823	exon27	c.G5905A	p.A1969T	het	0,008243	Absent	0,008139	3.23E-05
	TTN	rs181189778	exon64	c.T16495A	p.S5499T	het	0.0003	0.00019968	0.0003	0.0003
II, V	DSG2	rs142841727	exon15	c.T2759G	p.V920G	het	0.0032	0.00319489	0.0036	0.0033

III	TRPM4	rs138603244	exon17	c.A2365G	p.S789G	het	0.0009	0.00319489	0.0005	0.002
	AKAP9	rs2230768	exon18	c.G4841A	p.R1614Q	het	0.0023	0.00898562	0.0018	0.0084
	ANK3	rs41274676	exon37	c.C4465T	p.P1489S	het	0.0019	0.00079872	0.0017	0.0019
	ANK3	rs201547988	exon37	c.C11159T	p.T3720M	het	0.0002	0.00019968	0.0002	0.0002
IV	TTN	rs759415579	exon168	c.C67100T	p.P22367L	het	0,008287	Absent	0,03257	Absent
	ANK2	rs61734478	exon38	c.G6634A	p.G2212S	hom	0.0047	0.0219649	0.0037	0.014
V	CACNA1C	rs185788586	exon43	c.C5689T	p.R1897C	het	0.0075	0.00858626	0.0101	0.0018
V	TTN	rs75686037	exon27	c.C5093T	p.P1698L	het	0.0063	0.00698882	0.0072	0.0026

Table 1: Variants Selected for Analysis According to Population Frequencies with A MAF \leq 0.05.

Of the sixteen variants detected, nine variants are of uncertain significance, two present conflicting interpretations of pathogenicity, the rest is benign or slightly benign. Ten variants associated with Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, Arrhythmogenic right

ventricular cardiomyopathy, Dilated cardiomyopathy 1G, Progressive familial heart block type 1B, Long QT syndrome, Romano-Ward syndrome, Brugada syndrome, Primary dilated cardiomyopathy and Hypertrophic cardiomyopathy, (Table 2).

Cases	Change AA	CLNDN	CLNSIG
I	p.V66I	Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia	Uncertain significance
	p.W16260C	---	Uncertain significance
	p.I24660T	---	Uncertain significance
	p.Y62C	---	Uncertain significance
I, II	p.E1234V	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	Conflicting interpretations of pathogenicity
II	p.A1969T	Dilated cardiomyopathy 1G	Uncertain significance
	p.S5499T	Dilated cardiomyopathy 1G	Uncertain significance
II, V	p.V920G	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	Conflicting interpretations of pathogenicity
III	p.S789G	Progressive familial heart block type 1B	Benign
	p.R1614Q	Long QT syndrome, Romano-Ward syndrome	Benign, Likely benign
	p.P1489S	---	Uncertain significance
	p.T3720M	---	Uncertain significance
	p.P22367L	---	Uncertain significance
IV	p.G2212S	Long QT syndrome	Benign
	p.R1897C	Long QT syndrome, Brugada syndrome	Benign, Likely benign
V	p.P1698L	Hypertrophic cardiomyopathy, Dilated cardiomyopathy 1G	Benign, Likely benign

Table 2: Clinical Significance of the Variants Found in Five Cases of Unexplained Death.

In silico pathogenic predictors, pathogenic (D), probably pathogenic (Pp), and benign (T) variants were determined. A cutoff point of 20 were used for the CADD algorithm.

Prediction of conservation of the sequence used a cutoff point greater than 4.4. Results are shown in (Table 3).

