ANÁLISIS GENÓMICO EN PACIENTES CON ANOMALÍA DE EBSTEIN

TESIS DE MAESTRÍA

PRESENTADA POR:

ROSSI ISABEL QUERO ANGARITA

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C., 2018

Título de Tesis de Maestría

Análisis Genómico en pacientes con Anomalía de Ebstein

DIRECTOR:

CARLOS M RESTREPO

CLAUDIA T SILVA

PROGRAMA DE MAESTRÍA

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

GENÉTICA HUMANA

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO 3

ÍNDICE DE GRÁFICAS 5

ÍNDICE DE TABLAS 6

ÍNDICE DE GRÁFICAS SUPLEMENTARIAS 7

INDICE DE DATOS SUPLEMENTARIOS 8

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS 9

ÍNDICE DE ANEXOS 10

ABREVIATURAS 12

RESUMEN EJECUTIVO 13

PALABRAS CLAVE 13

INTRODUCCIÓN 14

MARCO TEÓRICO 16

EMBRIOGÉNESIS CARDÍACA 16
ETIOLOGÍA DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS 18
ENFERMEDAD VALVULAR 18
ANOMALÍA DE EBSTEIN 20
ALTERACIONES EN EL GENOMA COMO CAUSA DE LA ANOMALÍA DE EBSTEIN 23
ANÁLISIS GENÓMICO 23
ANÁLISIS CROMOSÓMICO 24
ANÁLISIS DE EXOMA COMPLETO 25

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 27

OBJETIVOS 28

OBJETIVO GENERAL 28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

MATERIALES Y MÉTODOS 29

DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN DE PACIENTES **29**
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PACIENTES CON AE NO SINDRÓMICA **30**
SELECCIÓN DE PACIENTES CON PATOLOGÍA SINDRÓMICA O ANTECEDENTE FAMILIAR **32**
CONSTRUCCIÓN DE UN PANEL DE GENES CANDIDATOS **34**
DISEÑO Y BÚSQUEDA DE BIBLIOGRAFÍA 34
CLASIFICACIÓN DE LOS GENES 35
IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS **36**
MÉTODO DIAGNÓSTICO 36

RESULTADOS **41**

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES **41**
ANÁLISIS ESTADÍSTICO **47**
ANÁLISIS DE CLUSTER 47
ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA 48
ANÁLISIS DE VARIANTES GENÓMICAS **49**
RESULTADOS DE LA HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA 49
RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN EXÓMICA 52

DISCUSIÓN **54**

CONCLUSIONES **59**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **60**

GRÁFICAS SUPLEMENTARIAS **66**

DATOS SUPLEMENTARIOS **70**

TABLAS SUPLEMENTARIAS **71**

ANEXO 1 - ARTÍCULO PUBLICADO **77**

ANEXO 2 - ARTÍCULO SOMETIDO **78**

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Metodología 30
Gráfica 2. Diseño de enfermedades cardiacas congénitas y genes asociados 35
Gráfica 3. Algoritmo de hipótesis de etiología genética 37
Gráfica 4. Filtrado de variantes 40
Gráfica 5. Mortalidad por clasificación de Carpentier 43
Gráfica 6. Mortalidad por obstrucción de TSVD 43
Gráfica 7. Clasificación de pacientes por análisis de Cluster 48
Gráfica 8. Supervivencia del adulto 49
Gráfica 9. Fenotipo del paciente del caso No. 8 50
Gráfica 10. Deleción 1p36 51
Gráfica 11. Puntos de corte cromosómico 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Carpentier _____ *21*
Tabla 2. Características de los pacientes _____ *42*
*Tabla 3. Comorbilidades de los pacientes*_____ *46*
Tabla 4. Procedimientos quirúrgicos _____ *47*
*Tabla 5. Resultado aCGH del paciente del caso No.2*_____ *50*

ÍNDICE DE GRÁFICAS SUPLEMENTARIAS

Gráfica suplementaria 1. Árbol genealógico de familia del caso No. 1 _____ *66*
Gráfica suplementaria 2. Árbol genealógico de familia del caso No. 7 _____ *66*
Gráfica suplementaria 3. Árbol genealógico de familia del caso No. 2 _____ *66*
Gráfica suplementaria 4. Árbol genealógico de familia del caso No. 3 _____ *67*
Gráfica suplementaria 5. Árbol genealógico de familia del caso No. 8 _____ *67*
Gráfica suplementaria 6. Árbol genealógico de familia del caso No. 10 _____ *67*
Gráfica suplementaria 7. Árbol genealógico de familia del caso No. 11 _____ *68*
Gráfica suplementaria 8. Árbol genealógico de familia del caso No. 12 _____ *68*

INDICE DE DATOS SUPLEMENTARIOS

Suplementaria 1. Filtrado de variantes de los pacientes de los casos No. 1 y 7 _____ *69*
Suplementaria 2. Filtrado de variantes entre paciente de caso No. 3 y su hermano ____ *69*
Suplementaria 3. Genes compartidos entre hermanos del caso No.3 y su padre _____ *69*
Suplementaria 4. Filtrado de variantes entre familiares afectados del caso 10 _____ *70*
Suplementaria 5. Filtrado de variantes entre familiares afectados del caso 11 _____ *70*
Suplementaria 6. Filtrado de variantes entre paciente de caso No. 12 y su hermana ___ *70*

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Genes relacionados con cardiopatías congénitas _____ *71*
Tabla suplementaria 2. Genes relacionados con Miocardiopatía Hipertrófica _____ *71*
Tabla suplementaria 3. Genes relacionados con Miocardiopatía dilatada _____ *72*
*Tabla suplementaria 4. Genes asociados con Miocardiopatía arritmogénica*_____ *72*
Tabla suplementaria 5. Genes asociados con Miocardiopatía no compactada _____ *72*
Tabla suplementaria 6. Genes asociados con Miocardiopatía restrictiva _____ *73*
Tabla suplementaria 7. Genes asociados a Rasopatías _____ *73*
Tabla suplementaria 8. Genes asociados a Hipertensión pulmonar _____ *73*
Tabla suplementaria 9. Genes asociados a síndrome de QT largo _____ *73*
Tabla suplementaria 10. Genes asociados a síndrome de QT corto _____ *74*
*Tabla suplementaria 11. Genes asociados a Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica*_____ *74*
*Tabla suplementaria 12. Genes asociados a síndrome de Brugada*_____ *74*
Tabla suplementaria 13. Genes asociados a alteración en el sistema de conducción ___ *74*
Tabla suplementaria 14. Genes asociados a fibrilación auricular _____ *75*
Tabla suplementaria 15. Genes asociados a enfermedades aórticas _____ *75*
Tabla suplementaria 16. Genes relacionados con cardiopatía y enfermedad músculo-esquelética _____ *76*
*Tabla suplementaria 17. Genes asociados a Hipercolesterolemia familiar*_____ *76*

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 - ARTÍCULO PUBLICADO

ANEXO 2 - ARTÍCULO SOMETIDO

Con mi más sincero agradecimiento

para todos los que han hecho posible este trabajo.

ABREVIATURAS

AD: Autosómico dominante

AE: Anomalía de Ebstein

ASD - CIA: Defecto del septo atrial – comunicación interauricular

AR: Autosómico recesivo

BRD: Bloqueo de rama derecha

CC: Cardiopatía congénita

CV: Cardiovascular

CGH: Hibridación genómica comparada

CHD: Enfermedad cardiaca congénita

CNVs: Variaciones de número de copias

FCI-IC: Fundación Cardioinfantil-Instituto de Cardiología

FISH: Hibridación *In situ* fluorescente

LVNC: No compactación del ventrículo izquierdo

NGS: Secuenciación de siguiente generación

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

TSV: Taquicardia supraventricular

TSVD: Tracto de salida del ventrículo derecho

VD: Ventrículo derecho

VSD – CIV: Defecto del septo ventricular – comunicación interventricular

WES: Secuenciación exómica completa

WGS: Secuenciación genómica completa

WPW: Wolf-Parkinson-White

RESUMEN EJECUTIVO

El desarrollo embrionario del corazón es un proceso complejo regulado por diversas vías de señalización a cargo de un numeroso grupo de genes. La presencia de mutaciones génicas, de anormalidades cromosómicas, de variaciones epigenéticas y de regulación sumadas a factores ambientales, pueden alterar este proceso, generando cardiopatías congénitas que pueden estar asociadas a diferentes fenotipos y variabilidad clínica, como es el caso de la anomalía de Ebstein.

Colombia reconoce gran parte de estas enfermedades como huérfanas, debido a la baja prevalencia y al impacto en la vida del paciente, constituyéndose en padecimientos de especial interés para el Ministerio de Salud y para la literatura global. No obstante, el acceso escaso de los pacientes a las herramientas diagnósticas en biología molecular y el desconocimiento de las pruebas idóneas para este tipo de patologías por gran parte de los especialistas, ha llevado a que solo un pequeño número de afectados tenga el reconocimiento de la causa molecular que explica su padecimiento.

Este abordaje es de vital importancia, no solo para el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, sino también para realizar un adecuado asesoramiento genético en las familias afectadas, lo que permite establecer riesgos de recurrencia, identificar portadores y personas susceptibles de desarrollar la condición.

Con el presente trabajo se pretende identificar las anormalidades genómicas presentes en personas con anomalía de Ebstein provenientes de diferentes regiones de Colombia y contribuir con la comunidad científica en la búsqueda de genes y alteraciones moleculares que permitan explicar los mecanismos asociados a estas patologías.

Palabras clave

Cardiopatías Congénitas, Anomalía de Ebstein, Hibridación Genómica Comparada, Exoma.

INTRODUCCIÓN

Las Cardiopatías Congénitas (CC) globalmente afectan al 5-8% de los nacidos vivos (1) y de ellas, las más severas y complejas abarcan entre el 0.16% y 0.20%. La anomalía de Ebstein (AE), es una de las CC más infrecuentes y está asociada con altas tasas de morbimortalidad, afectando menos del 1% de los neonatos y su etiología en la mayoría de los casos permanece incierta. Un mejor entendimiento de las causas genéticas de la AE puede ayudar a formular estrategias para el diagnóstico oportuno, predecir los cursos clínicos, las respuestas a tratamientos de los pacientes y prevenir la recurrencia a través de procesos de asesoría genética.

Las investigaciones sobre las causas genéticas de las CC en Colombia se han limitado a muestras pequeñas, a metodologías de baja resolución y a CC frecuentes, quedando un remanente mayoritario de casos sin diagnóstico genético incluyendo la AE. Por esta razón, son necesarios estudios de investigación que contengan un mayor número de personas, con criterios de inclusión más estrictos para la asignación del fenotipo (como presencia de antecedentes familiares con AE o CC), y el uso de metodologías que permitan la detección de un mayor rango de alteraciones cromosómicas y/o mutaciones génicas.

La AE se manifiesta con diversos grados de displasia de la válvula tricúspide del corazón que se emplaza de manera variable en el interior del ventrículo derecho, lo cual explica una severidad clínica variable. Puede presentarse de manera aislada o sindrómica y la etiología de la AE permanece desconocida, a pesar de que en algunos casos se ha asociado con la administración de litio en mujeres con condiciones psiquiátricas durante el embarazo(2–4) y para otras personas se ha asociado con mutaciones en los genes *NKX2-5* y *MYH7*(5–8).

Debido al poco conocimiento científico sobre la etiología de esta malformación, se consideró indispensable el abordaje de la AE con la aplicación de nuevas tecnologías y avances genéticos para intentar reducir la brecha del conocimiento sobre la etiología y los factores causales genéticos, razones por las cuales se desarrolló el presente proyecto.

Se seleccionaron niños con diagnóstico de AE valorados en la Fundación Cardioinfantil-Instituto de Cardiología (FCI-IC) para ser evaluados por la consulta de Genética del

Departamento de Pediatría, con la colaboración de la unidad de Genética de la Universidad del Rosario. A los pacientes que cumplieron los criterios del estudio, inicialmente, se les realizó un análisis de hibridación genómica comparativa con base en microarreglos (microarrays aCGH), para la detección de microdeleciones y microduplicaciones y poder señalar nuevos genes o *loci* potencialmente involucrados que explicaran el trastorno. En aquellos pacientes en quienes no se encontraron variantes candidatas por el método de citogenética molecular de alta resolución, se les realizó seguidamente una secuenciación exómica completa (WES o *whole exome sequencing*), con el fin de identificar aquellas variantes no sinónimas en estado homocigoto, heterocigoto compuesto o heterocigoto simple en genes que pudieran explicar la patología, según el modo de herencia y su función. Adicionalmente, se realizó un análisis de las muestras de los familiares disponibles de las personas afectadas, para determinar el origen y si este era consistente con la historia familiar. En todos los casos, se ofreció una sesión inicial de asesoramiento genético en la consulta clínica, así como una sesión final, una vez se obtuvieron los resultados.

Una vez se realizó la caracterización fenotípica de los pacientes con AE en la población colombiana con base en la heterogeneidad y variabilidad clínica, se observó un hallazgo previamente no identificado que es la existencia de endofenotipos presentes en los afectados. Por otra parte, se identificó la asociación de un fenotipo sindrómico complejo con AE y múltiples anomalías congénitas presentes en una persona con deleción 1p36, que sugiere la presencia de dos regiones críticas diferentes en esta alteración cromosómica.

En conclusión, se obtuvo una descripción de las causas genéticas de la anomalía de Ebstein, la asociación de este padecimiento con un fenotipo sindrómico, y la ampliación de anormalidades presentes en un síndrome conocido, con las cuales fue posible ampliar el espectro de la identificación de las causas de la AE, así como la detección, seguimiento y prevención de esta cardiopatía. La adición de la asesoría genética para los portadores, familiares y afectados, sobre los factores de riesgo genéticos, dan pie a la toma de decisiones informadas y contribuyen en la reducción de los riesgos en nuevos afectados. Además, el uso de nuevas tecnologías de alto rendimiento, junto con algoritmos novedosos de análisis genómicos y de datos, permitió alcanzar el objetivo de generar nuevo conocimiento, y de fortalecer las capacidades diagnósticas y epidemiológicas de este padecimiento.

MARCO TEÓRICO

Las cardiopatías congénitas (CC) son alteraciones estructurales del corazón o de los grandes vasos intratorácicos que causan un compromiso funcional real o potencial y que se producen durante el desarrollo embrionario del corazón (9). Constituyen el defecto del desarrollo más común en nuestra especie y afectan aproximadamente entre el 5 al 8% de los neonatos (1).

El corazón contiene tejidos de varios orígenes embrionarios, células altamente especializadas y realiza funciones químicas complejas, por lo que la formación del órgano implica múltiples eventos y pasos de diferenciación, morfogénesis y función. La arquitectura genética para la mayoría de las CC no ha sido completamente identificada a la fecha, la presencia de errores durante la embriogénesis genética conduce a un desarrollo anormal del corazón y da origen a distintas cardiopatías, con lo cual el reconocimiento de los genes y mecanismos causales de las CC ofrecerá un excelente conocimiento frente al desarrollo y la función del corazón. Hoy se puede decir que las CC son causadas por una variedad de eventos tales como alteraciones cromosómicas, mutaciones génicas (monogénicas, oligogénicas o poligénicas), junto con alteraciones epigenéticas y/o ambientales (10,11). No obstante, se estima que la etiología de las CC, en cerca del 80% de los casos, sigue siendo desconocida.

Para entender el origen de las CC se requiere en parte conocer la embriogénesis cardiaca y, para los efectos del presente trabajo, con énfasis en el proceso de la génesis de las válvulas del corazón y tomando en cuenta que la AE es un defecto en el emplazamiento de la válvula tricúspide, se concentrará la atención en esta estructura. De la misma forma, es necesaria el entendimiento de la contribución de la genética y los errores genómicos que puedan estar presentes en la AE, para, seguidamente describir los métodos de análisis molecular que se pueden emplear en el presente estudio para la identificación de la causa y los mecanismos embriológicos que explican esta cardiopatía.

Embriogénesis cardíaca

El corazón es el primer órgano observable durante el desarrollo embrionario, en su génesis están involucrados procesos dinámicos de transformación y desarrollo de diversos tipos de células y linajes celulares (12). Las células que intervienen en la morfogénesis cardiaca son

esenciales para el subsecuente desarrollo de cada uno de los componentes cardiacos y son originarias del primer campo del corazón; estas células primarias contribuyen únicamente a la formación del ventrículo derecho (VD) y del canal aurículo-ventricular (CAV). De otro lado, las células derivadas del segundo campo del corazón provienen de la migración de precursores mesenquimales que dan origen a las aurículas, al ventrículo izquierdo (VI) y a gran parte del tracto de salida del órgano (13,14).

A los 15 días de la gestación, las células cardiacas progenitoras se disponen de forma simétrica para formar las crestas precardiacas las cuales se configurarán en futuros cardiomiocitos. Posteriormente, las crestas cardiacas dan origen al tubo cardiaco a la tercera semana de la embriogénesis (14,15). Alrededor de la cuarta semana de la gestación, el tubo cardiaco sufre una torsión hacia la derecha, originando la formación de un corazón embrionario que posee cinco elementos: el tracto de entrada, el atrio embrionario, el CAV, el ventrículo embrionario y el tracto de salida (13). Seguidamente, entre la quinta y sexta semanas de gestación ocurre la septación del ventrículo y del atrio primitivo mediante la aparición de paredes (septos) interventriculares e interauriculares respectivamente. Este proceso resulta en un corazón completamente tabicado, con cuatro cámaras y los tractos de entrada y salida (10,16).

La formación de las válvulas del corazón es evidente en los fetos humanos entre la quinta y sexta semana de desarrollo embrionario y, una vez ocurre la formación de las almohadillas endocárdicas que transforman el epitelio mesenquimal al interior de la pared del tubo cardiaco (15), se originan las válvulas aurículo-ventriculares que corresponden a las válvulas mitral y tricúspide, las cuales preceden a las válvulas del tracto de salida o válvulas semilunares que son representadas por las válvulas aórtica y pulmonar (17).

Esta naturaleza compleja de diferenciación y morfogénesis, junto con el alto número de componentes estimados como posibles, que son codificados genéticamente, hace viable la posibilidad de que se incorporen errores o mutaciones que conducen a un desarrollo anormal del órgano cardíaco y originan algunas de las distintas CC.

Etiología de las cardiopatías congénitas

La etiología de la mayoría de las CC permanece desconocida. Se ha estimado que el 65-80% de los casos son de etiología multifactorial (combinación de factores genéticos y ambientales); el 20-35% restante, se atribuye a anomalías cromosómicas, a enfermedades mendelianas y a CC no sindrómicas asociadas a genes específicos o a factores teratogénicos (18,19).

