

Formin homology domain containing 3
(FHOD3) como nuevo gen causal de
miocardiopatía hipertrófica

Autor: Juan Pablo Ochoa

Tesis doctoral UDC

2020

Director: Dr. Lorenzo Monserrat Iglesias

Tutor: Dr. Lorenzo Monserrat Iglesias

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud (RD99/2011)

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)

Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC)

Universidade da Coruña (UDC)



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ACREDITACIÓN

El Dr. Lorenzo Monserrat Iglesias, Licenciado en Medicina y Doctor por la Universidad de A Coruña, certifica que la presente memoria, titulada «*Formin homology domain containing 3 (FHOD3) como nuevo gen causal de miocardiopatía hipertrófica*», ha sido desarrollada por Juan Pablo Ochoa bajo su dirección, para optar al grado de Doctor por la Universidad de A Coruña.

Se deja constancia de que esta tesis doctoral reúne las condiciones formales y científicas necesarias para su lectura y defensa públicas ante el tribunal que la Universidad de A Coruña nombre para tal efecto.

Para que conste a los efectos oportunos se procede a la firma de este documento a 3 de septiembre de dos mil veinte.



Dr. Lorenzo Monserrat Iglesias

DEDICATORIA

A mis padres, porque me dieron libertad, valores y un amor incondicional.

De ellos está hecha mi sustancia.

A Vanesa, porque en las noches mas oscuras siempre fuiste luz, y me enseñaste el camino.

Sin tí no sería lo que soy.

*Gracias quiero dar al divino Laberinto de los efectos y de las causas,
por la diversidad de las criaturas que forman este singular universo...*

Otro poema de los dones.

Jorge Luis Borges.

AGRADECIMIENTOS

Podríamos considerar a una tesis doctoral como la culminación de la vida académica, por lo que es lógico que cuando uno llega a esta parte eche la mirada hacia atrás para ver el camino recorrido. Este ha sido largo y sinuoso, y llegar hasta la meta no hubiese sido posible sin la presencia de cada una de las personas con las que tuve la suerte o la desgracia de encontrarme durante el viaje.

Algunas de ellas tendrán una mención especial en estas páginas, por considerarlos de especial relevancia, pero sabido es que cometeré más de una injusticia. Al final, terminamos siendo la sumatoria de las interacciones con miles de personas, y cada una ha aportado su granito de arena para que hoy esté aquí, directa o indirectamente. A todas les agradezco.

Creo que es muy difícil dividir la vida académica y laboral de la personal. Familia y amigos han sido soporte en mis frustraciones y problemas en mi carrera, y han aguantado estoicamente los desplantes que genera una profesión que absorbe tiempo y energía. Por el otro lado, muchos compañeros médicos y cardiólogos hoy son considerados como hermanos para mí, y han compartido mis penas y alegrías de la vida como si fueran de ellos. Jamás mis logros académicos van hacerle sombra a la satisfacción y el orgullo que genera que tanta gente se ponga contenta en forma genuina cuando me ha ido bien, en una profesión tan competitiva. Gracias a todos los que se alegraron, porque habla mucho mejor de ustedes que de mí.

Realicé mi primer residencia en Medicina Interna en el Hospital Tornú de Buenos Aires. Nunca más en toda mi carrera aprendí tanto de medicina como en mi primer año de residencia: se lo debo a mis compañeros, mis jefas de residentes y todos los médicos de planta. Merece una mención especial el Dr. Diego Brosio, no solo por su calidad como médico sino como persona. Alguna vez le prometí que jamás iba a olvidar lo que hizo por mi padre en un momento difícil de su enfermedad y le estaría eternamente agradecido. Hoy me toca plasmar en un papel aquellas palabras, para que perduren y mi promesa se vea cumplida.

No puedo dejar de agradecer a todas las personas que contribuyeron a mi formación como cardiólogo del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Fundación Favaloro. Sobre todo agradezco a aquellos que ponían el razonamiento médico por sobre cualquier prueba complementaria, y me inculcaron el pensamiento crítico. El Dr. Ernesto Duronto (hoy Jefe de Unidad Coronaria, y Docencia e Investigación), formador de residentes eterno, fue del que más aprendimos todos... por suerte el tiempo hizo que también cultiváramos una amistad y el amor por el buen vino. El Dr. Branco Maütner, que me permitió poder ejercer la docencia y la investigación formando residentes durante más de 3 años: le agradezco la confianza en mí persona y todo lo que me enseñó.

Pero si hay alguien que merece estar aquí es el Prof. Dr. Enrique Pablo Gurfinquel, Jefe de Cardiología. Si me decanté por seguir una carrera en la investigación, de la cual esta tesis es un corolario, no hay mayor responsable. Sus palabras aún resuenan en mí: «Usted sabe, Ochoa, que va a terminar siendo investigador, como yo?» No le creí, pero

tenía razón... como en tantas otras cosas. Un cáncer se lo llevó temprano y joven, pero sigue vivo en toda la gente que lo conoció. Esta tesis es para vos, Quique...

Ya más cercano en el tiempo, la oportunidad de estar trabajando en cardiopatías familiares y genética cardiovascular se las debo a dos personas.

El primero es el Dr. Adrián Fernandez, quien me metió en este mundo, y muy especialmente en el de la miocardiopatía hipertrófica. Con su perfil bajo y humildad se ha hecho un referente mundial en el tema. Coincidimos en Fundación casi por casualidad, y terminamos trabajando juntos. Siempre lo consideraré mi mentor.

El segundo, el Dr. Lorenzo Monserrat, me dio la oportunidad de venir a España a trabajar junto a él en cardiopatías familiares. Que el fuera el director de esta tesis doctoral es algo que me llena de orgullo. Gracias por abrirme las puertas de Health In Code para formarme, por confiar en mí y por dirigirme en esta parte de mi carrera. Siempre admiraré tu tenacidad, tu enorme capacidad de trabajo y que por sobre todo siempre has puesto lo académico, el conocimiento y el dar servicio a los pacientes por sobre cualquier otro tipo de interés. Creo que eres un gran responsable de que hoy por hoy estas enfermedades se pueden entender desde la genética.

A todo el personal de Health In Code, que a contribuido para que esta tesis doctoral fuese posible. Realizar estos estudios ha representado una sobrecarga para muchos de ellos. Al personal de soporte clínico, que han tenido que lidiar con más muestras y gestión de las mismas, con todo lo que implica. A las técnicas de laboratorio que han procesado las muestras; a las biólogas que me han ayudado a entender un poquito más a este gen; a los informáticos y bioinformáticos que hacen posible que podamos ver datos tan complejos de una manera amigable; a los correctores de inglés, que se ocuparon también de revisar los manuscritos para su publicación.

Y muy especialmente a mis compañeros cardiólogos, que directa o indirectamente, han permitido con su trabajo que esto salga adelante. A cada uno de ellos mi sincero agradecimiento, y mis respetos como colega.

Gracias a todos los profesionales de los diferentes centros (de España, Inglaterra, Dinamarca, Rusia e Irlanda) que han colaborado en este proyecto. Muy especialmente les quiero agradecer a todo el grupo de Cardiopatías Familiares del CHUAC, y en especial al Dr. Roberto Barriales, que me han permitido ser parte del equipo. Al Dr. Juan Ra Gimeno y todo el equipo de Murcia, que realizaron un trabajo fenomenal con la primer familia que detectamos con estas mutaciones.

Por supuesto, también a todos los pacientes que han donado generosamente su tiempo y sus muestras para que pudieran realizarse estos estudios.