Cases	Change AA	SIFT pred	Polyphen2 HDIV pred	Polyphen2 HVAR pred	LRT pred	Mutation Taster pred	Mutation Assessor pred	FATHMM pred	Radial SVM pred	LR pred	CADD phred	GERP++ RS
I	p.V66I	T	D	D	D	D	L	T	T	T	19.57	5.82
	p.W16260C	D	D	D	.	D	H	D	D	D	12.74	5.87
	p.I24660T	D	P	P	.	D	L	T	T	T	14.53	5.59
	p.Y62C	D	D	D	D	D	M	D	D	D	17.36	3.44
I, II	p.E1234V	T	D	D	D	N	L	T	T	T	20.4	5.2
II	p.A1969T	D	D	D	.	D	L	T	T	T	12.34	5.12
II	p.S5499T	D	D	D	.	D	M	T	T	T	14.29	6.03
II, V	p.V920G	T	P	B	N	N	L	T	T	T	4378	2.5
III	p.S789G	T	D	P	D	D	M	T	T	T	26.5	5.09
	p.R1614Q	T	P	B	N	N	N	T	T	T	8925	1.43
	p.P1489S	D	D	D	D	D	M	T	D	D	17.55	5.69
	p.T3720M	D	D	P	N	D	L	T	T	T	16.37	5.3
	p.P22367L	D	D	D	.	D	H	T	D	D	19.08	6.03
IV	p.G2212S	.	D	B	N	D	L	T	T	T	13.77	3.85
	p.R1897C	T	D	P	N	N	N	T	T	T	8708	4.26
V	p.P1698L	D	D	D	.	D	M	T	T	T	11.85	5.05

Table 3: Prediction of pathogenicity of SNPs in silico for SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster, LRT, Mutation Assessor, FATHMM, MetaSVM, RadialSVM, LR, CADD and GERP++.

Prediction of SNP Impact on Protein Stability

Changes in the protein stability of variants were examined using I-Mutant 2.0 and MUpro software (Table 4). The results predicted either an increase or a decrease in the free energy upon amino acid substitutions. I-Mutant, it predicts the stability by examining the Gibbs free energy by the $\Delta\Delta G$ value = ΔG (New protein) - ΔG (Wild type) in kcal/mol, which is calculated at pH 7 and 25 °C. Scores <0 are

predicted by the algorithm to indicate decreased stability, whereas scores >0 are considered to indicate increased stability. The DDG ($\Delta\Delta G$) prediction by I-Mutant 2.0 showed that the 17 (72.3%) nsSNPs had a decreased stability value with DDG < 0 whereas -10 (22.7%) nsSNPs had an increased stability value with DDG > 0. With regard to MUpro reported that 1 (4.5%) substitutions increased the stability protein structure while 21 (95.5%) substitutions decreased it.