Desde hace tiempo las CC se han asociado a anomalías cromosómicas numéricas o estructurales en un 8 a 10% de los casos. Las más frecuentes son las trisomías 21, 18 y 13 (Síndromes Down, Edwards y Patau) y los síndromes Turner, Klinefelter, velocardiofacial, DiGeorge, Williams (monosomía X, 47,XXY, del22q11 y del7p), entre otros (18–20).

Aproximadamente el 3 al 5% de las CC pueden estar asociadas a anomalías extracardiacas o ser atribuidas a síndromes de etiología mendeliana como son: los síndromes Alagille, Noonan, Holt-Oram, Ellis-van Creveld, Smith-Lemli-Opitz, CHARGE y Kabuki, entre otros. Por otra parte, hay CC no sindrómicas que se han encontrado asociadas con genes específicos; varios de los genes involucrados son factores de transcripción como es el caso de *GATA* (*GATA4, GATA5, GATA6*), Home-box (*NKX2-5, NKX2-6*) y T-box (*TBX1, TBX5, TBX20*), de proteínas estructurales como actinas cardiacas y miosinas (*ACTC1, MYH7, MYH6, MYH11*) y moléculas de señalización celular como es el caso de la vía Notch-Jagged y NODAL (18,20).

Por último, en cuanto a los factores ambientales, entre los cuales se pueden destacar como causales las enfermedades maternas como diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico, enfermedad febril, infecciones virales (rubéola en la madre) y la exposición a teratógenos como talidomida, litio y ácido retinoico (18,20). Otros posibles mecanismos genéticos implicados en CC no sindrómicas y que no han sido del todo estudiados, son los polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) y los micro RNAs (20).

Enfermedad valvular

Las válvulas son las estructuras cardiacas que regulan el paso del flujo sanguíneo entre las cavidades del corazón y la salida hacia los vasos principales (21). Cuando se impide la apertura de alguna de las válvulas el fenómeno se le denomina estenosis y mientras que cuando se afecta el cierre valvular se le denomina insuficiencia, casos en los cuáles se presentaría enfermedad valvular o valvulopatía cardiaca que puede estar presente en cada una de las válvulas del corazón de forma congénita o adquirida (21,22).

A continuación, se presentarán las principales enfermedades valvulares congénitas para cada válvula del corazón. De estas, la válvula aórtica bicúspide, el prolapso de la válvula mitral, la estenosis de la válvula pulmonar y la anomalía de Ebstein de la válvula tricúspide son los ejemplos más claros y estudiados hasta la fecha.

La válvula aórtica es bicúspide, tiene dos valvas en lugar de tres, es disfuncional hasta en el 1% y 2% de la población (17) y las personas afectadas presentan complicaciones como estenosis y regurgitación de la válvula aórtica, endocarditis infecciosa, aneurismas y disección aórtica. Así mismo, presentan calcificación temprana, hallazgo que conduce a valvulopatía aórtica calcificada (23).

El prolapso de la válvula mitral, afecta entre el 2-3% de la población general (17). Ocurre cuando hay un abombamiento anormal y desplazamiento de las valvas de la válvula mitral durante la sístole ventricular. Las personas afectadas pueden tener un mayor riesgo de regurgitación de la válvula mitral, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmia y endocarditis infecciosa (24).

La estenosis de la válvula pulmonar representa el 8-10% de todas las CC (25) y ocurre debido al engrosamiento de las valvas de la válvula pulmonar. En este caso, es común la insuficiencia tricuspídea y puede haber algún grado de hipoplasia de ventrículo derecho (9). En adición, está presente en la mayoría de los casos con síndrome Noonan (22).

Por último, las anomalías de la válvula tricuspídea realmente son infrecuentes, aunque se han notificado casos de pacientes afectados con atresia tricúspidea y de pacientes con anomalía

de Ebstein (26).

Anomalía de Ebstein

Una de las anomalías congénitas del corazón más crípticas y poco común es la anomalía de Ebstein (AE) la cual representa menos del 1% de todas las CC. En la AE se presenta un incorrecto funcionamiento de la válvula tricúspide la cual está aumentada de tamaño y se emplaza inusualmente al fondo del ventrículo derecho, razones que explican grados variables de disfunción valvular. El defecto de emplazamiento y el tamaño valvular facilitan la regurgitación de la sangre y un flujo retrógrado hacia la aurícula derecha, en lugar de salir hacia los pulmones (27), lo que origina la hipertrofia del corazón que luego causa falla cardiaca (28).

Se ha estimado que el 43% de los casos de AE son aislados y el 57% de los casos restantes están asociados a otras anomalías congénitas. En este último caso, la AE se presenta tanto con anomalías extra-cardiacas (19%) como con otras alteraciones cardiacas (38%), de las cuales, la mayoría (el 20%) es con lesiones estructurales cardiacas concurrentes. Frecuentemente en la AE hay defectos del septo interauricular (CIA, 66% de los casos), por lo que se considera la CIA como como parte de la condición (29). Le siguen en frecuencia la estenosis o atresia de la válvula pulmonar, el conducto arterioso persistente y, en orden descendente, la tetralogía de Fallot, la coartación aórtica, la transposición de grandes vasos y la CIV.

Es de resaltar que algunas anormalidades en la conducción cardiaca son características de la AE, siendo las más frecuentes: el bloqueo de rama derecha (75%), las arritmias (22-42%), la fibrilación y el *flutter* auricular (25%), el bloqueo auriculo-ventricular de primer grado (25-40%) y el síndrome Wolff Parkinson-White (WPW; 25%). El síndrome WPW es un trastorno de pre-excitación que se caracteriza por intervalo PR corto y la presencia de una onda delta con morfología de haz anómalo derecho (en la vía antero-lateral derecha), en la mayoría de los casos, o bien por el compromiso de múltiples vías (10-40%) en un menor número de veces.

Los exámenes diagnósticos para la AE abarcan radiografía de tórax, electrocardiograma, ecocardiograma, e imágenes de resonancia magnética cardiovascular; siendo el ecocardiograma el exámen de elección para el diagnóstico y para la valoración inicial de pacientes con AE, puesto que permite identificar y determinar la severidad de la anomalía cardiaca y la existencia de otros defectos cardiacos concomitantes.

Dependiendo del grado de desplazamiento de la válvula en el interior del ventrículo derecho y de la movilidad resultante en la valva anterior, evidenciados mediante un ecocardiograma, se determina el grado de severidad de esta patología, a lo que se le denomina la clasificación de Carpentier (30,31). Esta consiste en 4 categorías, desde la A hasta la D y en orden descendente, siendo la A la de menor severidad, y la D como la de mayor implicación o severidad (30,31) (Ver tabla 1).

CLASIFICACIÓN DE CARPENTIER	
TIPO	**DESCRIPCIÓN**
A	• La valva anterior es grande y móvil. • Hay desplazamiento de las valvas septal y posterior moderado sin volumen restrictivo del VD funcional
B	• La valva anterior conserva bastante movilidad. • Hay desplazamiento hacia abajo de las valvas posterior y septal. • VD atrializado.
C	• La valva anterior presenta movilidad limitada con los espacios intercordonales imperforados (valva anterior estenótica).
D	• Las tres valvas están adheridas al tabique formando un saco continuo que se adhiere al VD dilatado. • Atrialización de todo el ventrículo derecho, excepto por un componente infundibular pequeño

Tabla 1. Clasificación de Carpentier

La historia natural y el pronóstico de las personas con AE dependen en gran medida de la edad de presentación, del grado del defecto anatómico, del flujo sanguíneo pulmonar, de la insuficiencia de la válvula tricúspide, de la concomitancia de lesiones estructurales cardiacas y de la presencia de arritmias de difícil manejo, lo que significa, un espectro diverso en la

presentación clínica de la AE, que abarca desde un cuadro clínico severo que ocasiona la muerte intrauterina o neonatal, o, un cuadro clínico leve en el que puede haber ausencia de síntomas hasta la edad adulta.

La mayoría de los casos son esporádicos y los casos familiares son raros. Se ha relacionado algunas veces como el resultado de teratogenia fetal por exposición al litio (2–4), y también se le ha asociado con mutaciones en los genes *NKX2-5* y *MYH7*(5–8).

NKX2-5 es un factor de transcripción homeobox esencial en el desarrollo cardíaco. Las mutaciones en *NKX2-5* causan diversas malformaciones cardíacas congénitas, incluyendo malformaciones conotruncales, CIA, CIV, hipoplasia del ventrículo izquierdo y tetralogía de Fallot. Benson et al. (1999), identificaron 7 mutaciones nuevas en *NKX2-5* en 26 individuos con diferentes anomalías cardiacas, entre las cuales estaba la AE (32).

El gen *MYH7* codifica para la cadena pesada β de la miosina, expresada en las fibras del músculo cardíaco. Las personas con mutaciones en este gen, pueden presentar compromiso cardíaco con fenotipos diversos tales como AE, miocardiopatía hipertrófica (7), miocardiopatía dilatada y la no compactación del ventrículo izquierdo (LVNC, por su nombre en inglés)(5,6), tanto de manera aislada como con otras anomalías intra-cardíacas. En este sentido, Hirono et al. (2011), describieron un caso raro de AE familiar asociado con una mutación patogénica nueva en el gen *MYH7*, presente en un padre y dos de sus hijos, los cuales cursaban con AE, LVNC y CIV(8).

Las mutaciones patogénicas encontradas en pacientes con AE explican una proporción baja de los casos, lo que sugiere que las variaciones en la secuencia de nucleótidos de este y otros genes involucrados en el desarrollo del corazón pueden explicar algunos otros casos, bajo modelos poligénicos o multifactoriales. De la misma manera, la relación entre la variación en el número de copias (CNVs) y la AE, así como modelos de herencia oligogénica o la presencia de factores epigenéticos y/o ambientales, probablemente pueden explicar casos adicionales (11).

Alteraciones en el genoma como causa de la anomalía de Ebstein

Los errores genómicos que pueden dar origen a las cardiopatías congénitas, son de naturaleza variada y son el resultado de cambios en la secuencia, en la organización, en la regulación, en la función o en la expresión del ADN. A nivel de la molécula del ADN, la AE puede ser causada por la mutación en un solo gen (monogénica), de algunos pocos genes (oligogénica), de múltiples genes (poligénicas), o por una combinación de mutaciones en genes y/o factores ambientales (multifactoriales), y también por daños en los cromosomas (cambios en el número o estructura de un cromosoma entero), o de parte de los cromosomas (CNVs).

Los CNVs se definen como cambios estructurales en los cromosomas que surgen de la recombinación del genoma, que resultan de deleciones o inserciones genéticas que usualmente no son identificadas en el análisis cromosómico tradicional (Cariotipo), dado que están por fuera del alcance visual del microscopio de luz.

Las sustituciones de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*; SNP) son los cambios de una base por otra en un lugar específico del genoma. Es el tipo de variación genómica más común, y algunas de ellas se constituyen en mutaciones. Los SNPs se dividen en variantes de cambio de sentido (*missense*), en las que la sustitución resulta en la producción de una proteína con un aminoácido diferente al presente en la secuencia polipeptídica original, cambio que puede alterar su función; y en las variantes sin sentido (*nonsense*), en las que la sustitución genera una señal prematura de terminación de la síntesis de la proteína, lo que resulta en una proteína incompleta y generalmente disfuncional. Adicionalmente, las mutaciones que afectan la secuencia específica de nucleótidos en los sitios de *splicing*, interfieren y, a veces, impiden totalmente el proceso de corte y empalme normal del RNA en ese sitio. Las mutaciones descritas anteriormente pueden alterar factores de transcripción y vías de señalización que impiden el correcto desarrollo del corazón, llevando a la presencia de una CC.

Análisis genómico

Las tecnologías para la identificación de las causas genéticas de la patología humana han progresado significativamente en los últimos años con nuevos métodos de secuenciación y de análisis cromosómico que han contribuido a elucidar nuevas causas diversas las CC.

Análisis cromosómico

Estudios recientes han mostrado que las alteraciones de los CNVs son causa principal patogénica de hasta el 10% de los casos con CC y se ha encontrado que entre el 3 al 25% de los pacientes con CC se presentan con anormalidades extra-cardiacas. Sin embargo, los rendimientos diagnósticos reportados han sido muchas veces alcanzados con tecnologías de baja resolución como son el cariotipo, el FISH y la secuenciación dirigida).

Aunque el cariotipo continúa siendo el patrón de oro para el diagnóstico de aneuploidías y otras anormalidades cromosómicas grandes, las resoluciones del cariotipo y del FISH se han vuelto insuficientes para detectar las causas genéticas en la mayoría de pacientes con CC de causa incierta y en casi la mitad de los pacientes con CC asociadas a un síndrome.

Métodos moleculares como el MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) y los arreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH), han demostrado ser herramientas indispensables para la detección de síndromes de microdeleciones y microduplicaciones que no son usualmente detectadas por un análisis cromosómico convencional.

El uso de la aCGH ha mostrado una mayor sensibilidad para la identificación de desbalances cromosómicos y, particularmente está indicado en las personas con déficit cognitivo, autismo o trastornos del espectro autista, síndromes de malformaciones múltiples congénitas y en el diagnóstico prenatal y de pre-implantación. Dada la disponibilidad de aCGH de alta resolución es probable que con esta nueva tecnología sea posible mejorar la sensibilidad para identificar mutaciones por variación de CNVs que afecten un rango menor de genes contiguos y un rendimiento diagnóstico más alto.

Por lo tanto, se ha recomendado el uso de la aCGH para el diagnóstico genético de primera línea para las CC más frecuentemente asociadas a microdeleciones/microduplicaciones, en especial cuando hay características extra-cardíacas presentes y no se tiene sospecha de algún diagnóstico. En aquellos casos en los que no se identifican CNVs después de un resultado

normal de aCGH de alta resolución, pero se tienen pacientes con fenotipos con el potencial de ser causados por variaciones en SNPs, se debe descartar la posibilidad de una causa monogénica.

Análisis de exoma completo

Algunos de los desarrollos más significativos en el área de diagnóstico genético en los últimos años han sido las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS). Estas técnicas tienen tiempos de respuesta más rápidos y una mayor costo-efectividad, comparado con los métodos de secuenciación tradicionales (secuenciación de Sanger). La secuenciación de Sanger es el patrón de oro para el análisis dirigido a genes específicos o mutaciones familiares, también para la identificación de nuevos genes mediante la demostración de mutaciones que causan el fenotipo en la cual, previamente no se ha relacionado el gen; sin embargo, en la mayoría de los casos no asociados a investigación, requiere un conocimiento previo de los genes causantes de la enfermedad. Por otro lado, las metodologías de NGS brindan un mayor rendimiento diagnóstico para enfermedades con sospecha genética o de causa incierta, o para condiciones genéticamente heterogéneas que provienen de mutaciones en varios loci.

Las ventajas de la NGS se han visto reflejadas en la implementación clínica de la secuenciación de exoma completo (WES). A diferencia de la secuenciación de genoma completo (WGS), que analiza cada base del genoma, WES se centra específicamente en las regiones que codifican para proteínas (WES corresponde aproximadamente al 1-2% del total del genoma humano, lo que corresponde a 30 Mb del DNA. WGS corresponde al 85-95% del total de la secuencia del genoma humano, es decir a 3 Gb del WSG) y asume que una proporción significativa de enfermedades genéticas sin caracterizar pueden ser explicadas por la variación de la secuencia de ADN codificante. Esta asunción es razonable para condiciones heredables porque la mayoría de mutaciones que resultan en enfermedades mendelianas han sido tradicionalmente detectables en regiones codificantes para proteínas.

WES se ha utilizado exitosamente para identificar defectos genéticos asociados con diversas CC. Sin embargo, la interpretación de las variantes detectadas continúa siendo un desafío

importante, al identificar variantes únicas codificantes por exoma secuenciado y variantes potencialmente patogénicas incluso en individuos aparentemente sanos. Por lo tanto, es indispensable la realización de un enfoque clínico con un planteamiento diagnóstico correcto, un análisis detallado con base en una revisión cuidadosa y extensa de la literatura, una adecuada gestión de la información con buena calidad en la interpretación, una utilización de las bases de datos para todas las variantes de potencial relevancia clínica y la clasificación adecuada de estas variantes como benignas, patogénicas o de significado clínico incierto, y por último, una orientación clínica post test con un acertado asesoramiento genético personal y familiar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las Cardiopatías Congénitas (CC) complican entre el 0.16% y 0.20% de los nacimientos. Debido a los diversos fenotipos, y a la diversa heterogeneidad de causas, sean estas genéticas, ambientales o complejas, la prevalencia es baja y, por ello, muchas de ellas están clasificadas como enfermedades huérfanas por el gobierno nacional. La mayoría de las CC representan un alto impacto en la vida de las personas y su manejo generalmente es quirúrgico, lo cual genera altos costos para el sistema de salud. Un mejor entendimiento de las causas genéticas de estas enfermedades puede ayudar a predecir los cursos clínicos y las respuestas a tratamientos de diferentes pacientes y a prevenir su recurrencia a través de procesos de asesoría genética.

Baltaxe y Zarante estimaron en 0.12% la prevalencia de CC en once hospitales de Colombia e identificaron la edad materna y paterna avanzada como uno de los factores de riesgo para el desarrollo de las CC. Este resultado es consistente con un aumento en las tasas de anormalidades cromosómicas y mutaciones génicas en hijos nacidos de padres mayores y predice un aumento en la prevalencia de las CC como resultado de una transición epidemiológica. Adicionalmente, las estadísticas de las brigadas de detección de niños enfermos del corazón realizadas por la FCI-IC entre el año 2005 y 2014, muestran una mayor prevalencia y diferencia regional de algunas CC en Colombia, lo que sugiere contrastes en el contexto genético subyacente al desarrollo de estas enfermedades.

Las investigaciones sobre las causas genéticas de CC en Colombia se han limitado a muestras pequeñas y a metodologías de baja resolución para la detección de deleciones en 22q11.2 y mutaciones en el gen *GATA4*, las cuales identificaron variantes en 3 de 61 y 9 de 33 pacientes respectivamente, dejando a la mayoría de los casos sin diagnóstico genético. Por esta razón, se hace necesario investigar sobre las causas genéticas de las CC en Colombia, en este caso la AE, la cual hace parte del programa PINOCCHIO (Programa para la Innovación en Cardiopatías Congénitas Humanas Infrecuentes para Colombia), utilizando tamaños de muestra mayores y metodologías de mayor sensibilidad que permitan la detección de un de anormalidades cromosómicas (microdeleciones/microduplicaciones) mediante aCGH y de mutaciones génicas mediante análisis de WES.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Describir las anormalidades genómicas presentes en pacientes colombianos con anomalía de Ebstein valorados por la Fundación Cardioinfantil entre 1997 y 2016

Objetivos Específicos

- Identificar los fenotipos presentes en las personas con AE
- Describir las características epidemiológicas de las personas con AE
- Identificar anormalidades cromosómicas por métodos de alta resolución en la AE
- Identificar genes candidatos asociados al desarrollo de anomalía de Ebstein

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio y población de pacientes

Se realizó un estudio observacional de corte transversal para caracterizar la presentación clínica de la AE. Las personas incluidas en el estudio, tenían la confirmación diagnóstica de AE en más de un reporte ecocardiográfico que evidenciaba el desplazamiento distal mayor a 0,8 cm/m² en las valvas tricuspídeas (29), en relación con la valva anterior de la válvula mitral. Se excluyeron las personas con transposición de grandes vasos y/o displasia tricuspídea que no tuvieran AE, dado que estos afectados pueden imitar la AE.