Finalmente, nada de todo esto podría haber sido posible sin el apoyo de mi familia. Gracias a mis padres, porque yo simplemente soy una extensión de ellos; los valores que me han inculcado son el mejor legado que me podían dejar. Gracias por haber respetado cada una de mis decisiones en silencio, y apoyado siempre con un amor incondicional. A mis hermanos biológicos por estar siempre, perdonando a veces las distancias y los olvidos del mayor. A mis hermanos de la vida, que hacen innecesarias las palabras porque ya está todo dicho... Y por sobre todo, gracias Vane, por haber sido siempre incondicional, tolerando mis imperfecciones y haciéndome cada día mejor persona. Gracias por enseñarme que realmente el amor todo lo puede, y haberte convertido en la mejor compañera de viaje. Sin tu apoyo ni esto ni yo seríamos posibles...

RESUMEN

RESUMEN

Antecedentes: La causa genética de la miocardiopatía hipertrófica (MCH) permanece sin explicación en una gran proporción de los casos. El gen *FHOD3* podría tener un papel en la fisiopatología de la hipertrofia cardíaca.

Objetivos: Investigar la relación entre mutaciones en *FHOD3* y el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica.

Métodos: *FHOD3* fue secuenciado por NGS en probandos consecutivos no relacionados con MCH y pacientes sin evidencia de miocardiopatía (controles). Evaluamos los portadores con variantes candidatas en *FHOD3* para determinar la cosegregación en las familias, y las características clínicas de la enfermedad.

Resultados: Las variantes candidatas fueron significativamente más frecuentes en los pacientes con MCH que en los controles. Las mutaciones en *FHOD3* cosegregaron con MCH en más de 15 familias. Las variantes causales se agruparon fundamentalmente en dos regiones relevantes: el exón 12 y un dominio superenrollado (aminoácidos 622-655) en el exón 15. Los pacientes portadores fueron diagnosticados después de los 30 años y dos tercios eran hombres; el 82 % presentaba hipertrofia septal asimétrica. Los eventos fueron raros antes de los 30 años, con una incidencia anual de muerte cardiovascular del 1 % durante el seguimiento.

Conclusiones: *FHOD3* es un nuevo gen causal en MCH, representando aproximadamente el 1-2 % de los casos. El fenotipo y la tasa de eventos cardiovasculares son similares a los reportados en cohortes no seleccionadas de MCH. *FHOD3* debería incluirse de forma rutinaria en todos los paneles de pruebas genéticas para MCH.

ABSTRACT

Background: The genetic cause of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) remains unexplained in a substantial proportion of cases. *FHOD3* might have a role in the pathogenesis of cardiac hypertrophy.

Objectives: To investigate the relation between *FHOD3* mutations and the development of hypertrophic cardiomyopathy.

Methods: *FHOD3* was sequenced by NGS in HCM unrelated probands and patients with no evidence of cardiomyopathy (controls). We evaluated protein-altering candidate variants in *FHOD3* for cosegregation in families, clinical characteristics, and outcomes.

Results: The frequencies of rare candidate variants were significantly higher in patients with HCM than in controls. *FHOD3* mutations cosegregated with HCM in several families. Disease-causing variants were clustered in two relevant regions: the exon 12, and the conserved coiled-coil domain (amino-acids 622-655) in exon 15. Patients were diagnosed after age 30 years and two-thirds were males; 82 % had asymmetric septal hypertrophy. Events were rare before age 30, with an annual cardiovascular death incidence of 1 % during follow-up.

Conclusions: *FHOD3* is a novel disease gene in HCM, accounting for approximately 1-2 % of cases. The phenotype and the rate of cardiovascular events are similar to those reported in unselected cohorts. The *FHOD3* gene should be routinely included in hypertrophic cardiomyopathy genetic testing panels.

RESUMO

Antecedentes: A causa xenética da cardiomiopatía hipertrófica (CMH) segue sen ser explicada nunha gran parte dos casos. O *FHOD3* podería ter un papel na fisiopatoloxía da hipertrofia cardíaca.

Obxectivos: Investigar a relación entre as mutacións de *FHOD3* e o desenvolvemento de cardiomiopatía hipertrófica.

Métodos: A *FHOD3* foi secuenciada por NGS en probands non relacionados con CMH e pacientes sen probas de cardiomiopatía (controis). Avaliamos variantes de alteración de proteínas candidatas en *FHOD3* para a cosegregación en familias, características clínicas e resultados.

Resultados: As variantes dos candidatos foron significativamente máis frecuentes nos pacientes con CMH que nos controis. As mutacións en *FHOD3* agregáronse con CMH en moitas familias. As variantes causais agrupáronse en dúas rexións relevantes: o exón 12 e un dominio supercruzado (aminoácidos 622-655) no exón 15. Os pacientes foron diagnosticados despois dos 30 anos e dous terzos foron varóns. O 82 % tiña hipertrofia septal asimétrica. Os eventos eran raros antes dos 30 anos, cunha incidencia anual de morte cardiovascular do 1 % durante o seguimento.

Conclusións: *FHOD3* é un novo xene causal en CMH, que representa aproximadamente o 1-2 % dos casos. O fenotipo e a taxa de eventos cardiovasculares son similares aos reportados en cohortes non seleccionadas de CMH. O *FHOD3* debe incluírse habitualmente nos paneis de proba xenética de CMH.

PRÓLOGO

Este tesis doctoral que trata sobre un nuevo gen causal de miocardiopatía hipertrófica, *FHOD3*, es el fruto de años de trabajo arduo y duro que comenzaron mucho antes de que yo tuviese la suerte de llegar a este grupo de investigación. No hay a nivel mundial muchos grupos investigadores que hayan contribuido como este a entender las miocardiopatías y descubrir nuevos genes relevantes. En este sentido, este trabajo completa una trilogía que comenzó con la publicación sobre la asociación entre el gen *FLNC* (Filamina C) y la miocardiopatía dilatada arritmogénica [1], y finalizó con la publicación del trabajo sobre *TRIM63* (Tripartite Motif Containing 63), probablemente la causa principal de enfermedad de presentación autosómica recesiva en miocardiopatía hipertrófica [2].

Estos resultados hablan más de la manera de trabajar en Health In Code que del esfuerzo individual. Cada uno de los miembros del equipo, muchos de los que ya no están, han contribuido a esta fábrica y modelo de gestión del conocimiento. Tampoco sería lo que es sin la interacción que ha tenido con el Hospital y la Universidad, y el apoyo de un número muy grande de personas.

Hoy por hoy al menos un 50% de los estudios genéticos realizados en pacientes con miocardiopatía hipertrófica tiene un resultado negativo. Como se discutirá en esta tesis, los motivos pueden ser varios. En este estudio nos centramos en la posibilidad de que existan genes nuevos asociados con el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica. Conocer la causa de la enfermedad y así tener un diagnóstico etiológico permite un mejor manejo de la enfermedad en los probandos, pero sobre la posibilidad de brindar un mejor consejo genético a la familia y poder realizar el screening familiar.

La proteína *FHOD3* pertenece a los forminas, una serie de proteínas ubicuas que se caracterizan por su participación en la nucleación y regulación de los filamentos de actina. *FHOD3* se localiza exclusivamente a nivel del sarcómero cardíaco; debido a algún estudio que vinculaba al gen con la hipertrofia fisiológica de los miocitos ante la hipertensión lo consideramos un gen candidato mucho antes de que se probara la asociación del gen con el desarrollo de miocardiopatías. Esto fue posible debido a la revisión sistemática de la literatura, gente lo suficientemente formada para filtrar la información, y una base de datos que permita conservarla.

En esta obra hemos plasmado en una primera parte destinada a la introducción el estado actual del estudio genético en la miocardiopatía hipertrófica y el estado del arte con respecto los genes que contribuyen a la enfermedad, para terminar con la descripción del gen *FHOD3* y el motivo por el cual lo considerábamos un buen candidato para el desarrollo de este fenotipo. Esta introducción servirá para presentar posteriormente los objetivos e hipótesis que se plantearon para el desarrollo de los estudios que se realizaron en la tesis doctoral.