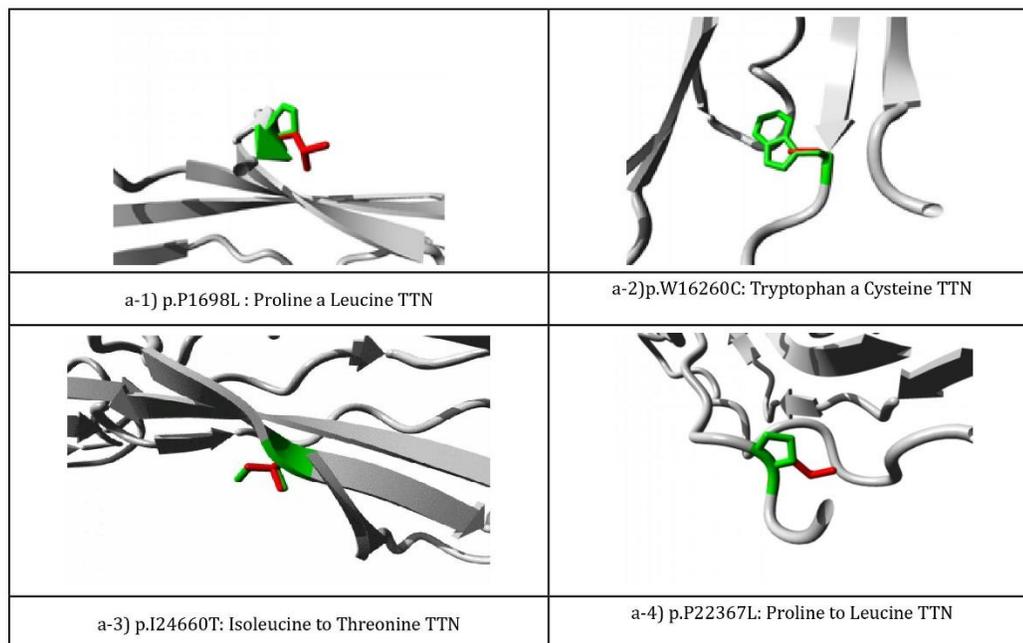
Gen	rsID	AA Change	I-Mutant 3.0 Prediction	RI	DDG score prediction	MuPro Prediction	MuPro Score
TRDN	rs372169818	p.V66I	Decrease	6	-0.45	Decrease	-0.76372025
TTN	rs746749916	p.W16260C	Decrease	8	-1.64	Decrease	-0.3799672
TTN	-----	p.24660T	Decrease	7	-2.01	Decrease	-1.8524381
CAV3	rs753990961	p.Y62C	increase	2	-1.07	Decrease	-0.94970534
DSP	rs78652302	p.E1234V	Increase	2	0.09	Decrease	-0.57600156
TTN	rs776534823	p.A1969T	Decrease	3	-0.6	Decrease	-1.0005569
TTN	rs181189778	p.S5499T	Decrease	0	-32	Decrease	-0.65558429
DSG2	rs142841727	p.V920G	Decrease	9	-2.02	Decrease	-2.2447524
TRPM4	rs138603244	p.S789G	Decrease	9	-1.12	Decrease	-1.3670468

AKAP9	rs2230768	p.R1614Q	Decrease	4	-0.33	Decrease	-0.59876134
ANK3	rs41274676	p.P1489S	Decrease	9	-1.9	Decrease	-1.4299976
ANK3	rs201547988	p.T3720M	Decrease	4	-0.39	Decrease	-0.37011007
TTN	rs759415579	p.P22367L	Increase	2	-0.3	Decrease	-0.38920806
ANK2	rs61734478	p.G2212S	Decrease	4	-1.01	Decrease	-0.40436484
CACNA1C	rs185788586	p.R1897C	Decrease	6	-1.08	Decrease	-0.67510594
TTN	rs75686037	p.P1698L	Decrease	4	-0.44	Increase	0.83737709

Table 4: Protein Stability of the Snps by I-Mutant 3.0 and Mupro: Mupro: Predicts that the Mutation Could Relatively Destabilize Protein or not. Score Smaller than Zero, Means that the Substitution Decreases the Protein Stability. Conversely, the Score >0 Means that the Mutation Increases Protein Stability. I-Mutant: Predicts Whether A Point Mutation Stabilizes Or Destabilizes The Native Protein Structure Based On The Free Energy Change ($\Delta\Delta G$).

The analysis 3D structure prediction, visualization and physiochemical changes of substitutions: In order to study the biophysical properties of these mutations, Project HOPE

server was used to serve this purpose, RaptorX was used to predict a 3D structure model for TTN, TRPM4 and KCND3 protein (Figure 1).