Se examinaron los registros de 147 personas con diagnóstico de AE que asistieron a la FCI-IC entre 1997 y 2016 (ver gráfica 1). Estas personas fueron identificadas como parte de la base de datos de la cohorte de enfermedades cardiacas congénitas (CHD, por sus siglas en inglés) del programa PINOCCHIO y a través de un programa institucional de detección de enfermedades coronarias a nivel nacional. El estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional de la FCI-IC, y el comité de ética institucional

Los datos epidemiológicos se obtuvieron de tres fuentes principales de información: una base de datos institucional del programa nacional de detección de CHD que incluye a 12 ciudades colombianas; una base de datos de los registros médicos de los pacientes con AE y un registro institucional de cirugía cardíaca. Una vez que se consolidó un registro central, se excluyeron todos los registros duplicados.

Características como el sexo, la edad de la primera valoración en la FCI-IC, la presencia de comorbilidades (cardiovasculares y no cardiovasculares), los signos y síntomas presentes en la primera consulta, y los datos de mortalidad y de cirugías realizadas, se analizaron retrospectivamente según los registros médicos.

En algunos casos en los que la información no estaba disponible, los datos se obtuvieron por llamada telefónica a los familiares del registro. De todos los casos, solo seis pacientes se perdieron durante el seguimiento.

Gráfica 1. Metodología

Análisis estadístico de pacientes con AE no sindrómica

Para determinar si la distribución de las comorbilidades mostraba patrones que sugirieran la existencia de endofenotipos en las personas analizadas, se realizó un análisis de agrupamiento *(cluster)* para la clasificación de pacientes basado con base en múltiples variables y, de acuerdo con esto, las personas con más características en común se aglutinan en grupos específicos. Este análisis se ha utilizado previamente para clasificar a los pacientes con anomalías congénitas en subgrupos clínicamente relevantes en función de su fenotipo.

El tamaño de muestra para este análisis se determinó teniendo en cuenta el número de variables y la dimensionalidad de los datos, calculando un tamaño de muestra 2^x, donde X representa el número de variables, siendo estas variables dicotómicas cualitativas (por lo tanto, no se necesitó estandarización).

Con un tamaño de muestra de 133 casos aislados de AE (excluyendo 14 individuos con patología sindrómica), se identificaron cinco comorbilidades cardíacas relevantes, cada una presente en más de diez pacientes, lo cual permitió la clasificación con base a la presencia o ausencia de estas patologías. Las comorbilidades que superaron este umbral y que fueron tenidas en cuenta son: 1. La comunicación interauricular (incluye CIA ostium primum, CIA

ostium secundum y foramen oval permeable); 2. El síndrome WPW; 3. El bloqueo completo de rama derecha (BRD); 4. La obstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho (incluye estenosis pulmonar, atresia pulmonar con CIV, atresia pulmonar sin CIV y tetralogía de Fallot) y 5. La taquicardia supraventricular (TSV).

Por otra parte, se consideró que un paciente tenía una presentación sindrómica si había presencia de anomalías extracardiacas, déficit cognitivo o sospecha de un síndrome específico. Estos pacientes no se incluyeron ni en el clúster ni en el análisis de supervivencia, con el fin de comprender mejor la heterogeneidad de la AE no sindrómica.

Algunas alteraciones cardiacas no fueron incluidas en el estudio como: el bloqueo incompleto de la rama derecha dado que no representa una característica hemodinámica importante y es un hallazgo frecuente en personas sanas; el *ductus arterioso* persistente debido a que algunas veces es secundario al tratamiento con prostaglandinas para la AE dependiente de este, lo cual representaba un factor de confusión; la hipertensión pulmonar, debido a que puede ser una consecuencia hemodinámica de la obstrucción del tracto de salida del VD y el grado de insuficiencia tricuspídea el cual varió significativamente entre las diferentes mediciones, motivo por el cual no fue incluido pero fue considerado lo suficientemente grave para requerir intervención quirúrgica en 27 (18,4%) pacientes. De la misma manera, las arritmias ausentes antes de la cirugía y desarrolladas en el post-operatorio no se incluyeron en el análisis (con la excepción del síndrome WPW) y se etiquetaron como arritmias post-quirúrgicas, presumiblemente como resultado de daño miocárdico.

La agrupación se llevó a cabo utilizando el método jerárquico (con el algoritmo Ward y la distancia euclidiana para la medida de similitud o disimilitud, para variables binarias) y el método de dos pasos (*2-step method*), y se comparó la convergencia entre ambos métodos (ver ilustración 1). El análisis es crucial para generar hipótesis sobre comorbilidades que no pueden ser distribuidas al azar en los pacientes con AE, pero pueden mostrar asociaciones con otras comorbilidades, motivo por el cual, se realizaron pruebas de asociación entre los pacientes que presentan AE con las diferentes comorbilidades mediante el test de χ^2, con valores de $p<0.05$ considerados como significativos. La supervivencia a la edad adulta se calculó usando el análisis de Kaplan-Meier, y las diferencias entre los subgrupos se estimaron

usando el método *log-rank* (Mantel-Cox). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SPSS versión 23 (IBM Corp., Armonk, NY) para Macintosh.

Selección de pacientes con patología sindrómica o antecedente familiar

Después de analizar los casos sindrómicos y/o familiares de AE de forma individual, se determinó la realización de pruebas citogenéticas aCGH o de WES acorde a cada caso índice. De los casos encontrados, a continuación, se describen los más relevantes.

El caso No. 1, es una persona del género femenino de 40 años de edad, nacida en San Cayetano (Cundinamarca, Colombia), con diagnóstico de AE del tipo B, CIA tipo *ostium secundum*, CIV muscular, hipertensión pulmonar, retorno venoso pulmonar anómalo, fibrilación auricular y BRD, con antecedente importante de 2 pérdidas reproductivas, una de ellas con diagnóstico prenatal de cardiopatía congénita. Se identificó un apellido en común entre los padres de la paciente, aunque afirmaron no ser consanguíneos. (Ver gráfica suplementaria 1)

El caso No 7, es una persona del género masculino de 21 años de edad, también de San Cayetano (Cundinamarca, Colombia), con AE del tipo D, dilatación aneurismática de la aurícula y del VD, con síndrome WPW, hipertensión pulmonar, con antecedente de trasplante cardiaco. (Ver gráfica suplementaria 2)

Debido al origen común de los pacientes de las familias 1 y 7, y al antecedente del apellido en común, se decidió realizar WES a ambos individuos afectados, con un análisis individual y la posterior comparación de las mutaciones encontradas en ambos pacientes, con el fin de determinar variantes en común.

El caso No. 2, es una persona del género femenino de 26 años de edad, con AE del tipo A, síndrome WPW, TSV, déficit cognitivo, resistencia a la insulina, luxación de cadera congénita y obesidad. Tiene antecedente familiar de un hermano de 17 años con síndrome WPW y luxación congénita de cadera (ver gráfica suplementaria 3). Dados hallazgos encontrados en la paciente, con anomalías fenotípicas al exámen físico (microcefalia, hipertelorismo, braquicefalia, déficit cognitivo e hipotonía), se solicitó aCGH para identificar microdeleciones o microduplicaciones cromosómicas y confirmar una causa genómica.

El caso No 3, es una persona del género masculino de 21 años de edad, con AE del tipo C, BRD, CIA tipo *ostium secundum*, síndrome WPW, TSV, quien requirió ablación quirúrgica a los 12 años. Se identificó a un hermano de 10 años con AE (ver gráfica suplementaria 4). Debido a la presencia de AE en el caso índice y en el hermano, se contempló la hipótesis de un modelo de herencia autosómica recesiva, motivo por el cual se realizó WES en ambos hermanos afectados.

El caso No. 8, es un niño de 4 años de edad, con AE del tipo D, CIV perimembranosa, estenosis en el origen de la rama pulmonar izquierda, TSV, y múltiples signos y síntomas como fotofobia, queratocono en ojo izquierdo, reflujo gastroesofágico, trastorno de deglución, criptorquidea unilateral, hipotonía, convulsiones asociadas a picos febriles y déficit cognitivo. Se observaron además otras anomalías fenotípicas al exámen físico como trigonocefalia, cabello escaso y seco, orejas con implantación baja con plegamiento de hélix izquierdo, arco superciliar marcado , cejas espaciadas medialmente escasas de predominio lateral, *ptosis* palpebral de predominio izquierdo, telecanto, sin fijación de la mirada, asimetría de fisuras palpebrales de predominio izquierdo, raíz nasal alta, narinas hipoplásicas y antevertidas, comisuras labiales orientadas hacia abajo, retrognatia, paladar ojival, cuello corto, tórax corto y ancho, *pectum excavatum*, diástasis de músculos rectos abdominales, pulgares ensanchados con falanges distales anchas, palmas anchas, acortamiento de 4º dedo bilateral en pies, presencia de foseta sacra, con múltiples líneas hipocrómicas en espalda poco confluentes y línea longitudinal torácica medial similar a línea alba (ver gráfica suplementaria 5). Por todos estos hallazgos se solicitó un análisis de aCGH para descartar síndrome de microdeleción/microduplicación asociado.

El caso 10, es un paciente del género masculino de 3 años de edad con AE del tipo C, *foramen ovale* permeable, hipoplasia del anillo troncoso y ramas pulmonares, bloqueo auriculo-ventricular y BRD. La familia, que es natural de Barranquilla (Atlántico, Colombia) y con antecedente de consanguinidad en los tatarabuelos maternos, refirió el antecedente de hermana con *foramen ovale* permeable, y una prima en tercer grado, hija a su vez de padres consanguíneos, quien presentó AE y falleció en la infancia (ver gráfica suplementaria 6). En

este caso, ante los hallazgos clínicos y los antecedentes familiares, se decidió realizar WES al caso índice, a la madre, y al tío en tercer grado (padre de prima fallecida), con el fin de determinar variantes en común.

El caso 11, es una persona del género masculino, de 26 años de edad, natural de Huila, Colombia, con AE del tipo B, quien tiene historia familiar de patología cardiaca. Una prima materna en segundo grado, de 25 años de edad, con estenosis de válvula pulmonar y CIA; además, un primo materno, en segundo grado de consanguinidad, de 5 años de edad, se presentó con estenosis de la válvula pulmonar y enfermedad de la válvula mitral; un primo materno en tercer grado de consanguinidad de 15 años de edad presentó estenosis de la válvula pulmonar y una prima materna, en tercer grado de consanguinidad, se presentó con diagnóstico de heterotaxia y falleció a la semana de vida (ver gráfica suplementaria 7). Debido a la recurrencia intrafamiliar de CC y el lugar de origen en común de todos los afectados, se decidió realizar WES en el paciente y en los familiares afectados disponibles

El caso 12 es un paciente del género masculino, de 18 años de edad, hijo de padres consanguíneos, (primos hermanos), con hipercolesterolemia familiar homocigota y AE del tipo C. Una hermana de 17 años de edad también presenta hipercolesterolemia familiar homocigota (ver gráfica suplementaria 8). Se realizó WES en ambos hermanos con el fin de determinar las variantes genómicas asociadas a AE.

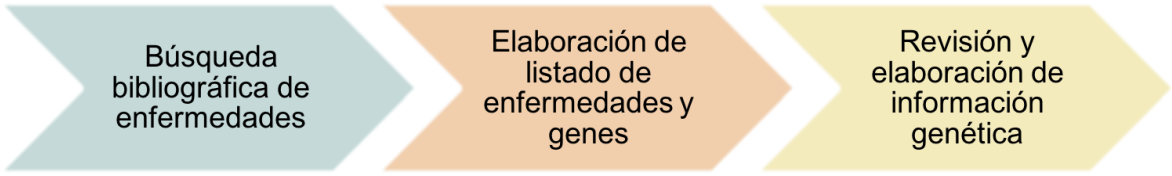
Los casos no mencionados, son pacientes con diagnóstico de AE, sin antecedentes familiares relevantes, en quienes no se identificaron otros hallazgos significativos

Construcción de un panel de genes candidatos

Diseño y búsqueda de bibliografía

La aplicación de paneles de secuenciación para el diagnóstico genético de enfermedades cardiovasculares, requiere de un proceso de selección y estudio de los genes asociados a la patología cardíaca heterogénea teniendo en cuenta los múltiples factores involucrados.

El método utilizado incluye una búsqueda bibliográfica exhaustiva de enfermedades genéticas cardiovasculares, genes descritos asociados a patología cardiaca, genes involucrados en el desarrollo embrionario cardiaco, vías de señalización e interacciones intergénicas, genes candidatos encontrados en estudios en animales, en estudios de asociación, y en estudios funcionales, con posterior revisión de datos genéticos de cada uno de los ítems encontrados (ver gráfica 2).



Gráfica 2. Diseño de enfermedades cardiacas congénitas y genes asociados

Las bases de datos empleadas para la búsqueda de la información de las enfermedades cardiovasculares, fueron: On Mendelian Inheritance in Man: (OMIM) la cual es una base de datos utilizada para obtener la información de enfermedades y genes asociados; GeneReviews, la cual caracteriza las enfermedades, establece el diagnóstico diferencial y los genes asociados y PubMed, que es una base de datos de bibliografía actualizada sobre información biomédica.

Por otra parte, las bases de datos empleadas para la búsqueda de la información genética de los genes fueron las siguientes: National Center for Biotechnology Information: Gene: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/; HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC): http://www.genenames.org/; código de identificación Ensembl: http://www.ensembl.org/index.html; genecards: http://www.genecards.org/; Uniprot: http://www.uniprot.org/ y Reactome: https://reactome.org/what-is-reactome.

Clasificación de los genes

Los genes candidatos identificados en la búsqueda bibliográfica, fueron corroborados según publicaciones realizadas en estudios de citogenética, estudios de secuenciación, investigación en animales, asociación, y estudios funcionales. Posteriormente, los genes fueron clasificados de acuerdo con los cuadros clínicos asociados más relevantes, los cuales

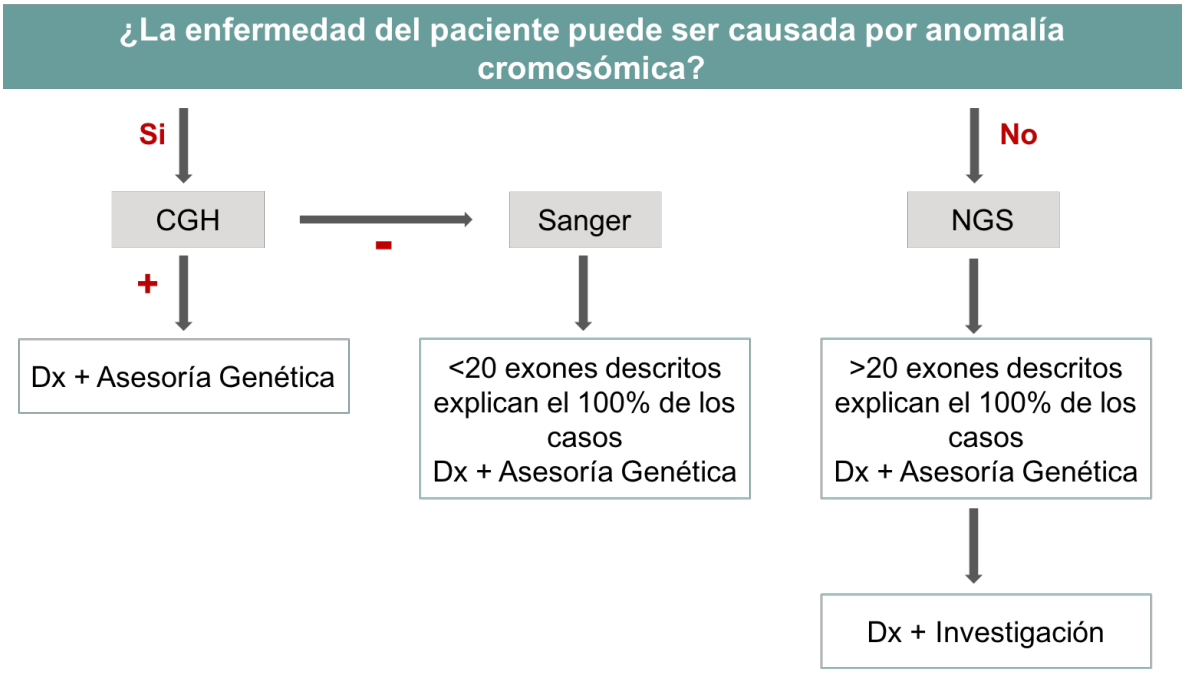
incluían miocardiopatía hipertrófica, dilatada, arritmogénica, no compactada, restrictiva y rasopatías; genes de canalopatías que incluían síndrome QT largo, síndrome QT corto, catecolaminérgica, síndrome Brugada, sistema de conducción, y fibrilación auricular; a enfermedad aórtica incluyendo alteraciones del tejido conectivo como los síndromes de Marfan, Loeys-Dietz, Ehlers Danlos, Shprintzen-Goldberg o de disección aórtica familiar o aneurismas torácicos; hipercolesterolemia familiar; genes del desarrollo y de cardiopatías congénitas. Una vez completada la información y la clasificación respectiva de los genes identificados, se eliminaron los genes duplicados o aquellos que pertenecían a más de una categoría.

Identificación de variantes genéticas

Método diagnóstico

Luego de examinar los registros de los pacientes con diagnóstico de AE que asistieron a la FCI-IC entre 1997 y 2016, las personas fueron evaluados por el servicio de genética médica de la FCI-IC y de la Universidad del Rosario, a quienes se les presentaron y explicaron previamente consentimientos informados para el paciente, los padres o tutores legales y asentimiento informado, cuando este aplicaba, con el objeto de determinar si el paciente cumplía con los criterios para presentar la cardiopatía descrita, si dicha patología era aislada o sindrómica y si era elegible para realizar análisis genómicos. Se diligenció un formato de recolección de datos, y se tomó una muestra de sangre periférica para la extracción de ADN.

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a un algoritmo orientado según la hipótesis de la causa genética (ver gráfica 3). La selección de los métodos de análisis se realizó de acuerdo a la asociación de diferentes tipos de variantes con diversas patologías reportadas en la literatura y de acuerdo a la experiencia del grupo de genetistas de la FCI-IC y de la Universidad del Rosario.