En el primero de ellos, lo que buscamos fue probar la asociación causal entre las mutaciones en el gen *FHOD3* y el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica. Se trata de un estudio de largo plazo, multicéntrico, en el que participaron más de 25 centros, y se evaluaron genéticamente a casi 8,000 individuos, para luego evaluar a las familias de los

mismos en busca de familiares portadores para poder demostrar la cosegregación con la enfermedad y una relación causa-efecto.

También se realizó la pesquisa de las características clínicas de estos pacientes, buscando dar detalles sobre el pronóstico y la presentación clínica en los portadores, como la penetrancia y la expresividad.

En el segundo trabajo, luego de haber demostrado que el gen *FHOD3* es una base genética para el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica, decidimos investigar la posible contribución de las alteraciones en el número de copias en el gen (grandes deleciones o duplicaciones) al fenotipo de miocardiopatía hipertrófica. Encontramos una asociación entre determinadas deleciones de exones específicos *FHOD3* y el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica.

Estos exones eran donde se localizaron la gran mayoría de las variantes patogénicas del primer estudio, lo que pone de relevancia estas regiones y dará lugar a un gran número de hipótesis funcionales a explorar en futuros trabajos.

En cada uno de los estudios se presenta la metodología utilizada de forma detallada, y seguidamente se describen los resultados de las diferentes investigaciones para dar paso a la discusión de los mismos con un enfoque integrador.

Finalizaremos con las conclusiones que se establecieron como respuesta a las hipótesis surgidas tras el planteamiento de las preguntas de la investigación, y una conclusión final que expone los mensajes principales de nuestra investigación como un todo.

Finalmente, una reflexión final: este trabajo es el fruto de la colaboración que se ha creado entre todos los grupos de cardiopatías familiares en España, como bien lo remarcaba el Dr. Valentín Fuster en la editorial del artículo de *FHOD3* publicado en JACC. Esta tesis doctoral es un claro ejemplo de esta filosofía.

ÍNDICE GENERAL

I ESTADO DEL ARTE

1	LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA COMO PARADIGMA DE ENFERMEDAD CARDÍACA HEREDITARIA	29
1.1	La miocardiopatía hipertrófica dentro de las miocardiopatías	29
1.2	Conceptos de genética en miocardiopatías	31
1.2.1	Patrones de herencia	31
1.2.2	Penetrancia y expresividad.	31
1.2.3	Heterogeneidad genética y fenotípica	33
1.3	Manejo de la enfermedad: utilidad de la genética	35
2	GENÉTICA DE LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA	41
2.1	Etiología molecular de la miocardiopatía hipertrófica	43
2.1.1	Mutaciones en genes sarcoméricos	43
	Mutaciones en genes del filamento grueso	43
	Mutaciones en genes del filamento fino	45
2.1.2	Genes estructurales y reguladores que han demostrado una asociación con el desarrollo de MCH	46
	Genes que codifican para proteínas del disco Z	47
	Genes que regulan el metabolismo del Calcio	48
	Filamentos intermedios	48
2.1.3	Fenocopias	48
	Enfermedades de depósito y metabólicas	48
	MCH por mutaciones en genes de la vía de señalización RAS-MAP quinasa (RASopatías)	49
2.2	Rentabilidad del estudio genético en la MCH:	50
2.3	Estudios genéticos negativos y direcciones futuras	52
2.3.1	Herencia no Mendeliana	52
2.3.2	Nuevos genes asociados con la enfermedad	53
2.3.3	Variantes intrónicas profundas	53
2.3.4	Grandes deleciones o duplicaciones	54
3	FHOD3 COMO CANDIDATO PARA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA	57
3.1	Las forminas y su función: la polimerización de la actina	57
3.2	FHOD3 y su importancia en el sarcómero cardíaco	61
3.3	FHOD3 y su potencial participación dentro de las miocardiopatías	65
3.3.1	Miocardiopatía Hipertrófica	65
3.3.2	Miocardiopatía dilatada	65

II ESTUDIOS REALIZADOS

4	FHOD3 ES UN NUEVO GEN CAUSAL DE MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA	69
4.1	Hipótesis y objetivos	69
4.1.1	Hipótesis	69
4.1.2	Objetivos	69

4.2	Metodología	70
4.2.1	Diseño y población del estudio	70
	Fase II de cosegregación y recopilación de datos clínicos	72
4.2.2	Estudios genéticos, filtrado de variantes y clasificación de variantes	73
4.2.3	Métodos estadísticos utilizados	76
4.3	Resultados	77
4.3.1	Variantes candidatas en el gen <i>FHOD3</i> identificadas	77
4.3.2	Enriquecimiento de las variantes candidatas en <i>FHOD3</i> en MCH	82
4.3.3	Evaluación de cosegregación familiar de las variantes candidatas - descripción de las familias	85
4.3.4	Variante p.Tyr528Ser	88
4.3.5	Variante p.Ser527del	94
4.3.6	Variantes localizadas a nivel de la hélice superenrollada de los residuos 622-655	102
4.3.7	Portadores de variantes en otras regiones del gen consideradas posiblemente causales luego de que se evaluara la cosegregación familiar	109
4.3.8	Otras variantes que fueron evaluadas, y cuya cosegregación fue incierta o poco probable	114
4.3.9	Cosegregación de las variantes con el fenotipo: LODs combinado	118
4.3.10	Características clínicas de los portadores de variantes causales de MCH en <i>FHOD3</i>	124
	Eventos	127
4.4	Discusión	129
4.4.1	Limitaciones	132
4.4.2	Perspectivas futuras	132
4.5	Conclusiones	134
5	DELECCIONES DE EXONES ESPECÍFICOS DE <i>FHOD3</i> SE ASOCIAN A MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA	135
5.1	Hipótesis y objetivos	135
5.1.1	Hipótesis:	135
5.1.2	Objetivos	135
5.2	Metodología	136
5.2.1	Pacientes	136
5.2.2	Secuenciación y análisis de variaciones en el número de copias (CNVs)	136
5.3	Resultados	138
5.3.1	Descripción detallada de las familias y características de las deleciones	139
	Familia A	139
	Familia B	142
	Familia C	144
5.4	Discusión	146
5.5	Conclusiones	149

III CONCLUSIONES

- 6 CONCLUSIONES 153
 - 6.1 Conclusiones finales 153
 - 6.2 Final conclusions 154

Bibliografía

Apéndice

- APÉNDICE A: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO 171
- APÉNDICE B: OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS EN COLABORACIÓN DURANTE ESTA TESIS 195
- APÉNDICE C: CENTROS Y COLABORADORES QUE PARTICIPARON DE LOS ESTUDIOS 197
- APÉNDICE D: NOMENCLATURA DE LOS GENES INCLUIDOS EN LA LIBRERÍA 199