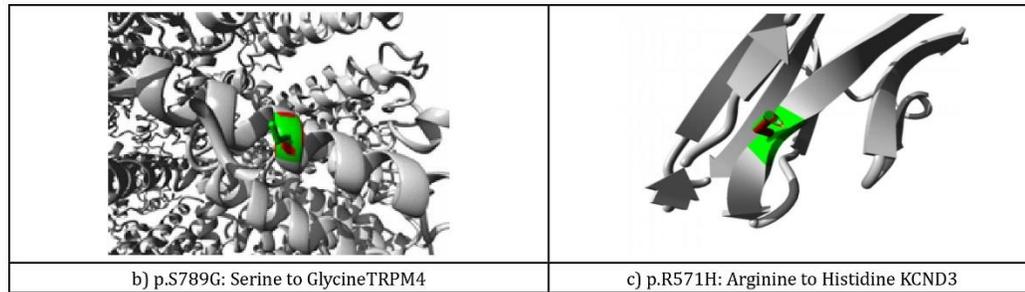


Figure 1: Close-up of the pathogenic variant TTN, TRPM4 and KCND3 genes. The protein is grey, and the side chains of the wild type and mutant residues are shown and colored green and red, respectively. Variant: a-1) p.P1698L, a-2) p.W16260C, a-3) p.I24660T, and a-4) p.P22367L; b) p.S789G, and c) p.R571H.

For Figure 1:

TTN gen: a-1) (p.P1698L): the amino acid Proline changes to Leucine at position 1698. Wild-type and mutant amino acids differ in size. The mutant residue is larger, this could lead to bumps, the hydrophobicity of the wild-type and mutant residue differs. Hydrophobic interactions, either in the core of the protein or on the surface, will be lost.

a-2) p.W16260C: Wild-type and mutant amino acids differ in size, the mutated residue is smaller than the wild-type residue, the mutation will cause an empty space in the core of the protein. The mutated residue is located in a domain that is important for the binding of other molecules and in contact with residues in a domain that is also important for binding. The mutation could disturb the interaction between these two domains and, as such, affect the function of the protein.

a-3) p.I24660T: Wild-type and mutant amino acids differ in size, the mutated residue is smaller than the wild-type residue, the mutation will cause an empty space in the core of the protein, the hydrophobicity of the wild-type and mutant residue differs. The mutation will cause the loss of hydrophobic interactions in the core of the protein.

a-4) p.P22367L: Wild-type and mutant amino acids differ in size. The mutated residue is larger than the wild-type residue, the wild-type residue was buried in the core of the protein. The mutant residue is larger and probably won't fit.

TRPM4: b) p.S789G: Wild-type and mutant amino acids differ in size, the mutated residue is smaller than the wild-type residue. The mutation will cause an empty space in the core of the protein.

KCND3: c) p.R571H: There is a difference in charge between the wild-type and the mutated amino acid. The charge of the wild-type residue will be lost, which can lead to loss of interactions with other molecules or residues, Wild-type and mutant amino acids differ in size. The mutated residue is located in a domain that is important for the main activity of the protein. Mutation of the residue could alter this function.

The analysis of the clinical exome in case I identified six variants: one in the DSP gene (rs78652302) heterozygous, associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), however, in clinical significance it appears conflicting pathogenicity interpretation; a heterozygous variant in the TRDN gene (rs372169818), of moderate impact, associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT), of uncertain significance and four variants of uncertain significance in the TTN genes (rs746749916 and p.I24660T), in the gene CAV3 (rs753990961) and in the DSPP gene (p.D1143E). All four variants are heterozygous, nonsense, and of moderate impact.

In case II, four variants were identified: two in the TTN gene (rs776534823 and rs181189778) heterozygous, nonsense of moderate impact, of uncertain significance, associated with Limb-girdle muscular dystrophy, type 2

diabetic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy 1G; one in the DSP gene (rs78652302) also reported for case 1; and one in the DSG2 gene (rs14841727) heterozygous, nonsense, of moderate impact, associated with ARVC, type 2 diabetic myopathy and cardiovascular phenotype, presents conflict of interpretation of pathogenic.

In Case III, five variants were identified: one in the TRPM4 gene (rs138603244) heterozygous, nonsense of moderate impact, associated with progressive familial heart block type 1B, cardiovascular phenotype, benign; one in the AKAP9 gene (rs2230768) heterozygous, nonsense, of moderate impact, associated with LQT syndrome, Romano-Ward syndrome, cardiovascular phenotype, considered benign/probably benign; three variants of uncertain significance in the TTN genes (rs759415579) and in the ANK3 gene (rs201547988 and rs41274676) the three heterozygous, nonsense and moderate impact variants.