Gráfica 3. Algoritmo de hipótesis de etiología genética

Hibridación genómica comparada

Para identificar anomalías cromosómicas potenciales en los pacientes con AE se realizó un análisis de aCGH con el fin de identificar presuntas microinserciones/microdeleciones en estado homocigoto o heterocigoto en una región del genoma que incluyera genes que pudieran asociarse con la entidad. Se realizó un análisis de micromatrices citogenéticas utilizando el conjunto Affymetrix Cytoscan 750K Human Genome CNV + SNP con 550,000 sondas no polimórficas CNVs y 200,000 sondas SNPs con referencia a la versión de genoma GRCh37 (hg19).

Secuenciación exómica

En casos en donde no se encontró alteración cromosómica, o donde se consideró un posible modelo de herencia mendeliana, se realizó una WES utilizando filtros bioinformáticos (cobertura/profundidad mínima de 90%/50X promedio respectivamente), con el fin de determinar la presencia de uno o varios SNPs en estado homocigoto o heterocigoto, que pudieran explicar la patología según el modo de herencia y la función del gen en donde se

ubican. Todas las variantes a consideración debían alterar la secuencia de la proteína, tener una probabilidad significativa de alterar su función de acuerdo a predictores bioinformáticos y ser novedosas o estar reportadas en la literatura con una frecuencia alélica mínima (MAF) menor a 0.005, excepto en casos en que la variante se encuentre en un número mayor de pacientes del esperado ($p<0.05$) o la variante haya sido asociada a un gen que previamente se le haya identificado responsable de CC huérfanas. Adicionalmente, las variantes a consideración debían ser consistentes con el patrón de herencia de las hipótesis de trabajo.

Filtrado de secuencias

Al realizar el filtrado de las variantes, es importante tener en cuenta que al comparar los datos del exoma de cada individuo con el genoma de referencia, es posible encontrar múltiples variaciones, las cuales pueden ser habituales en la población y no tener un significado patológico, o, por el contrario, ser infrecuentes y con un significado clínico incierto.
Para realizar el filtrado el archivo fue leído en el formato Excel, el cual para cada variante encontrada incluía los siguientes datos: el gen, la función (en regiones exónicas o en sitios de *splicing*), el tipo de mutación, el cambio de aminoácido, la frecuencia en la que el alelo aparece en la base de datos de los 1.000 genomas, la referencia dbSNP y las puntuaciones de predictores bioinformáticos específicos como SIFT (http://sift.jcvi.org) y Polyphen (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/).

Con el fin de establecer las variantes responsables del fenotipo de la AE, se utilizaron diferentes filtros (ver gráfica 4).

- Por variantes raras: Muchas de las CC son poco frecuentes, por lo que se espera que las mutaciones que las causan sean igualmente infrecuentes en la población. Para este filtro, se seleccionaron variantes que tuvieran un MAF menor de 0.05 o 0.005% dependiendo de cada caso.

- Por función: Las mutaciones en regiones codificantes o en sitios de splicing tienen más probabilidades de ser patogénicas que las situadas en zonas no codificantes. Sin

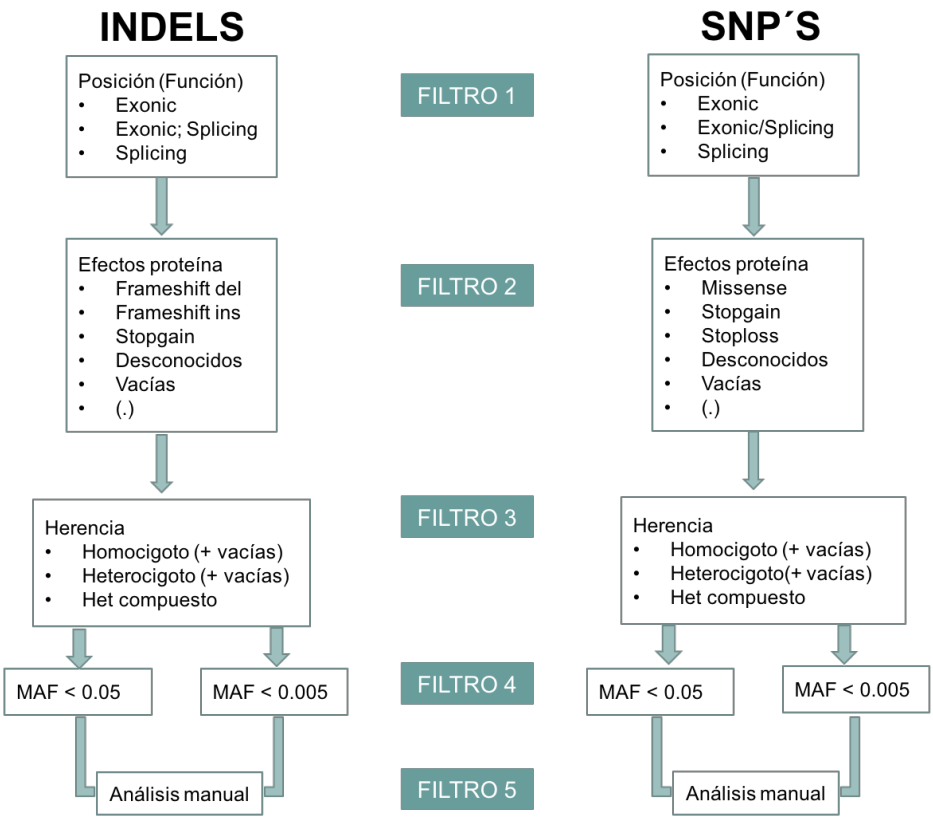
embargo, mutaciones en áreas intrónicas reguladoras pueden determinar patologías. Las incluidas en este análisis, fueron las mutaciones presentes en regiones exónicas o en regiones de *splicing*.

- Según el tipo de mutación: Las mutaciones sinónimas son menos frecuentemente patogénicas que aquellas que modifican la estructura de la proteína (*missense*, *nonsense*, inserciones/delecciones). En este filtro, se tuvieron en cuenta las variantes con mutaciones *missense, nonsense, frameshift* y aquellas que afectan sitios de *splicing*.

- Por herencia: Filtrado por mutaciones en homocigosis o heterocigoto compuesto, en el caso de enfermedades de herencia recesiva. En el caso de hermanos afectados se buscó presencia de variantes sólo en regiones del genoma compartidas. En caso de enfermedades de herencia dominante, se realizó el filtrado por mutaciones en estado heterocigoto.

- Según la predicción: Los predictores bioinformáticos empleados fueron SIFT, Polyphen o Mutation-Taster los cuales fueron utilizados con precaución y en conjunto con los otros datos, y nunca como un factor exclusivo

- Filtro manual: Se realizó un análisis manual para descartar genes no relacionados con la patología cardiaca de base.



Gráfica 4. Filtrado de variantes

Aplicación de genes candidatos del panel multigénico

Los genes pertenecientes al panel multigénico fueron analizados de forma paralela a los filtros seleccionados para el análisis del WES, con el fin de comparar los genes resultantes al filtrado de variantes y los resultantes según el panel y, de esta forma, determinar la aplicación e importancia del mismo. (ver tabla suplementaria 1)

Análisis en familiares

Una vez identificada(s) la(s) variante(s) putativamente responsables del fenotipo, se determinó la presencia o ausencia en los padres del paciente (con previo consentimiento informado), para determinar el origen (paterno, materno y/o *de novo*) y si este era consistente con la historia familiar. Esta información fue utilizada para modelar la penetrancia de las variantes observadas y para ofrecer asesoría genética a la familia del paciente

RESULTADOS

Características de los pacientes

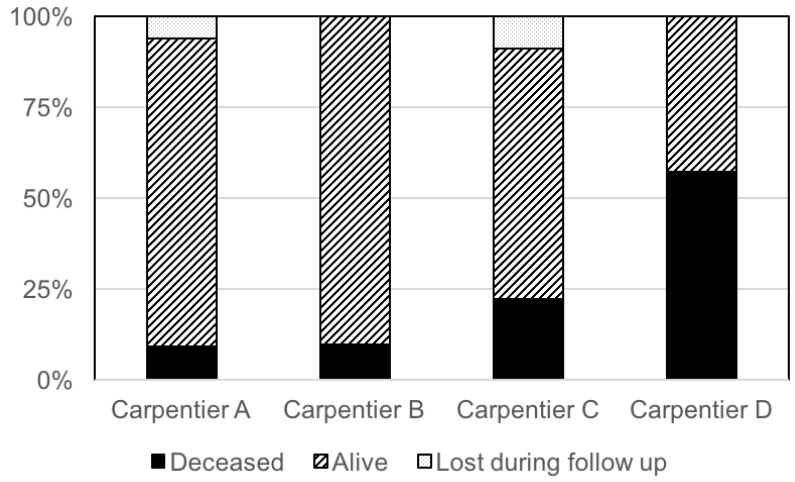
La población de estudio mostró una distribución igual en los dos sexos. La mayoría de los pacientes fueron valorados por primera vez en la FCI-IC antes de los 18 años de edad (ver tabla 2), siendo los principales motivos de consulta en la primera valoración la presencia de disnea en un 35% y de palpitaciones en un 25%. Los signos clínicos más frecuentes fueron la presencia de soplo sistólico en un 86% junto con la presencia de cianosis en un 35%.

De acuerdo con la clasificación de Carpentier, la gravedad de la AE en los pacientes se distribuyó de manera uniforme en todo el espectro de la enfermedad (ver tabla 2). Las personas afectadas con clasificación de Carpentier tipo D tuvieron una mayor mortalidad al igual que los pacientes con obstrucción del TSVD (ver gráficas 5 y 6). Además, la gran mayoría de los pacientes (n=137, 93%) presentaba una comorbilidad CV congénita, de los cuales el 31 % eran anormalidades estructurales, el 22% presencia de una única arritmia y el 40% la coexistencia tanto de anormalidad estructural como de arritmia cardiaca. Así mismo, un número significativo de los pacientes (n=39, 27%) presentó comorbilidades extracardiacas (ver tabla 3) (33).

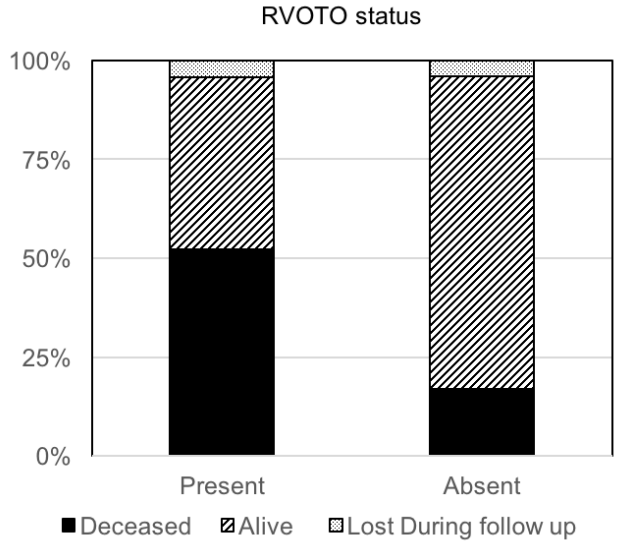
De acuerdo con el estado clínico de los afectados, la mayoría de los pacientes con insuficiencia cardiaca fueron tratados con diuréticos de asa de Henle como furosemida y antagonistas de la aldosterona como la espironolactona. Un número significativo (76%) también requirió procedimientos intervencionistas o quirúrgicos (ver tabla 4), siendo la ablación, el procedimiento quirúrgico más común, seguido de la reparación valvular tricuspídea.

Characteristic	Frequency, n	%
Female sex	69	46.9
Age at first consult at institution, y		
Early childhood, 0–5	63	42.9
Childhood, 6–11	27	18.4
Adolescence, 12–17	30	20.4
Young adult, 18–26	9	6.1
Adulthood, 27–59	17	11.6
Old age, ≥60	1	0.7
Severity of disease (per Carpentier)		
Type A	33	22.4
Type B	41	27.9
Type C	45	30.6
Type D	28	19.0
Familial cases	7	4.8
Comorbidities		
ASD	89	60.5
Ostium secundum	62	42.2
PFO	22	15.0
Ostium primum	5	3.4
WPW	39	26.5
Complete RBBB	26	17.7
RVOT obstruction	23	15.6
Pulmonary stenosis	11	7.5
Pulmonary atresia with VSD	6	4.1
Pulmonary atresia without VSD	5	3.4
Tetralogy of Fallot	1	0.7
SVT	21	14.3
Incomplete RBBB	21	14.3
PDA	19	12.9
Syndromic	14	9.5
Cognitive or developmental delay	3	2.0
Down syndrome	5	3.4
Kleefstra syndrome	1	0.7
1p36 deletion syndrome	1	0.7
Turner syndrome	1	0.7
VACTERL association	1	0.7
Congenital rubella syndrome	1	0.7
Scimitar syndrome suspicion	1	0.7

Tabla 2. Características de los pacientes



Gráfica 5. Mortalidad por clasificación de Carpentier



Gráfica 6. Mortalidad por obstrucción de TSVD

Diagnosis	Frequency (no.)	Percentage (%)
Atrial septal defect (ASD), *ostium secundum*	62	42,2
Wolff Parkinson White syndrome (WPW)	39	26,5
Complete right bundle branch block (CRBBB)	26	17,7
Supraventricular tachycardia	22	15,0
ASD, *Patent foramen ovale*	22	15,0
Incomplete right bundle branch block (IRBBB)	21	14,3
Patent ductus arteriosus	19	12,9
Pulmonary hypertension	19	12,9
Heart failure	15	10,2
Pulmonary stenosis	11	7,5
Grade I, atrioventricular block	10	6,8
Ventricular extra systole	10	6,8
Hypotonia	9	6,1
Post-surgical arrhythmia	9	6,1
Atrial fibrillation	8	5,4
Ventricular septal defect (VSD), muscular	7	4,8
Flutter	7	4,8
WPW relapse	7	4,8
Supraventricular extra systole	7	4,8
Pulmonary insufficiency	6	4,1
Pulmonary atresia with VSD	6	4,1
Hypothyroidism	6	4,1
ASD, *ostium primum*	5	3,4
Pacemaker user	5	3,4
Heart transplantation candidate	5	3,4
Pulmonary atresia without VSD	5	3,4
Down syndrome	5	3,4
Mitral valve prolapse	4	2,7
VSD, peri-membranous	4	2,7
Left persistent vena cava	4	2,7
Bicuspid aortic valve	4	2,7
Hypoplastic pulmonary branch arteries	4	2,7
Stroke	4	2,7
Perinatal asphyxia	4	2,7
Cognitive or developmental delay	3	2,0

Pericardial effusion	3	2,0
Coarctation of the aorta	3	2,0
Cardiac arrest	3	2,0
Electrolytic imbalance	3	2,0
Prolonged QT interval	3	2,0
Gastroesophageal reflux	3	2,0
Swallowing disorder	3	2,0
Left anterior fascicular block	3	2,0
Pulmonary valve dysplasia	3	2,0
Postnatal hypoglycemia	2	1,4
Left pulmonary branch stenosis	2	1,4
Partial anomalous pulmonary venous return	2	1,4
Atrioventricular block grade ii, Mobitz 1	2	1,4
Renal failure	2	1,4
Ventilatory failure	2	1,4
Right aortic arch	2	1,4
Sacral dimple	2	1,4
Asthma	2	1,4
Tuberculosis	2	1,4
Coronary heart disease	2	1,4
Cryptorchidism	2	1,4
Pulmonary insufficiency after surgery	2	1,4
Interauricular septum aneurysm	1	0,7
Neonatal jaundice	1	0,7
1p36 syndrome	1	0,7
Postcapilary, isolated, pulmonary hypertension	1	0,7
Aortic insufficiency	1	0,7
VSD, infundibular	1	0,7
VSD, outflow tract	1	0,7
Atrioventricular block, grade III	1	0,7
Aberrant right subclavian artery	1	0,7
Non-compaction cardiomyopathy	1	0,7
Endocardial fibroelastosis	1	0,7
Cor triatriatum	1	0,7
Nodal tachycardia	1	0,7
Absent pulmonary valve syndrome	1	0,7
Uhl's anomaly	1	0,7

Tetralogy of Fallot	1	0,7
Vasovagal syncope	1	0,7
Scimitar syndrome	1	0,7
Native tricuspid valve endocarditis	1	0,7
Syncope	1	0,7
Hydronephrosis	1	0,7
Recurrent urinary tract infection	1	0,7
Arterial hypertension	1	0,7
Unilateral hearing loss	1	0,7
Unilateral cataract	1	0,7
Femoral shortening	1	0,7
Thrombocytopenia	1	0,7
Obesity	1	0,7
Kleefstra syndrome	1	0,7
Familial hypercholesterolemia	1	0,7
Anxiety	1	0,7
Attention deficit hyperactivity disorder	1	0,7
Epilepsy	1	0,7
Turner syndrome	1	0,7
Charge syndrome	1	0,7
Allergic rhinitis	1	0,7
VACTERL association	1	0,7
Hepatic mass	1	0,7
Pulmonary insufficiency	1	0,7
Qhylotorax	1	0,7
Congenital rubella syndrome	1	0,7
Hearing loss	1	0,7
Congenital cataract	1	0,7
Microphtalmia	1	0,7
Necrotizing enterocolitis	1	0,7
Left posterior fascicular block	1	0,7

Tabla 3. Comorbilidades de los pacientes

Surgical Procedure	Frequency, n	Median Age at Operation, y
Ablation	29	14.2
Tricuspid valve repair	23	19.8
Cone technique	10	13.2
Tricuspid valve replacement	5	33.7
ASD closure	14	11.6
Cavopulmonary shunts (Glenn-Fontan)	13	14.7
Catheterization procedures	7	12.3
Pulmonary valve procedures	6	4.3
Pacemaker implantation	5	14.6
Systemic-pulmonary fistulae	4	0.3
Cardiac transplantation	2	24
Maze procedure	2	28.8
Procedures on PA and branches	2	0.1

Tabla 4. Procedimientos quirúrgicos

Análisis estadístico

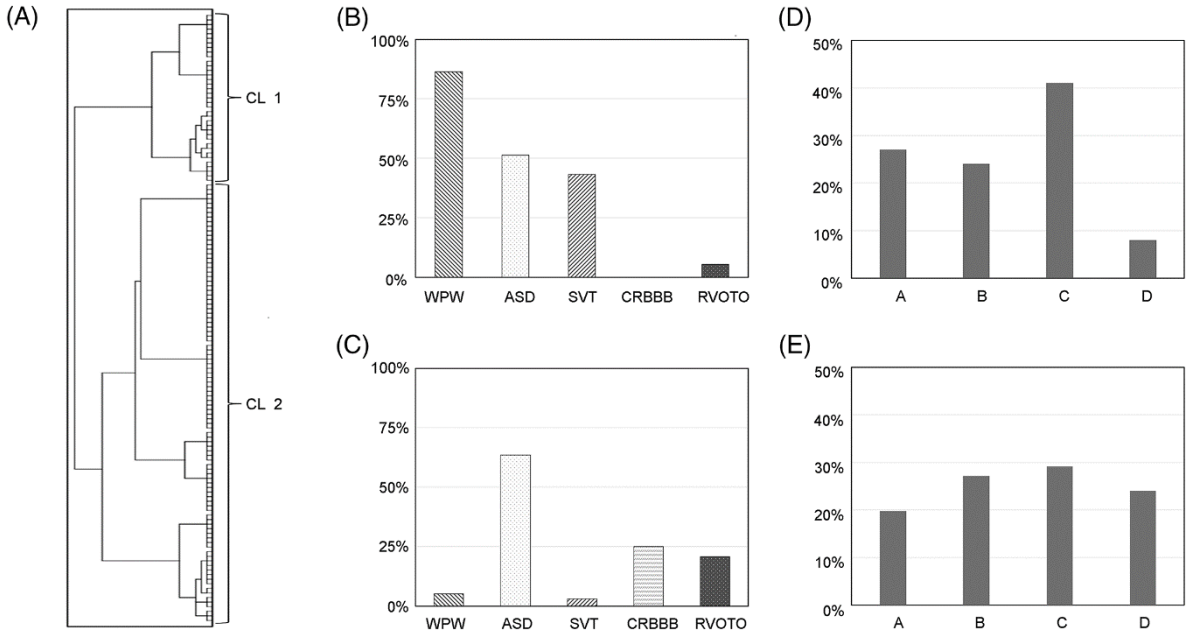
Análisis de cluster

Al realizar el análisis de clúster jerárquico no supervisado (Ward) se obtuvieron dos grupos de personas bien definidos (ver gráfica 7A), los cuales presentaron un 81% de concordancia con los dos grupos clasificados por el método 2-step.