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Clasificación de las miocardiopatías	29
Figura 1.2	Penetrancia y expresividad	32
Figura 1.3	Heterogeneidad genética y fenotípica	34
Figura 1.4	Algoritmo para el manejo de los pacientes y familiares con MCH	36
Figura 1.5	Pronóstico en diferentes mutaciones de <i>MYH7</i>	38
Figura 2.1	Costos de secuenciación	42
Figura 2.2	Esquema del sarcómero cardíaco	44
Figura 2.3	Disco Z del sarcómero y filamentos intermedios	47
Figura 2.4	Resultado del estudio genético en el registro SHARE	51
Figura 3.1	Forminas y su presencia ubicua en la naturaleza	57
Figura 3.2	Dinámica de la actina	58
Figura 3.3	Forminas y nucleación de la actina	60
Figura 3.4	Isoforma cardíaca larga de FHOD ₃	62
Figura 3.5	Localización en la zona C de FHOD ₃	63
Figura 4.1	Fase I del estudio	71
Figura 4.2	Variantes candidatas identificadas en FHOD ₃ .	83
Figura 4.3	Diagrama de flujo general del estudio	86
Figura 4.4	Familia multigeneracional portadora de la variante p.Tyr528Ser	91
Figura 4.5	Familia H4243 portadora de la variante p.Tyr528Ser	92
Figura 4.6	Familia H2858 portadora de la variante p.Ser527del	94
Figura 4.7	Familia H2768 portadora de la variante p.Ser527del	96
Figura 4.8	Familia H7217 portadora de la variante p.Ser527del	97
Figura 4.9	Familia H3868 portadora de la variante p.Ser527del	99
Figura 4.10	Familia H3504 portadora de la variante p.Ser527del	100
Figura 4.11	Hélice superenrollada (coil-coiled)	102
Figura 4.12	Familia H6957 portadora de la variante p.Arg637Pro	103
Figura 4.13	Familia H8206 portadora de la variante p.Arg637Gly	104
Figura 4.14	Familia H5666 portadora de la variante p.Arg641Ser	106
Figura 4.15	Localización de las variantes identificadas en el presente estudio en la proteína FHOD ₃	120
Figura 4.16	Edad al diagnóstico de MCH	126
Figura 4.17	Muerte cardiovascular desde el nacimiento	127
Figura 4.18	Muerte cardiovascular desde el diagnóstico de MCH (seguimiento)	128
Figura 4.19	Organización molecular de la proteína FHOD ₃ y dominios relevantes	131
Figura 4.20	Resumen general del estudio y conclusiones	133
Figura 5.1	Pedigree de la familia A	139
Figura 5.3	Región genómica donde se localizan las deleciones	140
Figura 5.2	Detalle de la deleción identificada en la familia A	141
Figura 5.4	Pedigree de la familia B	142
Figura 5.5	Detalle de la deleción identificada en la familia B	143

Figura 5.6	Pedigree de la familia C	144
Figura 5.7	Detalle de la deleción identificada en la familia C	145
Figura 5.8	Esquema de las deleciones a nivel de la proteína FHOD3	147

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 4.1	Clasificación de las variantes genéticas	74
Cuadro 4.2	Variantes candidatas en <i>FHOD3</i> (fase I del estudio)	78
Cuadro 4.3	Frecuencia de variantes candidatas en probandos con MCH y en controles	82
Cuadro 4.4	Probandos excluidos del estudio	84
Cuadro 4.30	Calculo del LODs combinado de las variantes causales	118
Cuadro 4.31	Clasificación final de las variantes	121
Cuadro 4.32	Características clínicas de los portadores	124
Cuadro 5.1	Nomenclatura de las CNVs detectadas en el estudio	138

NOMENCLATURA

ACMG	american college of medical genetics
ACTC ₁	actina cardíaca
ACV	accidente cerebro vascular
AD	autosómica dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	aurícula izquierda
AR	autosómica recesiva
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato (trifosfato de adenosina)
BAG ₃	BCL2 Associated Athanogene 3
CGH	hibridación genómica comparativa
CK ₂	proteína caseín-quinasa 2
CNVs	variaciones en el número de copias
CSRP ₃	proteína lim muscular
DAD	dominio autoregulatorio de tipo diáfano
DDVI	diámetro diastólico del ventrículo izquierdo
DE	desvío standard
DES	desmina
DID	dominio inhibitorio de tipo diáfano
DMD	distrofina
DRF	Forminas relacionadas de tipo diáfanas; diaphanous related-formins
ESC	Sociedad Europea de Cardiología (European Society of Cardiology)
EWAS	exome-wide association study
FA	fibrilación auricular
FEVI	fracción de eyección del ventrículo izquierdo
FH ₁	dominio homólogo de forminas 1; formin homology domain 1

FH2 dominio homólogo de forminas 2; formin homology domain 2

FHOD3 formin homology domain containing 3

GBD Dominio de unión a la proteína RhoGTPasa; RhoGTPase-binding domain

GLA alfa-galactosidasa

GWAS genome wide association study

HSA hipertrofia septal asimétrica

IC95 % intervalo de confianza 95 %

ICC insuficiencia cardíaca congestiva

INDELS inserciones/deleciones

JPH2 juntofilina

Kb kilobases

LAMP2 proteína asociada a la membrana lisosomal 2

LOD logaritmo de probabilidades; logarithm of the odds

MAF frecuencia de alelo menor; minor allele frequency

MAS movimiento anterior sistólico de la válvula mitral

MCA miocardiopatía arritmogénica

MCD miocardiopatía dilatada

MCH miocardiopatía hipertrófica

MCNC miocardiopatía no compactada

MCP marcapasos

MCR miocardiopatía restrictiva

MLPA multiplex ligation-dependent probe amplification

MS muerte súbita

MSC muerte súbita cardíaca

MYBPC3 proteína C ligadora de miosina (myosin binding protein C)

MYH6 alfa miosina; cadena pesada de miosina 6

MYH7 cadena pesada de miosina cardíaca; beta-miosina

MYL2 cadena liviana de miosina reguladora

MYL3 cadena liviana de miosina esencial

MYOZ2 miozenina

NGS next generation sequencing

NHEJ unión de extremos de ADN no homólogos; «non-homology extreme join»

OR odds ratio

OTSVI obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo

pb pares de bases

PLN fosfolamban

PP pared posterior

PRKAG2 proteinquinasa AMP-activada, subunidad no catalítica gamma 2

RAF1 Raf1 proto-oncogen, serina/treonina quinasa

RBM20 RNA Binding Motif Protein 20

ROCK1 Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1

SIV septum interventricular

SNPs polimorfismos de nucleotido único

SNVs variantes de cambio de nucleótido único

TCAP telotonina

TNNC1 troponina C cardíaca (de unión al calcio)

TNNI3 tropinina I cardíaca

TNNT2 troponina T cardíaca

TPM1 tropomiosina 1

TTN titina

TTR transtiretina

TVNS taquicardia ventricular no sostenida

UTR regiones no traducidas; untranslated regions

VCL vinculina

VI ventrículo izquierdo

Parte I

ESTADO DEL ARTE

LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA COMO PARADIGMA DE ENFERMEDAD CARDÍACA HEREDITARIA

1.1 LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA DENTRO DE LAS MIOCARDIOPATÍAS

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) es una enfermedad primaria del músculo cardíaco caracterizada por la presencia de hipertrofia miocárdica en ausencia de una causa aparente que la explique (hipertensión, valvulopatías, obesidad severa, práctica deportiva, u otras). Es una enfermedad relativamente frecuente, con una prevalencia estimada de aproximadamente 1:500 personas adultas en la mayoría de las poblaciones poblaciones estudiadas [3].

Se encuentra encuadrada dentro del grupo de las miocardiopatías, un grupo de enfermedades hereditarias que afectan predominantemente al músculo cardíaco. Siguiendo la recomendación del grupo de trabajo de enfermedades del miocardio y del pericardio de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC), todas las miocardiopatías pueden ser divididas en genéticas (familiares) y no genéticas (no familiares o esporádicas) (figura 1.1) [4].

No se considera que el diagnóstico de MCH sea sinónimo a determinadas etiologías moleculares. Por ello, se incluyen en este diagnóstico pacientes con hipertrofia debida a trastornos como la amiloidosis, que puede tener tanto causas genéticas como adquiridas. De todos modos, en la mayor parte de los casos, la MCH es una enfermedad de origen genético y habitualmente se la considera como un paradigma de enfermedad monogénica [5].