In case IV, two variants were identified: one in the ANK2 gene (rs61734478) homozygous, nonsense, of moderate impact, associated with LQT syndrome, cardiovascular phenotype, benign; one in the CACNA1C gene (rs185788586) heterozygous, nonsense, moderate impact associated with LQT syndrome, Brugada syndrome, Timothy syndrome, cardiovascular phenotype, benign/probably benign.

In case V, two variants were identified: one in the TTN gene (rs75686037) heterozygous, nonsense, of moderate impact, associated with hypertrophic cardiomyopathy, Limb-girdle muscular dystrophy, type 2 dilated myopathy, Markesbery-Griggs type distal myopathy, cardiomyopathy dilated 1G, hereditary myopathy with early respiratory failure, early-onset diabetic myopathy, diabetic myopathy with fatal cardiomyopathy, dominant diabetic myopathy, recessive diabetic myopathy, benign/probably benign

Discussion

Authors of this study, the use of NGS allowed the identification of possible variants associated with cardiac disease in five victims of sudden cardiac death (Table 1).

In the case of the infants, while each of these variants alone may not have contributed significantly to death, it may be plausible that each of the variants observed in these cases partially contributed to an overall genetic predisposition, in an infant going through critical stages in its development, it is possible that these factors together may have contributed to the death of infants, which is known as "polygenic risk score", an additive effect caused by multiple low-risk variants, each with a low pathogenic effect, but which collectively can produce sub threshold functioning of physiological pathways of interaction [28,29]. However, more tests should be done.

In all five cases the deaths occurred during sleep. Cardiac diseases responsible for sudden death are characterized by autosomal inheritance, locus heterogeneity, and variable expressivity [30], which is consistent with our results.

The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP) published guidance for interpretation of sequence variants based on in silico predictions, population frequencies and functional analysis, pathogenic and likely pathogenic variants have additional implications for sudden death diagnostic purposes [31].

We found three variants with pathogenicity interpretation conflict in the DSP, DSG2 and MYBPC3 genes and seven variants of unknown significance and based

International Journal of Forensic Sciences

on ACMG/AMP, which is very complicated in the forensic context.

Which were limited in our study, in addition, the antemortem clinical history of the deceased persons was not available.

The proper interpretation of the variants found is very important, since the interpretation of pathogenicity cannot be underestimated or overestimated, since it could bring consequences of uncertainty for families, therefore the analysis must be multidisciplinary and use as many of analysis tools to determine if a variant is pathogenic.

Conclusion

This Clinical exome analysis of five unrelated SUD cases revealed 15 protein-altering variants (MAF < 0.05), some of them clinically relevant, and the need arises to contact relatives for more detailed studies. The detection of variants of uncertain significance leads to the need to develop specific forensic guidelines that allow an adequate interpretation of rare genetic variants, together with a multidisciplinary team.

The variants found in the TRDN, TTN, CAV3, DSP, DSG2, TRPM4, AKAP9, ANK3, ANK2, and CACNA1C genes alone would not explain the cause of death, however, considering the frequencies population, the results of pathogenicity predictors, the presence of two or more variants in the same gene or different genes could lead to sudden cardiac death.

Sudden unexpected death of infants or adults can be attributed to a myriad of different diseases, only one of which is a hereditary heart disease, and being able to explore the possibilities of other diseases in a deceased person brings many challenges, especially when not accounted for. With the medical history.

Acknowledgments

The financial support was provided by the University of Magdalena and the University of Applied Sciences and Environmental Sciences UDCA, within the agreement they have with the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences.

Ethical Approval

Ethical approval for this study principles contained in the updated Declaration of Helsinki were followed, as well as Laws, Decrees, and Resolutions related to viscerotomies and the use of forensic samples for research and teaching at the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences.