El análisis de los dos agrupamientos reveló que los defectos del septo atrial están distribuidos casi por igual en ambos grupos, con una proporción similar a la observada en el grupo en general. El BRD solo se puede encontrar en el grupo 2; sin embargo, no se encontró una relación estadísticamente significativa al comparar el BRD con otras variables. Los pacientes con síndrome WPW y TSV se encontraron casi exclusivamente en el grupo 1 (ver gráfica 7B). El grupo 2 fue significativamente más diverso, encontrando pacientes con obstrucción del TSVD, CIA y/o BRD completo (ver gráfica 7C) (33).

El síndrome WPW y TSV tenían más probabilidades de estar presentes en la misma persona (P=0,00025). Por el contrario, los pacientes con obstrucción del TSVD fueron menos propensos a presentar síndrome WPW (P=0.032) o síndrome WPW con TSV (P=0.034). Un análisis de las personas encontradas en cada grupo, reveló que los pacientes en el grupo 2 tenían un espectro más severo de la enfermedad, representados con puntuaciones de

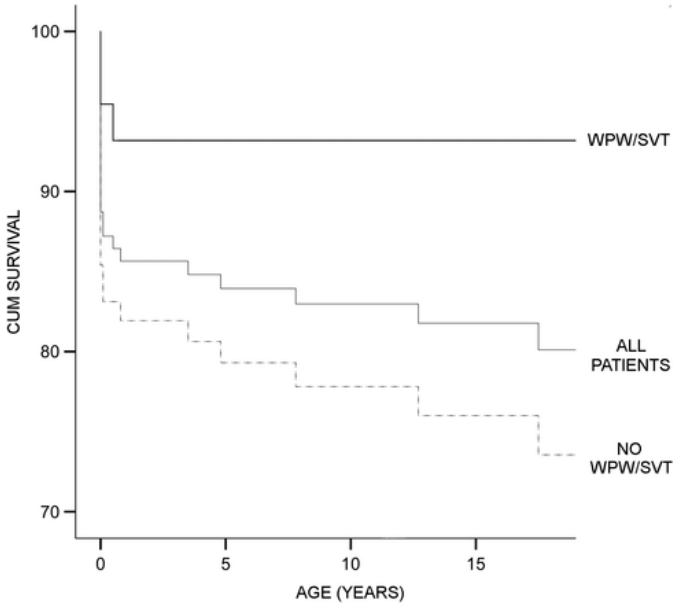
Carpentier tipo D (ver gráfica 7E), mientras que en el grupo 1 había una proporción reducida de pacientes con puntuaciones de Carpentier D (ver gráfica 7D). Una explicación por la cual, el grupo 1 contiene la mayoría de los pacientes con síndrome WPW/TSV y el grupo 2 abarca la mayoría de los pacientes con obstrucción del TSVD, es que las personas con obstrucción del TSVD representan un alto porcentaje de pacientes con puntaje D de la clasificación de Carpentier y pueden explicar las diferencias observadas en la severidad de la enfermedad en estos dos grupos.



Gráfica 7. Clasificación de pacientes por análisis de Cluster

Análisis de supervivencia

Durante un seguimiento promedio de 5.5 años (rango 0-19 años), 29 (21%) pacientes murieron. Principalmente, los pacientes murieron durante la infancia temprana (n=21; 73%), un número menor durante la edad adulta (n = 5; 17%), dos personas en la adolescencia (7%) y una persona en la niñez (3%). La supervivencia general hasta la edad adulta fue del 78% (ver gráfica 8). Sin embargo, los pacientes con síndrome WPW o TSV tuvieron una supervivencia significativamente mayor en comparación con los pacientes sin síndrome WPW y TSV (P=0.03) (33).



Gráfica 8. Supervivencia del adulto

Análisis de variantes genómicas

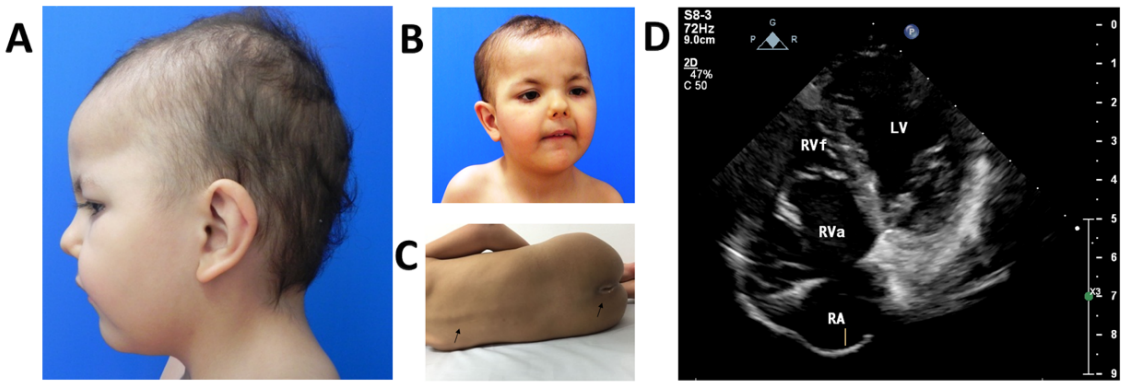
Resultados de la hibridación genómica comparada

En el paciente No. 2, se encontró una deleción de 298 Kb en el cromosoma 9, en la citobanda q34.3, la cual incluye los genes *EHMT*, *MIR602* y *CACNA1B*, hallazgo compatible con un síndrome de deleción del cromosoma 9q34.3 llamado el síndrome de Kleefstra (ver tabla 5). Las características comunes en pacientes con síndrome de Kleefstra son: déficit cognitivo severo, hipotonía infantil, convulsiones febriles o epilepsia y rasgos faciales distintivos como hipertelorismo, sinofris, narinas antevertidas, labio inferior evertido y macroglosia (34). Además, pueden existir otros defectos congénitos que incluyen defectos cardiacos, defectos renales y/o urológicos, defectos genitales, infecciones respiratorias y comportamientos autistas en la infancia. El 50% de las personas con este padecimiento presenta malformaciones cardiacas conotruncales, de las cuales se han reportado CIA, CIV, tetralogía de Fallot, coartación aórtica, válvula aórtica bicúspide y estenosis pulmonar (35). En el caso del paciente incluido en este estudio, se encontraron los siguientes hallazgos positivos para el síndrome de Kleefstra: obesidad, microcefalia, hipertelorismo, braquidactilia, hipotonía, deficit cognitivo severo, trastorno del sueño dado por insomnio, comportamiento agresivo e infecciones respiratorias a repetición.

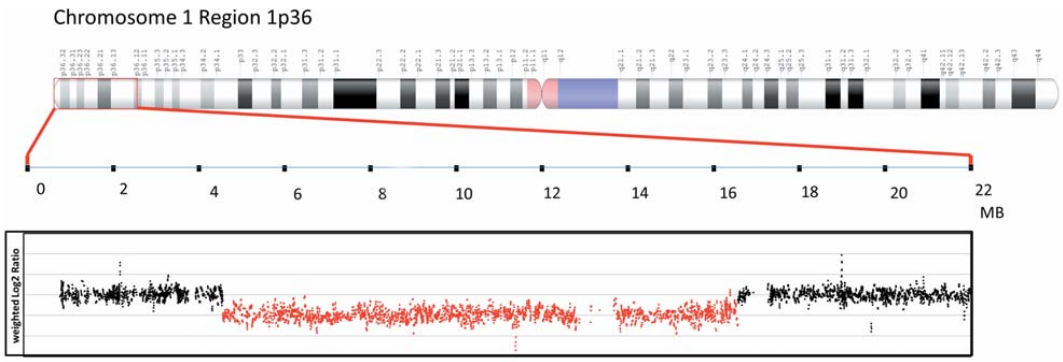
VARIACIÓN NÚMERO COPIAS (CNVs)						
Variación	**Cromosoma**	**Tamaño (kbp)**	**Inicio citobanda**	**Fin citobanda**	**Genes**	**OMIM**
Pérdida	9	298	q34.3	q.34.3	*EHMT1 MIR602 CACNA1B*	607001 Kleefstra_syndrome (610253): NM_024757 (*EHMT1*)

Tabla 5. Resultado aCGH del paciente del caso No.2

En el paciente No. 8 (ver gráfica 9), se identificó una deleción de 11.95 Mb en el cromosoma 1, con puntos de corte en las posiciones 4.629.407 y 16.586.999, que afecta a las bandas 1p36.32-1p36.13 e incluye 221 genes (ver gráfica 10). Se identificaron dos microduplicaciones adicionales, pero no se consideró que fueran clínicamente relevantes: la primera de 104 kbp en el cromosoma 17q21.31 en las coordenadas chr17: 44188450-44292742, involucrando los genes *KIAA1267* y *LOC644246* y la segunda de 181 kbp en el cromosoma 6p21.2 en coordenadas chr6: 36795665-36976418, que implicó a los genes *CPNE5, PPIL1, C6orf89, PI16, MTCH1 FGD2*; además de una microdeleción de 163 kbp en el cromosoma 8p11.22 entre las coordenadas chr8: 39226335 y 39388919, que implicó la pérdida de los genes *ADAM5P* y *ADAM3A* (36).

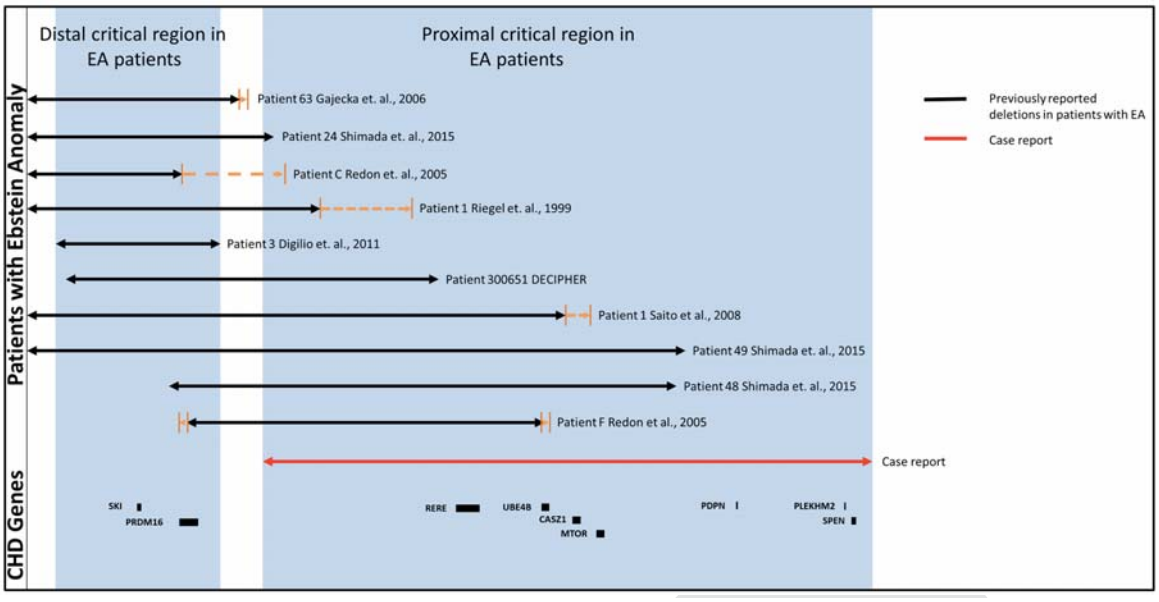


Gráfica 9. Fenotipo del paciente del caso No. 8



Gráfica 10. Deleción 1p36

Se realizó una búsqueda en Medline (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) sobre los en estándares Internacionales para el Consorcio de Matrices Citogenómicas (ISCA, obtenido de https://decipher.sanger.ac.uk) y en la Base de Datos de Desequilibrio cromosómico y fenotipo en humanos que utilizan recursos de conjunto (DECIPHER) (https://decipher.sanger.ac.uk) (37) para ensamblar una base de datos de deleciones (que van de 1 a 22,000,000 bp) y de fenotipos de personas con AE con deleciones 1p36 reportadas desde 1999 a 2017 para identificar regiones superpuestas asociadas con AE (ver gráfica 11). Se excluyeron los reportes que no especificaban las coordenadas de la deleción, los datos de baja resolución y los reportes de bases de datos no públicas que no se pudieron verificar



Gráfica 11. Puntos de corte cromosómico

Resultados de secuenciación exómica

En los casos familiares descritos anteriormente, se realizó WES en los pacientes No. 1, 3, 7, 10, 11 y 12 y en algunos de los familiares afectados.

En el caso No 1. Se encontraron variantes significativas en 158 genes en estado heterocigoto compuesto y en 133 genes en estado homocigoto. En el caso No 7. Se encontraron variantes en 173 genes en estado heterocigoto compuesto y en 162 genes en estado homocigoto. Ambos casos, fueron considerados bajo la hipótesis de herencia AR, encontrando variantes en común en 49 genes en heterocigoto compuesto y en 44 genes en homocigoto, entre estos dos casos (ver suplementaria 1).

El caso No 3. Se relacionó con dos hermanos afectados con AE, motivo por el cual se realizó WES en ambos individuos. Se encontraron variantes en 107 genes en estado heterocigoto compuesto y en 73 genes en estado homocigoto compartidas entre hermanos. Adicionalmente, se le realizó WES al padre, y los genes compartidos entre los dos hermanos fueron analizados en comparación con los genes encontrados en estado heterocigoto en el padre, lo que permitió la identificación de variantes en nueve genes en estado heterocigoto compuesto y en seis genes en estado homocigoto de las variantes compartidas entre los hermanos (ver suplementaria 2).

Para el caso No 10, se realizó WES al paciente, a la madre y a un tío en tercer grado de consanguinidad, por antecedente de cardiopatía y consanguinidad, encontrando 38 genes con variantes compartidos en estado heterocigoto entre los tres individuos mencionados para una hipótesis de una herencia AD (ver suplementaria 3).

En el caso 11, se evidenció antecedente familiar de cardiopatía, todos procedentes de Huila, motivo por el cual se realizó WES al paciente y en los familiares afectados. En los cinco individuos analizados, se encontraron variantes en seis genes en estado heterocigoto, correspondiente a una herencia AD (ver suplementaria 4)

En el caso 12, se realizó WES al individuo afectado con AE e hipercolesterolemia familiar homocigota y a la hermana con el mismo diagnóstico de hipercolesterolemia familiar homocigota, identificando variantes compartidas en 546 genes en estado heterocigoto para una herencia AD, y variantes en 89 genes en estado homocigoto y en 110 en estado heterocigoto compuesto para una hipótesis de herencia AR (ver suplementaria 5).

Después de obtener las variantes en cada uno de los casos descritos previamente, se hizo un filtro manual de los genes compartidos entre todos los casos según las hipótesis de herencia autosómica recesiva y de herencia autosómica dominante. Posteriormente, se determinó si alguno de los genes resultantes del análisis previo estaba presente en el panel diseñado, con el fin de encontrar posibles genes candidatos causantes de la AE, y determinar si alguno se encontraba en otros casos descritos.

Entre los genes encontrados, los más relevantes y que estaban asociadas a defectos cardiacos fueron los genes *TTN* y *LDB3*, los cuales corresponden a Titina y al dominio de unión LIM3 respectivamente. Titina, es una proteína muscular expresada en los músculos cardíacos y esqueléticos que abarca la mitad del sarcómero de la línea Z a la línea M y desempeña un papel clave en el ensamblaje muscular. Se ha asociado con cardiomiopatía dilatada y con cardiomiopatía hipertrófica. Por otra parte, el gen *LDB3* codifica un factor de unión al dominio PDZ-LIM que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural del disco Z del músculo estriado en múltiples especies. Se ha asociado con cardiomiopatía dilatada con o sin LVNC, cardiomiopatía hipertrófica, y LVNC.

DISCUSIÓN

Acorde a los resultados obtenidos en este estudio, se pudo confirmar la heterogeneidad clínica y genética de la AE, la cual está asociada con frecuencia, a comorbilidades cardiacas y extracardiacas.

Primeramente, en el análisis de cluster reportado en el artículo "Identification of clinically relevant phenotypes in patients with Ebstein anomaly" (33), se obtuvo una mayor proporción de personas con síndrome WPW y/o TSV en comparación con estudios previos, las cuales representaron un subgrupo homogéneo con un espectro de la enfermedad menos severa y un con mejor curso clínico. Por otra parte, la proporción de personas con AE y comorbilidades asociadas, fueron similares a las proporciones reportadas previamente, lo cual sugiere que la presencia de comorbilidades asociadas, son en su mayoría independientes de la población.

La mayor frecuencia de pacientes con síndrome WPW en este estudio, puede reflejar modificadores genéticos significativos en la población colombiana que aumentan el riesgo de una presentación que incluye síndrome WPW o a sesgos de selección de pacientes en FCI-IC. Debido a que la mayoría de los individuos con AE son sintomáticos y la FCI-IC es el principal centro de referencia (tanto estructural como electrofisiológico), este estudio probablemente refleja todo el espectro de la enfermedad sintomática. No obstante, es posible que las personas con AE y una arritmia sintomática concomitante soliciten atención médica con mayor frecuencia, que personas con AE con cuadros clínicos menos severos.