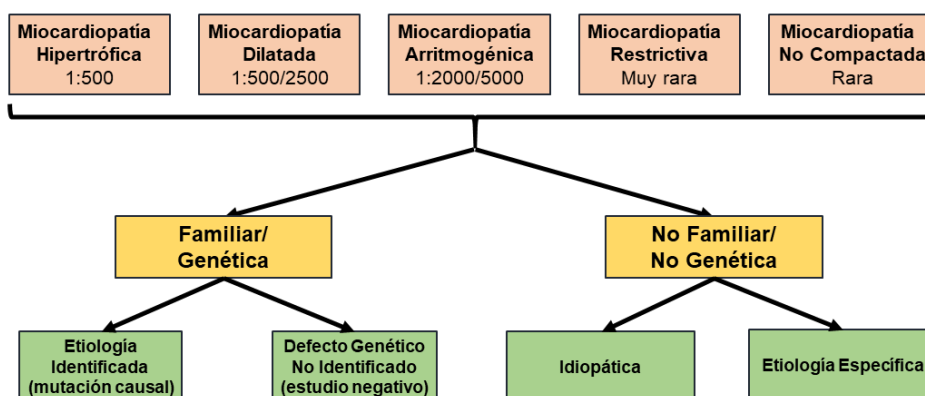


Figura 1.1: Clasificación de las miocardiopatías de acuerdo al consenso del grupo Europeo. Adaptado de Elliott PM. y colaboradores. [4]

La MCH es una de las principales causas de muerte súbita (MS) en jóvenes y deportistas, y una causa relevante -aunque no la principal- en individuos de otras edades. Afortunadamente la muerte súbita afecta sólo a un pequeño porcentaje de los pacientes

con la enfermedad, con una incidencia anual estimada en poblaciones no seleccionadas de entre el 0.5 y el 1 % [6].

El diagnóstico precoz y la identificación de los pacientes con riesgo de muerte súbita es uno de los principales aspectos en el manejo de la enfermedad. Se han descrito múltiples factores clínicos de riesgo de muerte súbita y se ha propuesto la utilización de fórmulas que permite realizar una estimación cuantitativa del riesgo de muerte súbita a partir de un subgrupo de estos factores [7].

Una de las principales limitaciones de estos scores es que no tienen en cuenta la heterogeneidad en la etiología de la enfermedad. En este sentido, los estudios genéticos deben permitir avanzar en una mejor estimación de riesgos a partir del conocimiento de la historia natural asociada a diferentes genes, regiones funcionales y mutaciones individuales [8].

1.2 CONCEPTOS DE GENÉTICA EN MIOCARDIOPATÍAS

1.2.1 *Patrones de herencia*

En general, nos referiremos a las formas monogénicas de enfermedad. Es decir, aquellas que siguen los patrones de herencia Mendelianos y las mutaciones en un solo gen son suficientes para que el fenotipo se exprese. Solo mencionaremos que también existen enfermedades que son poligénicas, o sea producidas por la sumatoria de variantes en diferentes genes (un ejemplo clásico son algunos tipos de dislipemias). Aunque esto no ha sido estudiado en detalle en la MCH, es posible que las causas poligénicas puedan explicar un porcentaje de los casos en los que no se detecta una causa monogénica de la enfermedad.

En miocardiopatías el patrón de herencia más frecuente es el de tipo autosómico dominante (AD). Es decir, la mutación causal se encontrará en una de las dos copias que tenemos de cada gen (heterocigosis), y su sola presencia será suficiente para que el fenotipo se exprese [9]. De todas maneras, es importante conocer que existen genes muy relevantes asociados a miocardiopatías cuya forma de transmisión puede ser ligada a X (como la enfermedad de Fabry o de Danon), autosómica recesiva (AR) como en algunas enfermedades de depósito como la enfermedad de Pompe, e incluso matrilineal en donde solo las mujeres son las que transmiten las mutaciones (como en el caso de las enfermedades causadas por mutaciones en genes localizados en el ADN mitocondrial).

1.2.2 *Penetrancia y expresividad.*

La penetrancia es la proporción de individuos portadores de una variante genética determinada que desarrolla el fenotipo. Por el otro lado, la expresividad es el grado de expresión morfológica (severidad, características clínicas) de ese fenotipo. Es una línea continua que va desde las manifestaciones leves (por ejemplo, mínimas manifestaciones electrocardiográficas) a las severas, y a las diferentes formas de presentación que puede tener el fenotipo [10].

En las miocardiopatías la penetrancia y expresividad son variables (figura 1.2), y dependen de varios factores, de los cuales el más importante es la edad. Las miocardiopatías no suelen tener manifestación clínica desde el nacimiento (existen excepciones, como algunas enfermedades recesivas o mutaciones puntuales de muy mal pronóstico). En líneas generales suelen manifestarse a partir de la adolescencia e ir aumentando su incidencia según pasan los años, aunque esto es muy variable y depende de cada miocardiopatía, y de la mutación en particular (por ejemplo, las mutaciones de peor pronóstico o asociadas a fenotipos muy severos suelen comenzar más precozmente).

Cuando hablamos de la penetrancia de una mutación determinada, debemos hacer referencia a la edad: una penetrancia del 60% a los 50 años significa que a esa edad un 40% de todos los portadores aún no habrán expresado clínicamente el fenotipo. Es frecuente que algunas mutaciones puedan tener una penetrancia incompleta hasta edades avanzadas (>75 años), lo que implica que no todos los portadores necesariamente expresarán el fenotipo en el transcurso de la vida.

La expresividad de las mutaciones también es variable. Esto se pone de manifiesto incluso en miembros de una misma familia, en donde la expresión a una misma edad

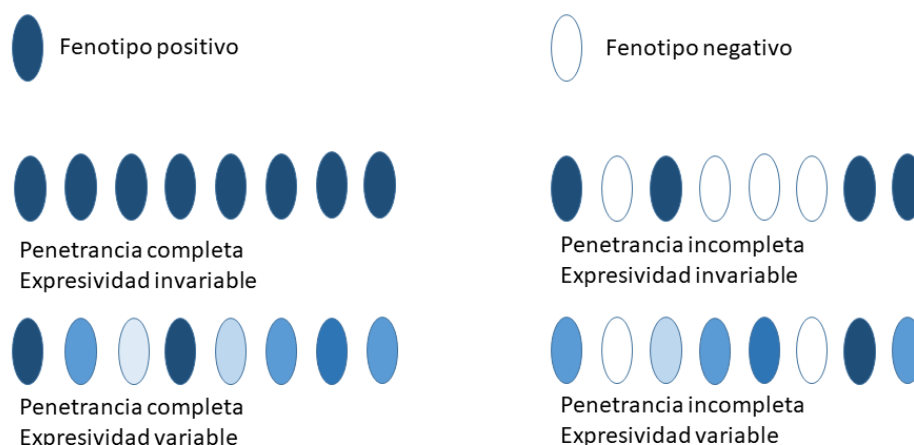


Figura 1.2: Penetrancia y expresividad en las miocardiopatías genéticas.

A. Penetrancia completa y expresividad invariable: Todos los individuos portadores desarrollan la enfermedad, no variando la expresión clínica de la misma. Esto es muy infrecuente dentro de las miocardiopatías, ya que siempre suele existir algún grado de variabilidad en la forma de presentación en los portadores.

B. Penetrancia incompleta y expresividad invariable: Solo alguno de los portadores desarrollan la enfermedad, sin existir ningún grado de variabilidad clínica en aquellos que la desarrollan. Este tipo de fenómeno de “todo o nada” no se observa prácticamente en ninguna de las miocardiopatías.

C. Penetrancia completa y expresividad variable: Este patrón puede observarse dentro de las miocardiopatías en mutaciones asociadas a fenotipos severos, en donde todos los portadores desarrollan la enfermedad, aunque existiendo variaciones en la expresión clínica. También algunas de las enfermedades ligadas a X y recesivas tiene este patrón de comportamiento.