References

1. Mellor G, Raju H, de Noronha SV, Papadakis M, Sharma S, et al. (2014) Clinical characteristics and circumstances of death in the sudden arrhythmic death syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 7(6): 1078-1083.
2. Katritsis DG, Gersh BJ, Camm AJ (2016) A Clinical Perspective on Sudden Cardiac Death. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 5(3): 177-182.
3. Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, et al. (2013) HRS/EHRA/APHR expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: Expert consensus statement on inherited primary arrhythmia syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHR in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 10(12): 1932-1963.
4. Cronin EM, Bogun FM, Maury P, Peichl P, Chen M, et al. (2019) HRS/EHRA/APHR/LAHR expert consensus statement on catheter ablation of ventricular arrhythmias. *Europace* 21(8): 1143-1144.
5. Basso C, Aguilera B, Banner J, Cohle S, d'Amati G, et al. (2017) Association for European Cardiovascular Pathology. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch* 471(6): 691-705.
6. Seidemann SB, Smith E, Subrahmanyam L, Dykas D, Abou Ziki MD, et al. (2017) Application of Whole Exome Sequencing in the Clinical Diagnosis and Management of Inherited Cardiovascular Diseases in Adults. *Circ Cardiovasc Genet* 10(1): e001573.
7. Loporcaro CG, Tester DJ, Maleszewski JJ, Kruesselbrink T, Ackerman MJ, et al. (2014) Confirmation of Cause and Manner of Death Via a Comprehensive Cardiac autopsy Including Whole Exome Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 138(8): 1083-1089.
8. Garcia-Elias A, Benito B (2018) Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. *Int J Mol Sci* 19(3): 692.
9. Abriel H, Rougier JS, Jalife J (2015) Ion Channel Macromolecular Complexes in Cardiomyocytes: Roles in Sudden Cardiac Death. *Circ Res* 116(12): 1971-1988.
10. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A, et al. (2017) Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet* 18: 14.
11. Abriel H, Rougier JS, Jalife J (2015) Ion Channel Macromolecular Complexes in Cardiomyocytes: Roles in Sudden Cardiac Death. *Circ Res* 116(12): 1971-1988.
12. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, et al. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6(2): 80-92.
13. Wang K, Li M, Hakonarson H (2010) ANNOVAR: Functional Annotation of Genetic Variants from High-Throughput Sequencing Data. *Nucleic Acids Res* 38(16): e164.
14. Yang H, Wang K (2015) Genomic Variant Annotation and Prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc* 10(10): 1556-1566.
15. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, et al. (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29(1): 308-311.
16. Fu W, O'Connor TD, Jun G, Kang HM, Abecasis G, et al. (2013) Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature* 493(7431): 216-220.
17. Ma D (2013) Magnetic resonance fingerprinting. *Nature* 495(7440): 270.
18. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, et al. (2017) The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res* 45(D1): D840-D845.
19. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, et al. (2018) ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res* 46(D1): D1062-D1067.
20. Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3812-3814.
21. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, et al. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4): 248-249.
22. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11(4): 361-362.
23. Chun S, Fay JC (2009) Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res* 19(9): 1553-1561.

24. Reva B, Antipin Y, Sander C (2011) Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res* 39(17): e118.
25. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GL, et al. (2013) Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat* 34(1): 57-65.
26. Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, et al. (2015) Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet* 24(8): 2125-2137.
27. Cooper GM, Goode DL, Ng SB, Sidow A, Bamshad MJ, et al. (2010) Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations. *Nat Methods* 7(4): 250-251.
28. Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, et al. (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460(7256): 748-752.
29. Dudbridge F (2013) Power and predictive accuracy of polygenic risk scores. *PLoS Genet* 9(3): e1003348.
30. Tayeh MK, Chen M, Fullerton SM, Gonzales PR, Huang SJ, et al. (2022) The designated record set for clinical genetic and genomic testing: A points to consider statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 25(3): 100342.
31. Grondin S, Davies B, Cadrin-Tourigny J, Steinberg C, Cheung CC, et al. (2022) Importance of genetic testing in unexplained cardiac arrest. *Eur Heart J* 43(32): 3071-3081.