El análisis por clúster de las comorbilidades de AE identificó dos subgrupos claramente definidos que no habían sido informados previamente. Uno de los subgrupos, consistía principalmente en pacientes con síndrome WPW y/o TSV, (muy pocos presentaban obstrucción TSVD o una puntuación de Carpentier tipo D), los cuales se asociaron con una mortalidad significativamente menor. El otro subgrupo incluyó pacientes con obstrucción del TSVD y/o BRD completo. La menor mortalidad de personas con WPW había sido previamente observada por Gentles et al. (1992) (38), quién lo atribuyó a un artefacto estadístico, debido a un tamaño de muestra pequeño.

No está claro porqué la forma más grave de la enfermedad (Carpentier tipo D y la presencia de obstrucción del TSVD) es rara en pacientes con síndrome WPW y/o TSV, pero una posible explicación es que anormalidades genéticas o factores ambientales subyacentes a la enfermedad en estos grupos de pacientes podrían afectar diferentes genes o vías de desarrollo. Aunque es poco probable, las exploraciones alternativas incluyen la posibilidad de que la mortalidad prenatal sea mayor en pacientes con síndrome WPW, TSV o formas graves de la enfermedad y, por lo tanto, un menor número de estos pacientes son encontrados después del nacimiento. Otra posibilidad a contemplar podría ser la inhibición en el desarrollo de vías de conducción accesorias cuando hay un desplazamiento extremo de la válvula tricúspide.

Adicionalmente, la obstrucción del TSVD en la AE se ha hipotetizado como secundaria a un bajo flujo anterógrado durante el desarrollo del tracto de salida del VD (39), posiblemente con mayor frecuencia en las formas más graves de la enfermedad; lo cual puede explicar la asociación entre la obstrucción del TSVD y una clasificación de Carpentier tipo D.

Por otra parte, al hacer referencia a comorbilidades, anomalías extracardiacas o entidades sindrómicas encontradas, es necesario incluir al síndrome de deleción subtelomérica en el cromosoma 9q34.3 de la paciente correspondiente al caso No.2, incluía los genes *EHMT*, *MIR602* y *CACNA1B*, los cuales corresponden a la histona-lisina N-metiltrasnferasa 1 eucromática, al microRNA 602 y a la subunidad alfa-1B del canal de calcio dependiente de voltaje, respectivamente(34). Alrededor del 25% de las personas afectadas con síndrome de Kleefstra presentan una variante patógena en *EHMT1 y el* 75% restante presenta una microdeleción heterocigótica en el cromosoma 9q34.3 que incluye al menos parte del gen *EHMT1* (35), como es el caso del paciente reportado en este estudio, el cual además presenta como hallazgos fenotípicos positivos obesidad, microcefalia, hipertelorismo, braquidactilia, hipotonía, déficit cognitivo , trastorno del sueño, comportamiento agresivo e infecciones respiratorias a repetición (40). Los defectos cardiacos asociados al síndrome Kleefstra son los defectos cardiacos conotruncales, siendo la anomalía de Ebstein encontrada en este paciente, un hallazgo novedoso asociado a este síndrome.

De igual modo, en el análisis realizado al paciente No. 8, reportado en el artículo

"Identification of a New Candidate Locus for Ebstein Anomaly in 1p36.2" (36), se observó que su fenotipo era consistente con la descripción del síndrome de deleción 1p36 proximal, (que incluye la presencia de deficiencia de crecimiento pre y posnatal (principalmente postnatal), dificultades para la alimentación, cejas arqueadas) y la ausencia de características asociadas con deleciones 1p36 teloméricas como pérdida de audición y cejas rectas.

En la búsqueda bibliográfica y de bases de datos, se encontró la AE en solo 10 de 302 pacientes con deleciones 1p36. El paciente descrito previamente mostró pérdida de la región proximal de 1p36, pero no mostró pérdida de la región crítica (RC), según los casos informados con AE o con deleción de *PRDM16* (gen propuesto por Shimada et al (2015) (41) en la región telomérica para asociarse con AE). Se ha encontrado *PRDM16* en la región de solapamiento genómico en personas con síndrome de deleción 1p36, con miocardiopatía no compactada y dilatación del VI, la cual fue también evaluada por Arndt et al. (2013) (42) de forma independiente en dos cohortes de pacientes no sindrómicos con este tipo de miocardiopatía, detectando mutaciones que incluían una mutación truncada, una mutación *nonsense*, y una mutación *missense*. Por lo tanto, este es el primer caso reportado de un paciente con una deleción proximal que se presenta con AE. El punto de corte telomérico en la deleción identificada está a más de 1 Mb de la región compartida por todos los demás casos informados de AE con deleciones 1p36, por lo que es poco probable que esta supresión afecte a una región reguladora de los genes contenidos en la RC informada previamente. Este hallazgo sugiere que la pérdida de *PRDM16* no es necesaria para el desarrollo de la AE en el síndrome de deleción 1p36 y que la pérdida de un locus proximal adicional en 1p36 también está probablemente asociada con esta patología.

Estos datos sugieren que la delimitación de dos RC diferentes en 1p36 es necesaria para explicar el fenotipo cardíaco identificado en pacientes con AE con deleciones 1p36. Por lo tanto, es probable que haya dos *loci* independientes en los que la haploinsuficiencia pueda contribuir al desarrollo de la AE, como ha sido propuesto por Jordan et al. (2015) (43) y Zaveri et al. (2014) (44) para diferentes formas de CC. La RC telomérica del paciente descrito por Digilio et al. (2011) (45), contiene los genes *PRDM16* y el gen *SKI*, siendo el último previamente asociado con defectos cardiacos congénitos en modelos animales y en estudios genéticos humanos (46,47). Los pacientes con mutaciones missense y frameshift

heterocigotas en *SKI* muestran un trastorno multisistémico del tejido conectivo, denominado síndrome de Shprintzen-Goldberg caracterizado por craneosinostosis, hábito marfanoide, hipotonía severa del músculo esquelético, discapacidad intelectual y anomalías cardiovasculares como prolapso de la válvula mitral y dilatación aórtica (48,49). Es importante señalar que la región crítica telomérica no contiene *PRDM16* y sugiere que este gen no es necesario para el desarrollo de AE en pacientes con deleciones 1p36. La RC proximal está delimitada por la deleción informada en el extremo telomérico y por el paciente F de Redon et al. (2005)(50) (uno de solo 2 pacientes, aparte de este caso, cuyas deleciones no abarcan el gen *SKI)* en el extremo proximal.

La deleción presente en este caso contiene aproximadamente de 221 genes, incluidos genes que están altamente expresados en el tejido cardíaco y se han implicado en la fisiología cardíaca o el desarrollo cardíaco en modelos humanos, animales o de cultivo celular (43), siendo solo siete genes implicados en el desarrollo de CC (*RERE*, *UBE4B*, *CAZ1*, *MTOR*, *PDPN*, *PLEKHM2*, y *SPEN)* (51,52). *UBE4B* y *RERE* han sido implicados en el desarrollo de defectos cardiacos congénitos a través de la regulación del desarrollo del miocardio.

Ube4b participa en el desarrollo cardíaco del ratón y se expresa en el músculo cardíaco durante la embriogénesis y la edad adulta. Los ratones *knockout Ube4b* muestran hipertrofia cardiaca asociada con derrame pericárdico, indicativo de insuficiencia cardíaca congestiva y trabeculación reducida, así como una capa miocárdica no desarrollada y compacta con aumento de la apoptosis de los cardiomiocitos durante la embriogénesis. La deleción de *UBE4B* conduce a una mala regulación de genes tales como *GATA6*, que han sido implicados en la regulación de la diferenciación del miocardio durante la cardiogénesis (52). No se ha descrito ningún fenotipo humano de haploinsuficiencia de *UBE4B*.

Por otro parte, los ratones portadores de alelos nulos e hipomórficos de *Rere* tenían varias anomalías, incluidas las anomalías cardiacas. Los ratones *knockout Rere* mueren por insuficiencia cardíaca entre las semanas 9,5 y 11 de la embriogénesis, mientras que los ratones heterocigotos portadores de un alelo hipomórfico tienen una alta frecuencia de malformaciones cardiovasculares (51). Fregeau et al. (2016) (53) informaron 10 casos de mutaciones de novo en *RERE* en las que los pacientes presentaban trastornos del

neurodesarrollo, hipotonía, defectos estructurales del ojo, defectos genitourinarios y el 40% de los sujetos presentaban CC, con mayor frecuencia comunicación interventricular.

Alternativamente, un solo paciente con tetralogía de Fallot y válvula aórtica bicomisural condujo a Zaveri et al. (2014) (44) para proponer una tercera región adicional asociada con CHD, que afecta a los genes *PDPN* y *SPEN,* que se ha demostrado que se asocia con CC en modelos de ratón (54). Aunque el paciente presentado aquí manifiesta una forma diferente de CC, su deleción muestra una superposición significativa con esta tercera región propuesta, por lo que no podemos descartar la participación de estos genes en el fenotipo de este paciente. Además, las CC asociada con deleciones de 1p36 podría ser causada por efectos posicionales provocados por cambios en la arquitectura cromosómica, como sugieren Redon et al. (2005)(50). De acuerdo con esta hipótesis, la haploinsuficiencia de genes específicos contenidos dentro de las deleciones observadas podría no ser causal para los fenotipos observados. En cambio, el entorno cromosómico alterado podría dar lugar a cambios en la expresión génica de los objetivos situados distantes a la deleción.

Por último, el análisis de los pacientes y familiares a quienes se les realizó WES, arrojó dos genes asociados a defectos cardiacos como la cardiomiopatía hipertrófica, la cardiomiopatía dilatada y la no compactación del ventrículo izquierdo; sin embargo, no hay reportes previos de pacientes con mutaciones en estos genes asociados a la anomalía de Ebstein, lo cual sugiere a los genes *TTN* y *LDB3* como posibles candidatos para el diagnóstico de la AE, por lo cual es necesario la realización de investigaciones futuras y complementarias con estudios funcionales para confirmar este hallazgo.

Una fracción variable de todos los casos de AE permanecen sin diagnostico molecular después de los estudios realizados, lo que indica que el análisis molecular debe incluir la búsqueda para mutaciones en regiones no codificantes. Además, es posible que genes desconocidos estén implicados en la AE, por lo que en un futuro cercano la secuenciación completa del genoma revelará mecanismos moleculares novedosos y genes candidatos para explicar los casos de AE no diagnosticados.

CONCLUSIONES

La identificación de las causas genéticas de la AE ha resultado esquiva, probablemente debido a la heterogeneidad genética que subyace a la heterogeneidad fenotípica de la enfermedad.

En una región con datos limitados sobre la presentación clínica de la enfermedad cardiaca, este estudio representa un paso adelante en la caracterización de pacientes con AE en la población colombiana. La probable existencia de endofenotipos y diagnósticos diferenciales deben considerarse al buscar causas genéticas de la enfermedad y al evaluar los resultados probables en el entorno clínico. Además, es probable que los pacientes tengan diferentes pronósticos o respuesta al tratamiento, datos que pueden ser de gran utilidad en el seguimiento clínico. En el futuro, los nuevos esfuerzos de investigación deben apuntar a identificar los factores genéticos y ambientales subyacentes a la heterogeneidad y las diversas presentaciones clínicas de la anomalía de Ebstein.

La presentación fenotípica novedosa de una paciente con síndrome Kleefstra asociado a la anomalía de Ebstein, la cual no había sido encontrada en reportes previos, lo cual indica la gran heterogeneidad fenotípica de este padecimiento.

La descripción de un primer caso de un paciente con AE que presenta una deleción proximal de 1p36, que no muestra superposición con la RC previa notificada en otros pacientes con AE, sugiere la presencia de un locus proximal adicional asociado con AE. Se requiere un estudio adicional de los genes contenidos en estas regiones en pacientes con formas no sindrómicas de AE y estudios funcionales para determinar su papel en la patogénesis de este defecto cardíaco. Del mismo modo, la identificación de pacientes adicionales con AE que llevan deleciones 1p36 proximales puede definir aún más la región proximal asociada con la enfermedad.

La presencia de dos genes asociados a defectos cardiacos que no han sido reportados previamente en pacientes con anomalía de Ebstein, lo cual los sugiere como posibles genes candidatos que deben ser estudiados más a fondo en investigaciones futuras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shiaulou Yuan, Samir Zaidi and MB. Congenital Heart Disease: emerging themes linking genetics and development. 2014;23(3):352–9.
2. Osiro S, Tiwari KJ, Mathenge N, Rodriguez JR, Tubbs RS, Loukas M. When lithium hurts: A look at ebstein anomaly. Cardiol Rev. 2013;21(5):257–63.
3. Nora JJ, Nora a. H, Toews WH. Lithium, Ebstein's Anomaly, and other Congenital Heart Defects. Lancet. 1973;304:594–5.
4. Echocardiography C, Long WA, Iv PWW. MATERNAL LITHIUM AND NEONATAL EBSTEIN ' S ANOMALY : EVALUATION WITH. 1984;1(2):1–3.
5. Vermeer AMC, van Engelen K, Postma A V., Baars MJH, Christiaans I, De Haij S, et al. Ebstein anomaly associated with left ventricular noncompaction: An autosomal dominant condition that can be caused by mutations in MYH7. Am J Med Genet Part C Semin Med Genet. 2013;163(3):178–84.
6. Bettinelli AL, Mulder TJ, Funke BH, Lafferty KA, Longo SA, Niyazov DM. Familial ebstein anomaly, left ventricular hypertrabeculation, and ventricular septal defect associated with a MYH7 mutation. Am J Med Genet Part A. 2013;161(12):3187–90.
7. Postma A V., Van Engelen K, Van De Meerakker J, Rahman T, Probst S, Baars MJH, et al. Mutations in the sarcomere gene MYH7 in Ebstein anomaly. Circ Cardiovasc Genet. 2011;4(1):43–50.
8. Hirono K, Hata Y, Ibuki K, Yoshimura N. Familial Ebstein's anomaly, left ventricular noncompaction, and ventricular septal defect associated with an MYH7 mutation. J Thorac Cardiovasc Surg [Internet]. 2014;148(5):e223–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2014.08.049
9. Madrid A, Restrepo JP. Cardiopatías Congénitas. Rev Gastrohnup. 2013;15(1):56–72.
10. Garg V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. Cell Mol Life Sci. 2006;63(10):1141–8.
11. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, et al. De novo mutations in histone modifying genes in congenital heart disease. Nature. 2013;498(7453):220–3.
12. Cruz Robles D, De La Peña Diaz A, Arce Fonseca M, Garcia Trejo JDJ, Pérez Méndez

ÓA, Vargas Alarcón G. Genética y biología molecular de las cardiopatías congénitas y adquiridas. Arch Cardiol Mex. 2005;75(4):467–82.

13. Gittenberger-de Groot AC, Bartelings MM, Poelmann RE, Haak MC, Jongbloed MRM. Embryology of the heart and its impact on understanding fetal and neonatal heart disease. Semin Fetal Neonatal Med [Internet]. 2013;18(5):237–44. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2013.04.008
14. I.E. Monroy-Muñoz et al. Cambiando el paradigma en las cardiopatías congénitas. Gac Med Mex. 2013;149:212–9.
15. Franco D, Domínguez J, Castro M del P, Aránega A. Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco. Rev Esp Cardiol [Internet]. 2002;55(2):167–84. Available from: http://appswl.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13026389&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=25&ty=122&accion=L&origen=cardio&web=www.revespcardiol.org&lan=es&fichero=25v55n02a13026389pdf001.pdf&anuncioPdf=ERROR_publi_pdf
16. Gómez-Gómez M, Danglot-Banck C, Santamaría-Díaz H, Riera-Kinkel C. Desarrollo embriológico y evolución anatomofisiológica del corazón (Segunda parte). Rev Mex Pediatr. 2012;79(3):144–50.
17. Lahaye S, Lincoln J, Garg V. Genetics of Valvular Heart Disease Stephanie. Curr Cardiol Rep. 2015;16(6).
18. Blue GM, Kirk EP, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS. Congenital heart disease: Current knowledge about causes and inheritance. Med J Aust. 2012;197(3):155–9.
19. Abigail Simmons M, Brueckner M. The genetics of congenital heart disease.. understanding and improving long-Term outcomes in congenital heart disease: A review for the general cardiologist and primary care physician. Curr Opin Pediatr. 2017;29(5):520–8.
20. Gueçaimburú DR, Adulto DEL. Genética. 2014;(Civ):421–9.
21. Luis J, López R. Válvulas cardíacas: funcionamiento y enfermedades. Libr la salud Cardiovasc [Internet]. :457–62. Available from: http://www.fbbva.es/TLFU/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap51.pdf

22. Salazar Castro G, Rincon Peña O, Alexander CC. Enfermedad Valvular Cardiaca. Cardiologia. :524–630.
23. Maroto C, Salamanca FE De, Herráiz I, Zabala JI. Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en las cardiopatías congénitas más frecuentes. 2018;119–20.
24. López HP. Prolapso de la Válvula Mitral. Complicaciones y Conducta a seguir. 1998;24(1):5–12.
25. Mena JS, Ramón ML, Pediátrica SDC, Universitario H, Servet M. Estenosis pulmonar valvular. 2010;267–70.
26. Shah PM. Valvulopatía tricuspídea y pulmonar: evaluación y tratamiento. Rev Esp Cardiol. 2010;63(11):1349–65.
27. Driscoll DJ, Dearani JA. Ebstein Anomaly of the Tricuspid Valve. Pediatr Cardiovasc Med Second Ed. 2012;509–17.
28. Attenhofer Jost CH, Connolly HM, Edwards WD, Hayes D, Warnes CA, Danielson GK. Ebstein's anomaly - Review of a multifaceted congenital cardiac condition. Swiss Med Wkly. 2005;135(19–20):269–81.
29. Jordán-Ríos A, Magaña-Bailón E, Martínez-Aguilar M, Maury-Ordaz S, Juárez-Orozco LE, Jiménez-Niño A, et al. Anomalía de Ebstein. Rev Mex Cardiol. 2014;25(2):170.
30. Paranon S, Acar P. Ebstein's anomaly of the tricuspid valve: From fetus to adult. Heart. 2008;94(2):237–43.
31. Attenhofer Jost CH, Connolly HM, Dearani JA, Edwards WD, Danielson GK. Ebstein's Anomaly. Circulation [Internet]. 2006;115(2):277–85. Available from: http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.619338
32. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. J Clin Invest. 1999;104(11):1567–73.
33. Cabrera R, Restrepo CM, Sandoval N, Miranda-fernández MC, Huertas-quiñones VM, Carreño M, et al. Identification of clinically relevant phenotypes in patients with Ebstein anomaly. Clin Cardiol. 2018;(November 2017):1–6.
34. Willemsen MH, Vulto-Van Silfhout AT, Nillesen WM, Wissink-Lindhout WM, Van

Bokhoven H, Philip N, et al. Update on Kleefstra syndrome. Mol Syndromol. 2012;2(3–5):202–12.

35. Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J, Oudakker AR, Nillesen WM, Magee A, et al. Loss-of-Function Mutations in Euchromatin Histone Methyl Transferase 1 (EHMT1) Cause the 9q34 Subtelomeric Deletion Syndrome. Am J Hum Genet [Internet]. 2006;79(2):370–7. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707631450
36. Miranda-Fernández M-C, Ramírez-Oyaga S, Restrepo CM, Huertas-Quiñones V-M, Barrera-Castañeda M, Quero R, et al. Identification of a New Candidate Locus for Ebstein Anomaly in 1p36.2. Mol Syndromol [Internet]. 2018;9(3):164–9. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/488820
37. Firth H V., Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. Am J Hum Genet [Internet]. 2009;84(4):524–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.03.010
38. Gentles TL, Cakier a L, Clarkson PM, Neutze JM. Predictors of Long-Term Survival with Ebstein's Anomaly of the Tricuspid Valve. 1991;377–81.
39. Celermajer DS, Bull C, Till JA, Cullen S, Vassillikos VP, Sullivan ID, et al. Ebstein's anomaly: Presentation and outcome from fetus to adult. J Am Coll Cardiol [Internet]. 1994;23(1):170–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097(94)90516-9
40. Kleefstra T, Smidt M, Banning MJG, Oudakker AR, Van Esch H, De Brouwer APM, et al. Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. J Med Genet. 2005;42(4):299–306.
41. Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, et al. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. Brain Dev [Internet]. 2015;37(5):515–26. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2014.08.002
42. Arndt AK, Schafer S, Drenckhahn JD, Sabeh MK, Plovie ER, Caliebe A, et al. Fine mapping of the 1p36 deletion syndrome identifies mutation of PRDM16 as a cause of

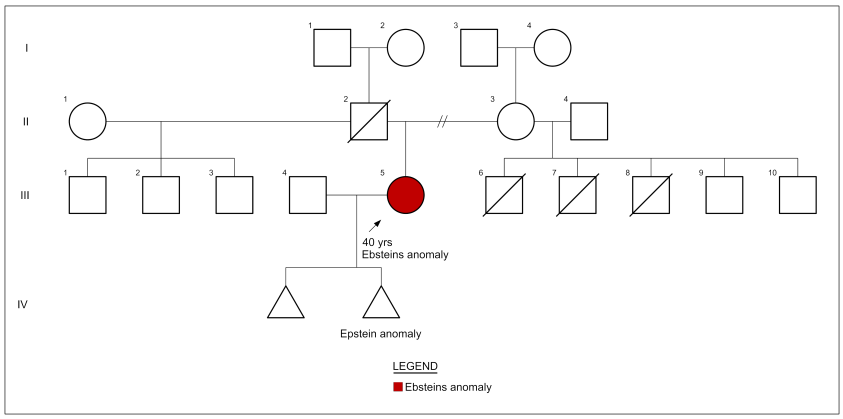
cardiomyopathy. Am J Hum Genet [Internet]. 2013;93(1):67–77. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.05.015

43. Jordan VK, Zaveri HP, Scott DA. 1P36 Deletion Syndrome: an Update. Appl Clin Genet [Internet]. 2015;8:189–200. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4555966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
44. Zaveri HP, Beck TF, Hernández-García A, Shelly KE, Montgomery T, Van Haeringen A, et al. Identification of critical regions and candidate genes for Cardiovascular malformations and cardiomyopathy associated with deletions of chromosome 1p36. PLoS One. 2014;9(1):1–10.
45. Digilio MC, Bernardini L, Lepri F, Giuffrida MG, Guida V, Baban A, et al. Ebstein anomaly: Genetic heterogeneity and association with microdeletions 1p36 and 8p23.1. Am J Med Genet Part A. 2011;155(9):2196–202.
46. Doyle AJ, Doyle JJ, Bessling SL, Maragh S, Lindsay ME, Schepers D, et al. HHS Public Access. 2013;44(11):1249–54.
47. Zhu X, Zhang Y, Wang J, Yang JF, Yang YF, Tan ZP. 576kb deletion in 1p36.33-p36.32 containing SKI is associated with limb malformation, congenital heart disease and epilepsy. Gene [Internet]. 2013;528(2):352–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.024
48. Carmignac V, Thevenon J, Adès L, Callewaert B, Julia S, Thauvin-Robinet C, et al. In-frame mutations in exon 1 of SKI cause dominant shprintzen-goldberg syndrome. Am J Hum Genet. 2012;91(5):950–7.
49. Schepers D, Doyle AJ, Oswald G, Sparks E, Myers L, Willems PJ, et al. The SMAD-binding domain of SKI: A hotspot for de novo mutations causing Shprintzen-Goldberg syndrome. Eur J Hum Genet. 2015;23(2):224–8.
50. Redon R, Rio M, Gregory SG, Cooper RA, Fiegler H, Sanlaville D, et al. Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: Contiguous gene deletion or "deletion with positional effect" syndrome? J Med Genet. 2005;42(2):166–71.
51. Kim BJ, Zaveri HP, Shchelochkov OA, Yu Z, Hernández-García A, Seymour ML, et al. An Allelic Series of Mice Reveals a Role for RERE in the Development of Multiple

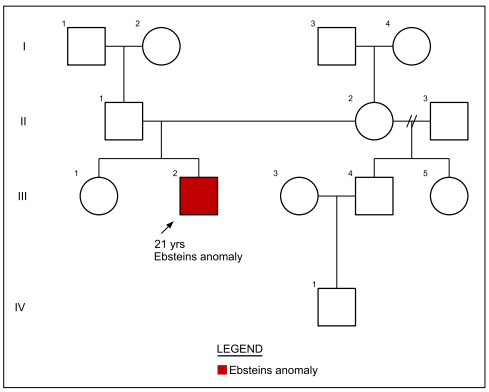
Organs Affected in Chromosome 1p36 Deletions. PLoS One. 2013;8(2).

52. Kaneko-oshikawa C, Nakagawa T, Yoshikawa H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Nakayama K, et al. Mammalian E4 Is Required for Cardiac Development and Maintenance of the Nervous System Mammalian E4 Is Required for Cardiac Development and Maintenance of the Nervous System. Mol Cell Biol. 2005;25(24):10953–64.
53. Fregeau B, Kim BJ, Hernández-García A, Jordan VK, Cho MT, Schnur RE, et al. De Novo Mutations of RERE Cause a Genetic Syndrome with Features that Overlap Those Associated with Proximal 1p36 Deletions. Am J Hum Genet. 2016;98(5):963–70.
54. Kuroda K, Han H, Tani S, Tanigaki K, Tun T, Furukawa T, et al. Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. Immunity. 2003;18(2):301–12.

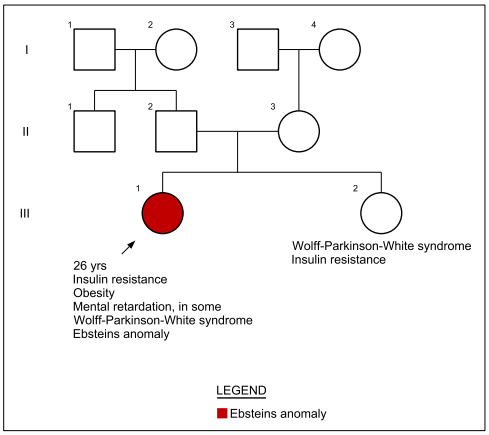
GRÁFICAS SUPLEMENTARIAS



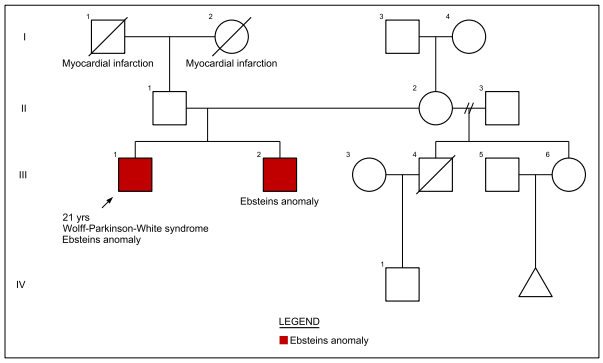
Gráfica suplementaria 1. Árbol genealógico de familia del caso No. 1



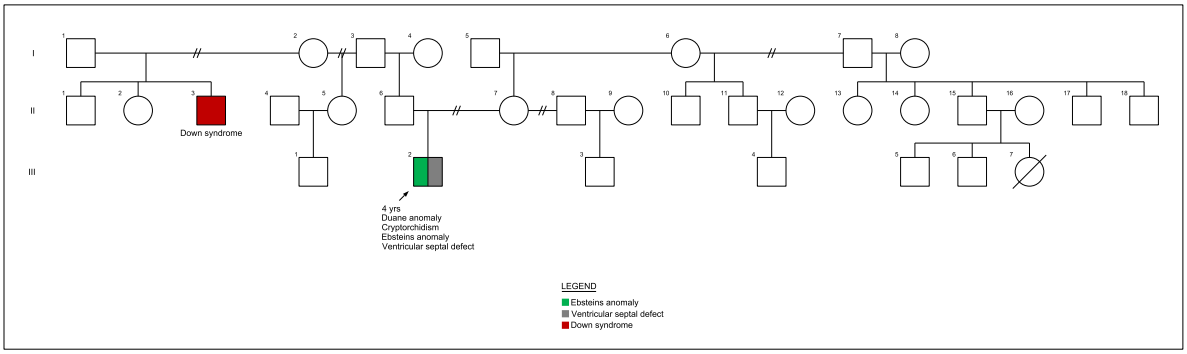
Gráfica suplementaria 2. Árbol genealógico de familia del caso No. 7



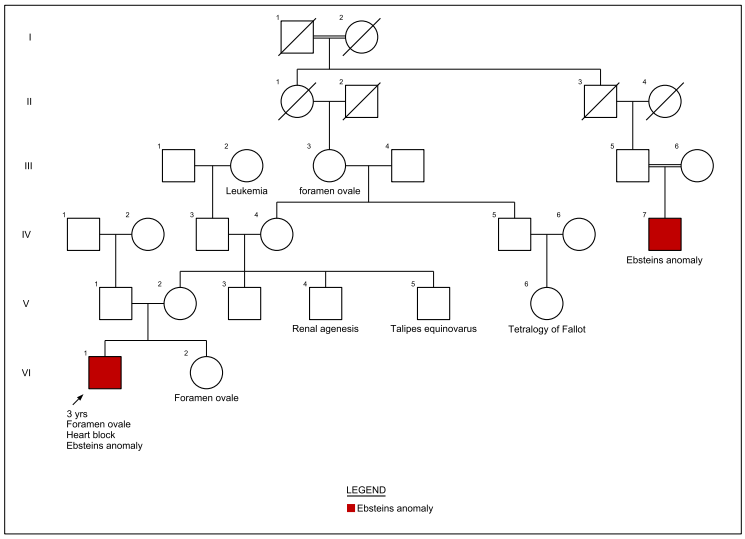
Gráfica suplementaria 3. Árbol genealógico de familia del caso No. 2



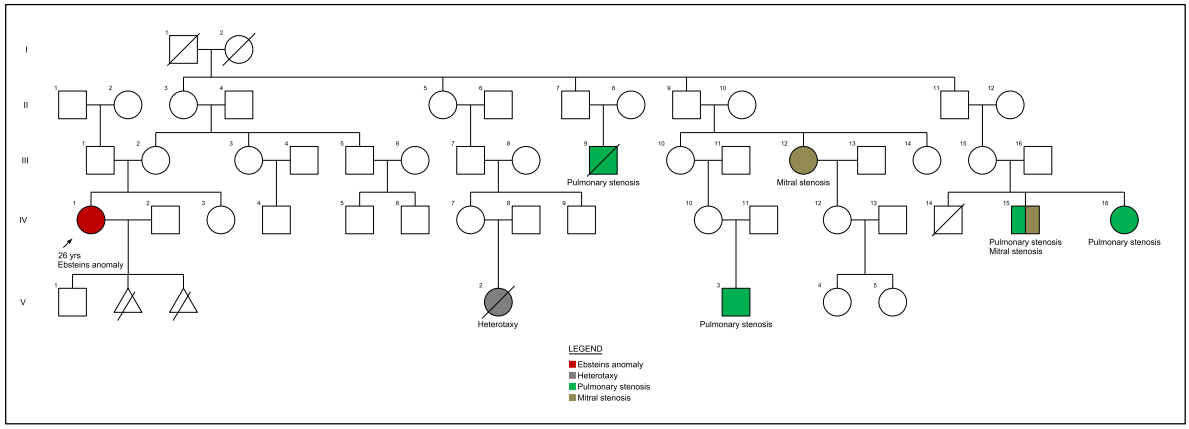
Gráfica suplementaria 4. Árbol genealógico de familia del caso No. 3



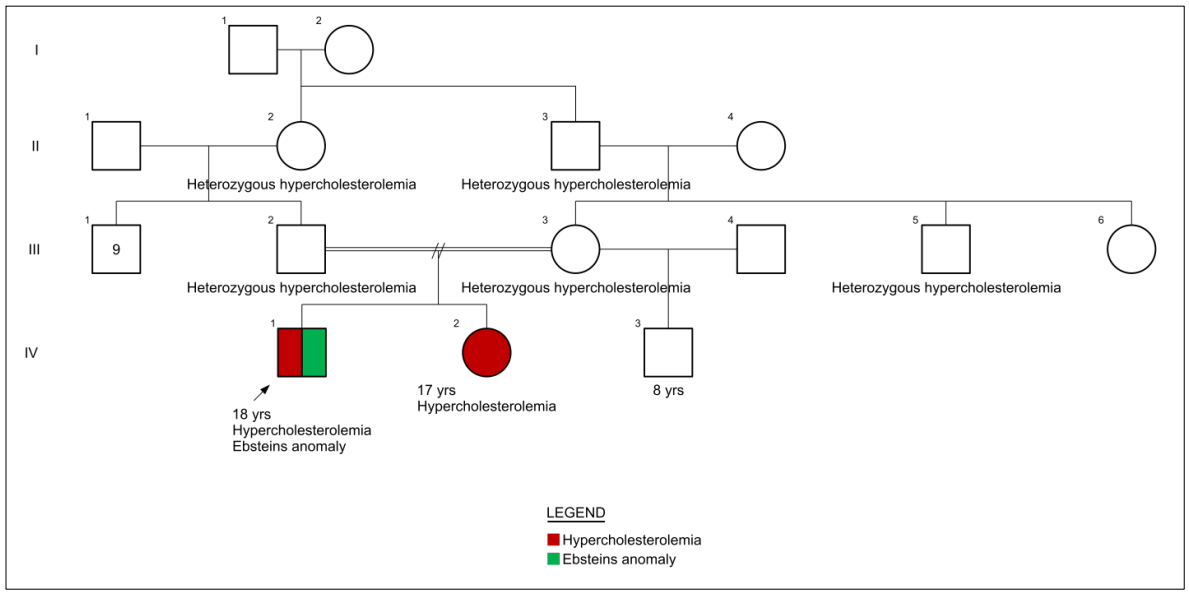
Gráfica suplementaria 5. Árbol genealógico de familia del caso No. 8