D. Penetrancia incompleta y expresividad variable: Este es el patrón más frecuentemente observado en las miocardiopatías. Por ejemplo, la causa genética más frecuente de miocardiopatía hipertrófica son las mutaciones en *MYBPC3*: la penetrancia puede ser incompleta hasta edades avanzadas (más frecuente en mujeres), y la expresividad clínica es variable incluso en miembros de una misma familia.

puede ser diferente: algunos desarrollarán un fenotipo más severo, y otros más solapado; incluso algunos pueden tener expresión fenotípica diferente: miocardiopatía hipertrófica en un miembro, y no compactada (MCNC) en otro, por ejemplo [11]. La expresión fenotípica está modulada o influenciada por factores genéticos (presencia de otras mutaciones, variantes que pueden modular la enfermedad, regulación de la transcripción, etc.) y no genéticos [12].

En líneas generales las mujeres desarrollan la enfermedad en forma más tardía y suelen tener un pronóstico más favorable que los hombres. Dentro de los factores ambientales, el ejercicio físico (tipo, intensidad, y frecuencia semanal) debe ser siempre tenido en cuenta; en algunas de las miocardiopatías, como por ejemplo la miocardiopatía arritmogénica (MCA), este factor cobra especial relevancia [13].

1.2.3 Heterogeneidad genética y fenotípica

Una de las características de estas enfermedades es la gran heterogeneidad. Nos encontramos con que mutaciones en un mismo gen pueden producir fenotipos diferentes (heterogeneidad fenotípica), mientras que un determinado fenotipo es producido por mutaciones en múltiples genes (heterogeneidad genética) (figura 1.3).

Se puede observar como mutaciones en los genes sarcoméricos principales pueden asociarse tanto a miocardiopatía hipertrófica (MCH), dilatada (MCD) o restrictiva (MCR), aunque cada uno tiene su característica particular. Por ejemplo, las mutaciones en *MYBPC3* solo excepcionalmente se presentan como MCD o MCR a menos que existan otros factores adicionales.

Por el contrario, a pesar de que la MCH es el fenotipo predominante en mutaciones en los genes *MYH7* (cadena pesada de miosina; beta miosina) y *TNNI3* (troponina I cardíaca), algunas mutaciones particulares en los mismos se asocian específicamente a MCD o MCR en heterocigosis simple.

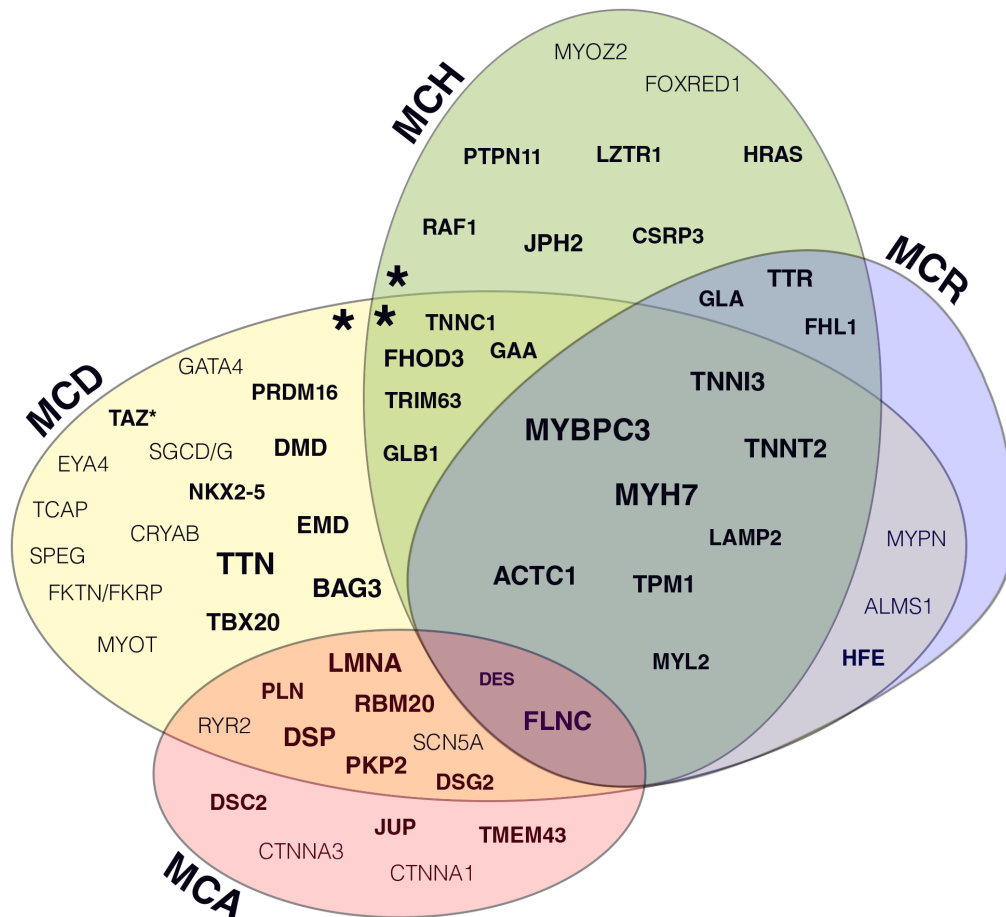


Figura 1.3: Diagrama que muestra la superposición existente entre los genes que han sido asociados a diferentes miocardiopatías. Como puede observarse un fenotipo determinado puede ser producido por varios genes, mientras que mutaciones en un mismo gen pueden producir fenotipos diferentes.

Se representan en negrita los genes principales, y en un tamaño mayor aquellos más prevalentes. Los asteriscos hacen referencia a enfermedades recesivas de depósito, o que afectan componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, y que pueden tener como manifestaciones la MCH y/o MCD.

1.3 MANEJO DE LA ENFERMEDAD: UTILIDAD DE LA GENÉTICA

Las distintas guías de práctica clínica internacionales han posicionado al estudio genético como una recomendación clase I para la miocardiopatía hipertrófica [14, 3]. En consecuencia, la indicación de un estudio genético se encuentra justificada en cualquier paciente con un diagnóstico clínico confirmado.

Sin embargo, la utilidad de realizar un estudio genético va más allá. Estas son algunas de las ventajas potenciales de realizar un estudio genético:

1. *Diagnóstico etiológico.* La identificación de una mutación causal es la que confirma el diagnóstico etiológico de la enfermedad. Incluso, en algunas enfermedades como la miocardiopatía arritmogénica, la presencia de una mutación forma parte de los criterios diagnósticos. Un fenotipo particular es la vía final común, pero a nivel molecular puede tener etiologías muy diversas: el cuadro clínico y el pronóstico están determinados genéticamente y no es igual a pesar de que todas puedan expresar un fenotipo relativamente similar.
2. *Manejo de las familias (screening genético familiar).* Esta es la mayor ventaja de realizar un estudio genético. Parte de la base de que, tras detectar la mutación causal de la enfermedad en la familia, podemos realizar un test predictivo a otros familiares que se encuentran en un estadio pre-sintomático (todavía no han desarrollado la enfermedad), o que presentan signos incipientes (figura 1.4) [15].

La realización del estudio genético de la variante nos dividirá a los otros miembros de la familia en:

- a) *Familiares portadores:* son los individuos que se encuentran en riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro (portadores en riesgo), y los que debemos seguir clínicamente en el futuro. Cuanto más sepamos de la variante genética en cuestión, más podremos predecir acerca del probable curso clínico de la enfermedad (edad de presentación, severidad, características clínicas, eventos, comportamiento en hombres versus mujeres, etc.), y anticiparnos a las posibles complicaciones.
 - b) *Familiares no portadores:* en estos individuos la causa genética de la enfermedad en la familia se encuentra ausente, pudiéndose interrumpir el seguimiento clínico en relación con la patología que se está estudiando.
3. *Costo-efectividad.* El estudio genético en los familiares es más barato que en el caso índice, ya que no debemos realizar un panel completo de genes porque iremos a buscar específicamente la variante causal. Podemos considerar el estudio del caso índice (más caro) como una inversión para el futuro, ya que tendrá implicaciones en toda su familia. Al sistema de salud se beneficiará de que los recursos se focalicen en los portadores (genotipo positivo) en riesgo, y podremos dar de alta a los no portadores (genotipo negativo).

Si solo utilizáramos una estrategia de screening clínico en los familiares, sin utilizar el estudio genético, todos los familiares deberían tener revisiones periódicas desde etapas precoces de la vida, habitualmente desde la infancia, y repetirse hasta avanzada la edad adulta (60-65 años de edad). Debemos recordar que cada familiar de primer grado tendrá solo un 50 % de posibilidades de ser portador de la variante

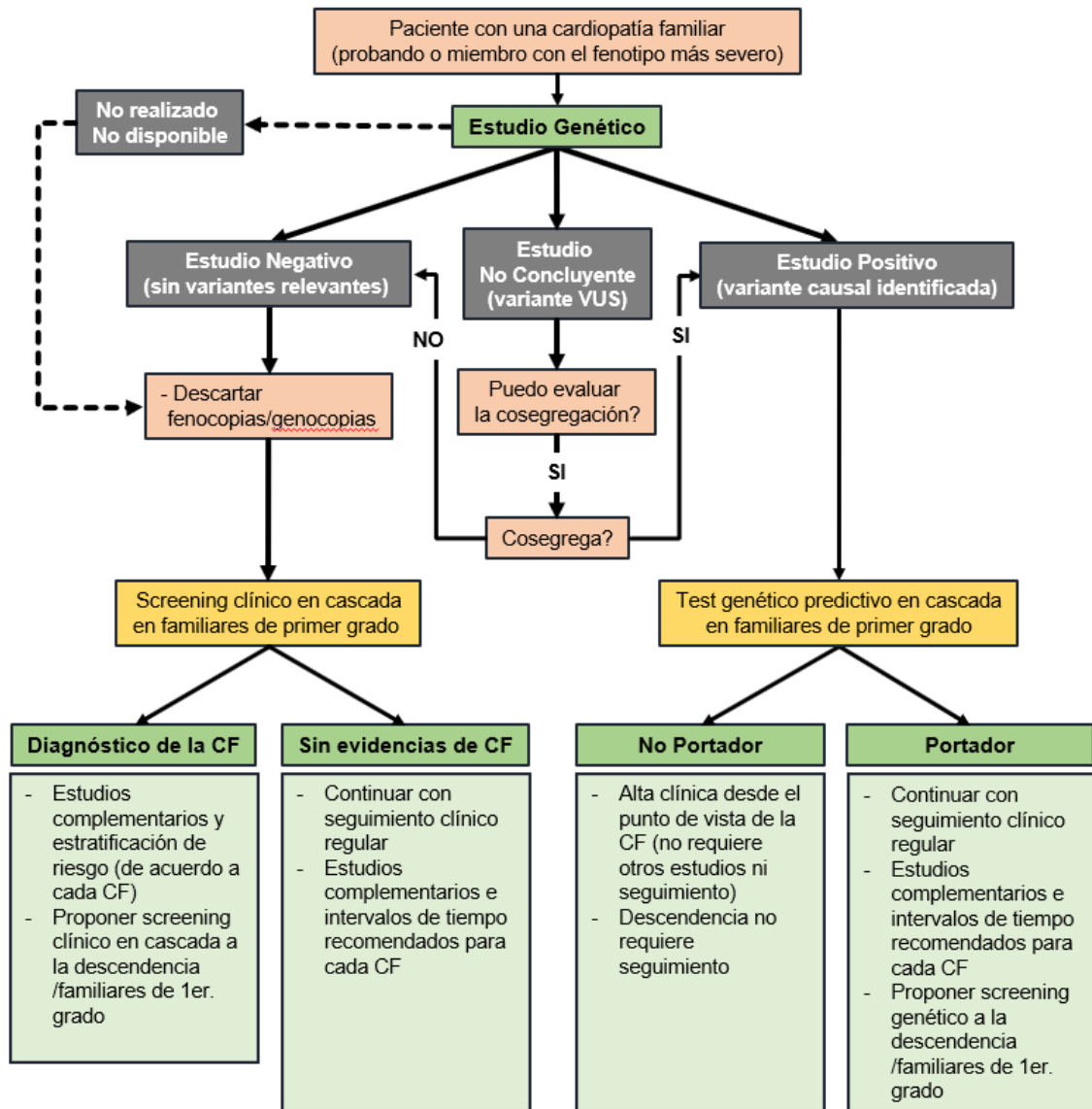


Figura 1.4: Algoritmo diagnóstico y del manejo de los pacientes y familiares tras la realización de un estudio genético en un probando con diagnóstico de una cardiopatía familiar. Adaptado de Charron y colaboradores[16].

que causa la enfermedad, lo que implica que con esta estrategia la mitad de los individuos que seguiremos durante toda su vida no desarrollarán la enfermedad (es más, nunca estuvieron en riesgo de desarrollarla). Por el contrario, utilizar una estrategia basada en el screening genético en cascada ha probado ser más costo-efectiva que utilizar únicamente la estrategia de screening clínico en cascada [17].

4. *Información pronóstica.* La MCH es clínica y genéticamente heterogénea. La estratificación pronóstica es una parte esencial de la evaluación de este grupo de pacientes. No existen dudas de que uno de los valores agregados de la genética es la posibilidad de brindar información pronóstica. A medida que vamos avanzando en la comprensión de las enfermedades cardíacas hereditarias y más información se reúne acerca de las mutaciones causales, mayores son los casos en que es posible establecer un pronóstico con un margen de seguridad razonable.
Las primeras descripciones comenzaron con la MCH. En un primer momento se comenzó a analizar el pronóstico de todas las mutaciones patogénicas en un gen determinado contra otro en particular [18]. A medida que fuimos profundizando, nos hemos dado cuenta que no siempre el comportamiento de las mismas es homogéneo en cada gen. Por ejemplo, los truncamientos en *MYBPC3*, que son las mutaciones causales más frecuentemente identificadas en MCH, siguen un comportamiento más o menos homogéneo [19]. Por el contrario, no todas las mutaciones en *MYH7* (el segundo gen más frecuentemente asociado con MCH) en donde hay cambio de un aminoácido por otro tienen el mismo pronóstico dependiendo de la región del gen en donde están ubicadas. Si profundizamos aún más en el análisis, incluso dentro de estas regiones de “mal pronóstico” (como la región conversora o algunas regiones de unión al ATP en *MYH7*) hay mutaciones particulares que tienen un pronóstico diferente que el resto (figura 1.5) [20]. Esta particularidad se repite en algunos de los genes sarcoméricos principales, como *TNNT2* (troponina T cardíaca) y *TNNI3* [21].
5. *Tratamiento específico.* Existe un subgrupo de enfermedades (fenocopias) asociadas con el desarrollo de MCH que tienen tratamiento específico. En la enfermedad de Fabry, el aporte parenteral de análogos de la enzima defectuosa ha demostrado frenar la evolución y disminuir el daño de órgano blanco (fundamentalmente renal y cardíaco).
En el caso de la amiloidosis cardíaca (en su variedad por depósito de transtiretina se incluye una forma hereditaria por mutaciones en el gen *TTR* que codifica esta proteína) la terapia con tafamidis (un estabilizador específico del tetrámero de transtiretina) produce una disminución en la mortalidad cardiovascular y hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca [23]. Este es el primero de varios fármacos que estarán disponibles en el futuro para el tratamiento de esta enfermedad.
6. *Consejo genético:* El asesoramiento genético comprende el proceso de explicar las consecuencias y naturaleza de la enfermedad, las probabilidades de desarrollarla y transmitirla, y las opciones de tratamiento y planificación familiar para las parejas con deseo de futura descendencia. Como hemos observado, cuanto mayor información dispongamos acerca de las características clínicas de la enfermedad, con más certeza podremos brindar un asesoramiento adecuado.