Gráfica suplementaria 6. Árbol genealógico de familia del caso No. 10

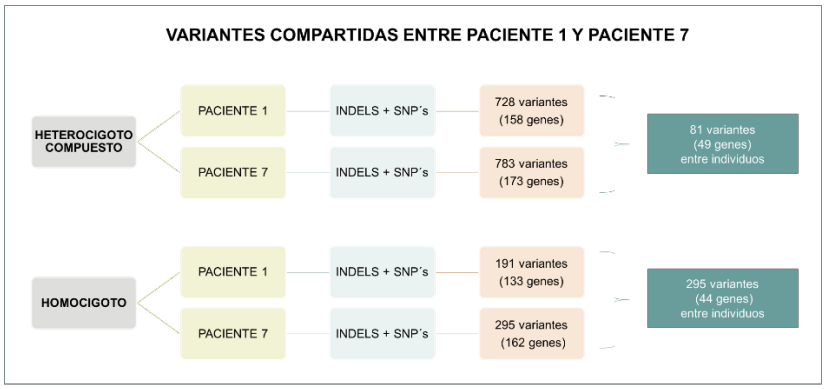


Gráfica suplementaria 7. Árbol genealógico de familia del caso No. 11

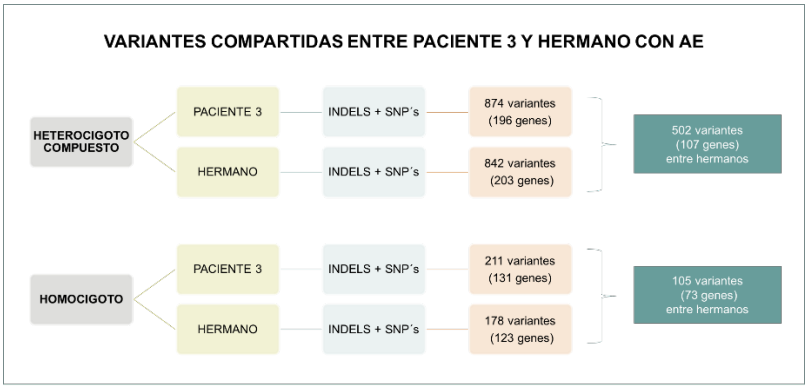


Gráfica suplementaria 8. Árbol genealógico de familia del caso No. 12

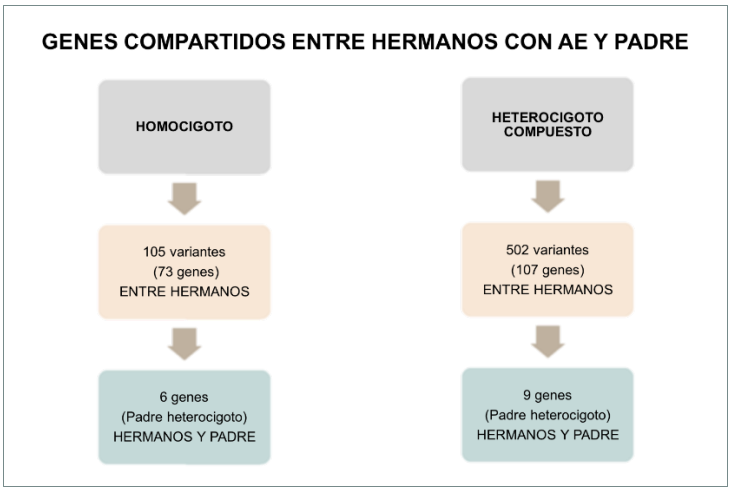
DATOS SUPLEMENTARIOS



Suplementaria 1. Filtrado de variantes de los pacientes de los casos No. 1 y 7

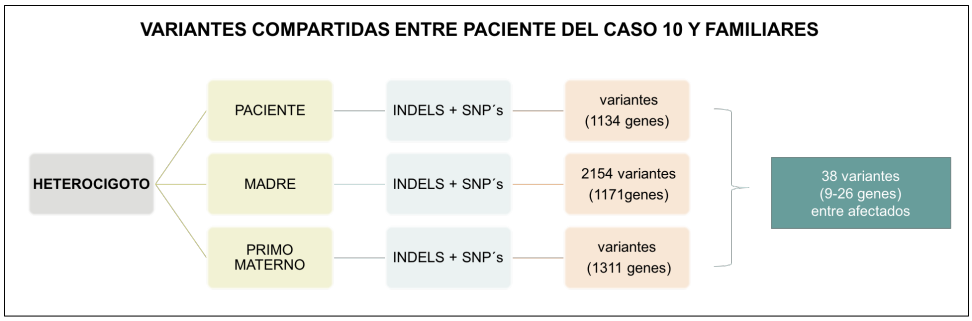


Suplementaria 2. Filtrado de variantes entre paciente de caso No. 3 y su hermano

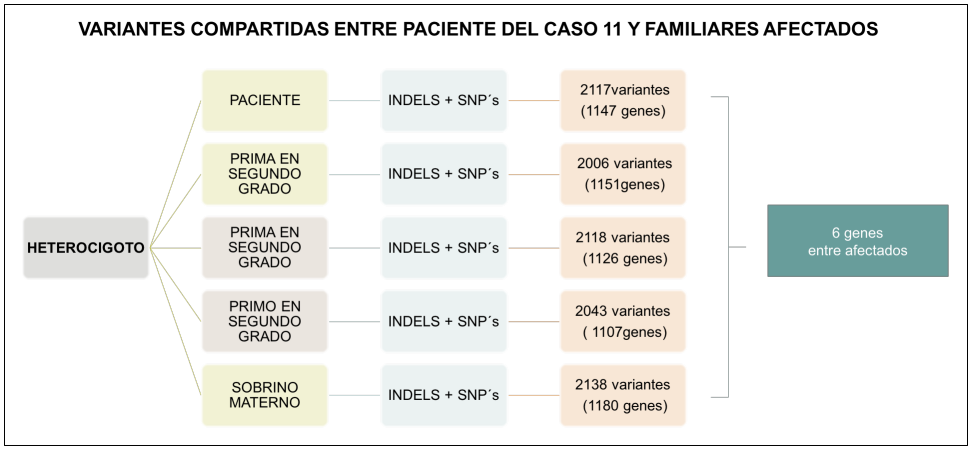


Suplementaria 3. Genes compartidos entre hermanos del caso No.3 y su padre

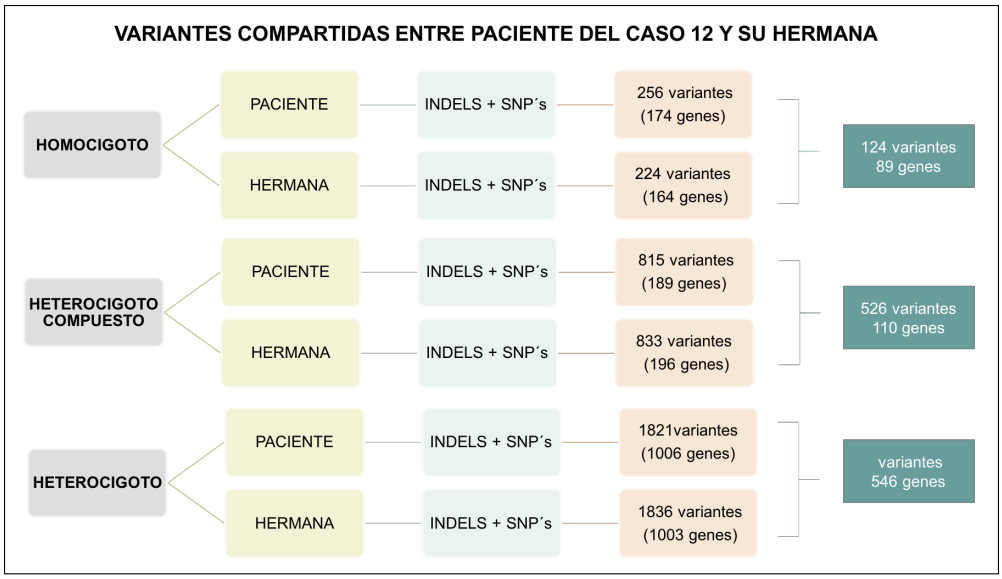
DATOS SUPLEMENTARIOS



Suplementaria 4. Filtrado de variantes entre familiares afectados del caso 10



Suplementaria 5. Filtrado de variantes entre familiares afectados del caso 11



Suplementaria 6. Filtrado de variantes entre paciente de caso No. 12 y su hermana

TABLAS SUPLEMENTARIAS

CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS	Genes reportados	*ACTA2, ACTC1, ACVR1, ACVR2B, ACVRL1, ANKRD1, B3GAT3, BMPR2, BRAF, CBL, CFC1, CITED2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, CREBBP, CRELD1, CHD7, DTNA, EFEMP2, EHMT1, ELN, ENG, EP300, EVC, EYA4, FBN1, FBN2, FLNA, FOXC1, FOXF1, FOXH1, FOXP1, GAA, GATA4, GATA5, GATA6, GDF1, GJA1, GJA5, HAND2, HRAS, IRX4, ISL1, JAG1, KANSL1, KCNA5, KCNJ8, KCNK3, KMT2D, KRAS, LEFTY2, MAP2K1/MEK1, MAP2K2, MCTP2, MED12, MED13L, MFAP5, MIB1, MYBPC3, MYH11, MYH6, MYH7, MYLK, NEXN, NF1, NKX2-5, NKX2-6, NODAL, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, PHP4, NRAS, PDGFRA, PITX2, PLOD1, PRKG1, PTPN11, RAF1, RASA1, RASA2, RIT1, SALL4, SHOC2, SKI, SLC2A10, SMAD1, SMAD3, SMAD4, SMAD6, SMAD9, SOS1, SOS2, SPRED1, TAB2, TBX1, TBX20, TBX5, TDGF1, TFAP2B, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TNNI3, TNNI3K, TOPBP1, UPF3B, ZDHHC9, ZFPM2, ZIC3, NSD1, ALMS1, BCOR, GPC3, HAND1, MEIS2, NR2F2, NSD1*

Tabla suplementaria 1. Genes relacionados con cardiopatías congénitas

MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA	Genes reportados	*ACTC1, DES, FLNC, GLA, LAMP2, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, PLN, PRKAG2, PTPN11, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTR*
	Ocasionalmente asociados	*AARS2, ACAD9, ACADVL, ACTA1, ACTN2, AGK, AGL, AGPAT2, ANK2, ANKRD1, ATP5E, ATPAF2, BRAF, BSCL2, CALR3, CAV3, COA5, COA6, COQ2, COX15, COX6B1, CRYAB, CSRP3, DLD, DSP, ELAC2, FAH, FHL1, FHL2, FHOD3, FOXRED1, FXN, GAA, GFM1, GLB1, GNPTAB, GUSB, HRAS, JPH2, KRAS, LDB3, LIAS, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, MLYCD, MRPL3, MRPL44, MRPS22, MTO1, MYH6, MYOM1, MYOZ2, MYPN, NEXN, NF1, NRAS, OBSCN, PDHA1, PHKA1, PMM2, RAF1, SCO2, SHOC2, SLC22A5, SLC25A3, SLC25A4, SOS1, SURF1, TAZ, TCAP, TMEM70, TRIM63, TSFM, TTN, VCL, CACNA1C, GATA4*
	Candidatos	*BAG3, CASQ2, IDH2, KCNJ8, KLF10, LMNA, MURC, MYLK2, OBSL1, PDLIM3, CPT2, MTO1*

Tabla suplementaria 2. Genes relacionados con Miocardiopatía Hipertrófica

MIOCARDIOPATÍA DILATADA	Genes reportados	*ACTC1, BAG3, DES, DMD, DSP, FLNC, LMNA, MYBPC3, MYH7, PKP2, PLN, RBM20, TAZ, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN*
	Ocasionalmente asociados	*ABCC9, ACTA1, ACTN2, ALMS1, ANKRD1, ANO5, CAV3, CHRM2, COL7A1, CRYAB, CSRP3, DNAJC19, DOLK, DSC2, DSG2, EMD, EYA4, FHL2, FHOD3, FKRP, FKTN, FOXD4, GAA, GATA4, GATA6, GATAD1, GLB1, HFE, JUP, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, MURC, MYH6, MYL2, MYL3, MYOT, MYPN, NEBL, NEXN, PRDM16, PSEN1, PSEN2, RAF1, RYR2, SCN5A, SDHA, SGCD, SLC22A5, SPEG, SYNE1, SYNE2, TBX20, TCAP, TMEM43, TMPO, TOR1AIP1, TTR, TXNRD2, VCL, XK*
	Candidatos	*BRAF, DNM1L, GATA5, GLA, IDH2, ILK, KCNJ2, KCNJ8, NKX2-5, OBSCN, OPA3, PDLIM3, PTPN11, SGCA, SGCB, TNNI3K, ACADVL, CPT2, TMEM70, CTF1, LRRC10, MED12, NPPA, PLEKHM2*

Tabla suplementaria 3. Genes relacionados con Miocardiopatía dilatada

MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGENICA	Genes reportados	*DSC2, DSG2, DSP, FLNC, JUP, PKP2, PLN, TMEM43, ACTN2, EMD, PRKAG2, RBM20, RYR2, TNNI3, TNNT2*
	Ocasionalmente asociados	*CTNNA3, DES, LMNA, RYR2, TGFB3, TTN, ANKRD1, PDLIM3, TGFB3*
	Candidatos	*CASQ2, CTNNB1, LDB3, PERP, PKP4, PPP1R13L, SCN5A*

Tabla suplementaria 4. Genes asociados con Miocardiopatía arritmogénica

MIOCARDIOPATÍA NO COMPACTADA	Genes reportados	*ACTC1, MYBPC3, MYH7, TAZ*
	Ocasionalmente asociados	*ACTN2, DMD, DNAJC19, DTNA, FHL1, HCN4, LDB3, LMNA, MIB1, MYH6, MYL2, NKX2-5, NNT, PLN, PRDM16, RYR2, TNNT2, TPM1, SCN5A, LAMP2, TAZ, VCL, PLEKHM2*
	Candidatos	*ANKRD1, BAG3, CASQ2, CSRP3, DSP, FLNC, KCNH2, KCNQ1, MLYCD, MYL3, NOTCH1, PTPN11, TNNC1, TNNI3, TTN*

Tabla suplementaria 5. Genes asociados con Miocardiopatía no compactada

MIOCARDIOPATÍA RESTRICTIVA	Genes reportados	*ACTC1, DES, GLA, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTR*
	Ocasionalmente asociados	*ACTN2, FHL1, HFE, MYPN, TNNC1, TTN,*
	Candidatos	*BAG3, FLNC, LMNA*

Tabla suplementaria 6. Genes asociados con Miocardiopatía restrictiva

RASOPATÍAS	Genes reportados	*BRAF, KRAS, NF1, PTPN11, RAF1, SOS1, SOS2*
	Ocasionalmente asociados	*A2ML1, HRAS, LZTR1, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, RASA2, RIT1, RRAS, SHOC2, SPRED1, CBL, RASA1*

Tabla suplementaria 7. Genes asociados a Rasopatías

HIPERTENSIÓN PULMONAR	Genes reportados	*ACVRL1, BMPR2, CAV1, ENG*
	Ocasionalmente asociados	*BMPR1B, GDF2, KCNA5, KCNK3, SMAD9*

Tabla suplementaria 8. Genes asociados a Hipertensión pulmonar

QT LARGO	Genes reportados	*CACNA1C, KCNE1, KCNE2, KCNH2, KCNJ2, KCNQ1, SCN5A*
	Ocasionalmente asociados	*AKAP9, ANK2, CALM1, CALM2, CALM3, CAV3, KCND2, KCNJ5, RYR2, SCN4B, SNTA1, TRDN*
	Candidatos	*FHL2, HCN4, KCNA5, KCND3, KCNE5, KCNE3, NOS1AP, PTRF, SCN1B*

Tabla suplementaria 9. Genes asociados a síndrome de QT largo

QT CORTO	Genes reportados	*KCNH2, KCNJ2, KCNQ1*
	Ocasionalmente asociados	*CACNA1C, CACNA2D1, CACNB2*
	Candidatos	*CACNA1D*

Tabla suplementaria 10. Genes asociados a síndrome de QT corto

CATECOLA-MINERGICA	Genes reportados	*RYR2, KCNJ2, CASQ2*
	Ocasionalmente asociados	*CALM1, CALM2, CALM3, ANK2, TRDN*
	Candidatos	*SCN5A*

Tabla suplementaria 11. Genes asociados a Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica

BRUGADA	Genes reportados	*SCN5A, CACNA1C, CACNA2D1, CACNB2, KCNJ8, SCN1B*
	Ocasionalmente asociados	*SCN10A, ABCC9, ANK2, FGF12, GPD1L, HCN4, KCND2, KCND3, KCNE5, KCNE3, PKP2, RANGRF, SCN2B, SCN3B, SLMAP, TRPM4*
	Candidatos	*ANK3, CACNA1D, KCNH2*

Tabla suplementaria 12. Genes asociados a síndrome de Brugada

SISTEMA DE CONDUCCIÓN	Genes reportados	*DES, EMD, GLA, LAMP2, LMNA, PRKAG2, SCN5A*
	Ocasionalmente asociados	*ACTC1, CACNA1D, GAA, GJA5, HCN4, HFE, KCNJ2, KCNK17, MURC, NKX2-5, SCN10A, SCN1B, TBX5, TNNI3K, TRPM4, TTR*
	Candidatos	*IRX3, KCNE2, KCNH2, KCNQ1, LDB3, MYH6, MYH7, NPPA, SCN4B, SYNE1, SYNE2*

Tabla suplementaria 13. Genes asociados a alteración en el sistema de conducción

FIBRILACIÓN AURICULAR	Ocasionalmente asociados	*ABCC9, ACTC1, EMD, GATA4, GATA5, GATA6, GJA1, GJA5, HCN4, KCNA5, KCND3, KCNE1, KCNE5, KCNE2, KCNE3, KCNJ2, KCNQ1, LMNA, NKX2-5, NKX2-6, NPPA, PITX2, RYR2, SCN10A, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, TBX5, TTR*
	Candidatos	*CACNB2, GREM2, JPH2, KCNH2, KCNJ5, KCNJ8, KCNK3, TNNI3, TNNI3K, TNNT2, TPM1, ZFHX3*

Tabla suplementaria 14. Genes asociados a fibrilación auricular

ENFERMEDADES AÓRTICAS - Marfan - TAAD - Loeys Dietz - Ehlers Danlos - Shprintzen Goldberg	Genes reportados	*ACTA2, ADAMTSL4, B3GAT3, CBS, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, EFEMP2, ELN, FBN1, FBN2, FLNA, GAA, GATA5, HRAS, KCNJ8, MED12, MYH11, MYLK, NKX2-5, NOTCH1, PLOD1, PRKG1, PTPN11, SKI, SLC2A10, SMAD3, SMAD4, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, ZDHHC9*
	Ocasionalmente asociados	*ATP7A, CHST14*
	Candidatos	*ADAMTS2, B4GALT7, FKBP14, SLC39A13, MAT2A, SMAD6*

Tabla suplementaria 15. Genes asociados a enfermedades aórticas

ENFERMEDAD MÚSCULO-ESQUELÉTICA	Genes reportados	*ABCC9, ACTA1, ACTC1, ACTN2, AGL, ANO5, ATP2A1, B3GALNT2, B4GAT1, BAG3, BIN1, CACNA1C, CAPN3, CAV3, CCDC78, CFL2, CHKB, CNTN1, COL12A1, COL6A1, COL6A2, COL6A3, CPT2, CRYAB, CSRP3, DAG1, DES, DMD, DNAJB6, DNM2, DOLK, DPM1, DPM2, DPM3, DSC2, DSG2DSP, DYSF, EMD, EYA4, FHL1, FKBP14,FKRP, FKTN, FLNC, GAA, GLA, GMPPB,GNE, HCN4, ISPD, ITGA7, JUP, KBTBD 13, KLHL40, KLHL41, LAMA2, LAMP2, LARGE1, LMNA,LMOD3, MATR3, MEGF10, MTM1, MYBP C3, MYH7, MYL2, MYL3, MYOT, MYPN, NEB, PKP2, PLEC, PLN, PNPLA2, POMGNT1, POMGNT2, POMK, POMT1, POMT2, PRKAG2, RAF1, RBM20, RYR1, RYR2, SCN5A, SELENON, SGCA, SGCB, SGCD,SGCG, SLC22A5, SQSTM1, STAC3, STIM1, TAZ, TCAP, TIA1, TMEM43, TMEM5, TNNC1, TNNI3,TNNT1, TNNT2, TNPO3, TOR1AIP1, TPM1, TPM2, TPM3, TRAPPC11, TRIM32, TTN, TTR, VCL, VCP*
	Ocasionalmente asociados	*ANKRD1, CALR3, CHRM2, CTF1, CTNNA3, DTNA, FHL2, GATA4, GATA6, GATAD1, HNRNPDL, ILK, JPH2, LAMA4, LDB3, LIMS2, LRRC10, MYF6,MYH6, MYLK2, MYOM1, MYOZ2, NEBL, NEXN,NPPA, PDLIM3, PLEKHM2, PRDM 16, SUN1, SUN2, SYNE1, SYNE2, TGFB3, TMPO, TXNRD2, NKX2-5*
	Candidatos	*ACADVL, ALMS1, DNAJC19, ELAC2, MTO1, SDHA, TMEM70*

Tabla suplementaria 16. Genes relacionados con cardiopatía y enfermedad músculo-esquelética

HIPER-COLESTEROLEMIA FAMILIAR	Genes reportados	*LDLR, APOB, PCSK9, LDLRAP1, APOE,*
	Ocasionalmente asociados	*ABCG5, ABCG8*, *LPA, LIPA, ABCB1, AMPD1, CH25H, COQ2, CPT2, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, PPARA, PYGM, RYR1, SLC22A8, NPC1L1, SLC01B1*

Tabla suplementaria 17. Genes asociados a Hipercolesterolemia familiar

ANEXO 1 - Artículo publicado

ANEXO 2 - Artículo sometido