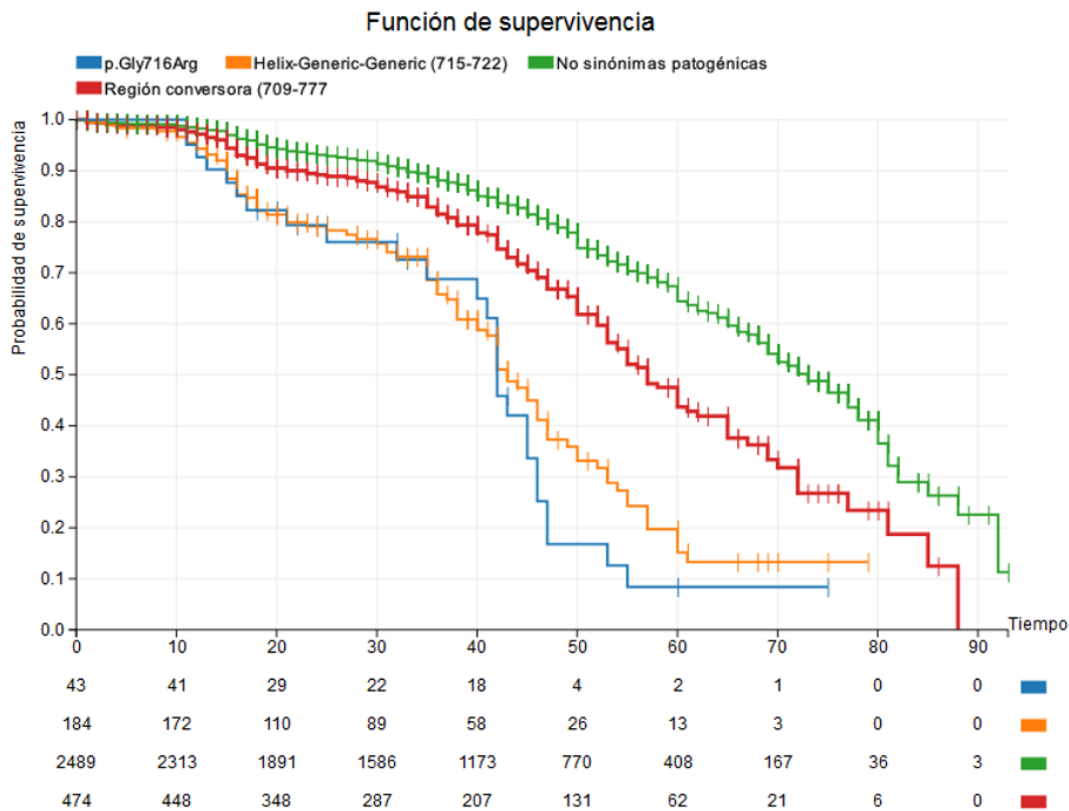


Figura 1.5: Curva de supervivencia libre de muerte cardiovascular (muerte súbita, descarga apropiada de desfibrilador, muerte por fallo cardíaco o trasplante, y muerte de otra causa cardiovascular) en portadores de variantes no sinónimas patogénicas en el gen *MYH7* (en verde), en la región conversora de *MYH7* (residuos 709-777; rojo), y en la hélice localizada en la región conversora (residuos 715-722; naranja).

Se puede observar una diferencia significativa en términos de muerte cardiovascular entre las tres regiones ($p < 0.001$), con una supervivencia libre de muerte cardiovascular a los 50 años de 80%, 60%, y 30-35% en cada uno de los grupos, respectivamente. Hemos agregado una variante en particular de mal pronóstico (p.Gly716Arg, en azul) mostrando como el número de muertes cardiovasculares en el seguimiento podría ser mayor que el del total de variantes localizadas en la hélice.

Adaptado de Monserrat L.[22].

Aunque no es imprescindible realizar un estudio genético para brindar el consejo genético (por ejemplo, a cualquier paciente con MCH se le puede decir que en general el riesgo de que se transmita a su descendencia la enfermedad es del 50 %, por lo que deberemos seguir a sus hijos clínicamente), cuanta más información tengamos acerca de la causa de la enfermedad, más certera será la información que le podamos brindar a nuestros pacientes. Y esto solo puede lograrse conociendo exactamente la causa etiológica mediante el diagnóstico genético.

GENÉTICA DE LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

El conocimiento en el campo de la genética avanza a pasos agigantados, y muy especialmente en las enfermedades humanas. Haciendo un poco de historia se puede observar como los avances se dan cada vez se dan más rápido y en un menor tiempo.

- Mendel publicaba sus investigaciones con guisantes en 1866, dando inicio a la genética Mendeliana, aquella de la herencia dominante y recesiva [24].
- Tuvieron que pasar casi 100 años, hasta 1953, cuando Watson y Crick descubren la estructura de doble hebra del ADN, dando nacimiento a la genética molecular [25].
- Unos 25 años más tarde, a fines de los 70 se empezaba a secuenciar mediante método Sanger [26], dando inicio a la secuenciación a gran escala.
- Recién en el año 2003 el proyecto “Genoma Humano” logró completar la secuenciación de todo el genoma humano, luego de 13 años de colaboración entre varios países, y casi 3.000 millones de dólares de inversión.

La historia de la genética de la miocardiopatía hipertrófica no es demasiado diferente. A pesar de que se la reconoce desde hace unos 50 años como una entidad hereditaria y familiar, no fue hasta el año 1989 en que se pudo localizar mediante análisis de ligamiento en una gran familia afectada la región genómica 14q11-12 como responsable de la enfermedad. Los genes *MYH6* y *MYH7* (codificantes para la alfa y beta miosina) fueron los que surgieron en una primera aproximación como los candidatos mas potentes.

Un estudio más profundo de este locus permitía en el año 1990 secuenciar la primera mutación causal de miocardiopatía hipertrófica en humanos: p.Arg403Glu en el gen *MYH7*, revolucionando la comprensión y el manejo de esta enfermedad [27].

Fue la llegada de la NGS (de las siglas en ingles «next-generation-sequencing», secuenciación de última generación o también llamada secuenciación masiva en paralelo) la que revolucionó el estudio genético en estas enfermedades. Hoy, mediante las nuevas técnicas de NGS podemos secuenciar el genoma de cualquier persona en 24 horas, por un costo inferior a 1.000 dólares y bajando (Figura 2.1).

Actualmente la secuenciación ha dejado de ser un problema. Cada vez más son los laboratorios con experiencia que adoptan los estándares internacionales [28] que realizan la secuenciación mediante paneles de genes diseñados para cada patología, o incluso mediante estrategias de exoma dirigido.

Por el contrario, la dificultad en la interpretación de los resultados y la categorización de las variantes genéticas es cada vez más dificultosa. Este paso es de vital importancia dentro de un estudio, y depende en gran medida de la experiencia del centro que realiza la interpretación [29]. La misma debe ser realizada por un equipo multidisciplinario que incluya técnicos, informáticos, biólogos, genetistas, y cardiólogos para convertirse en medicina personalizada orientada a un paciente en particular [30].

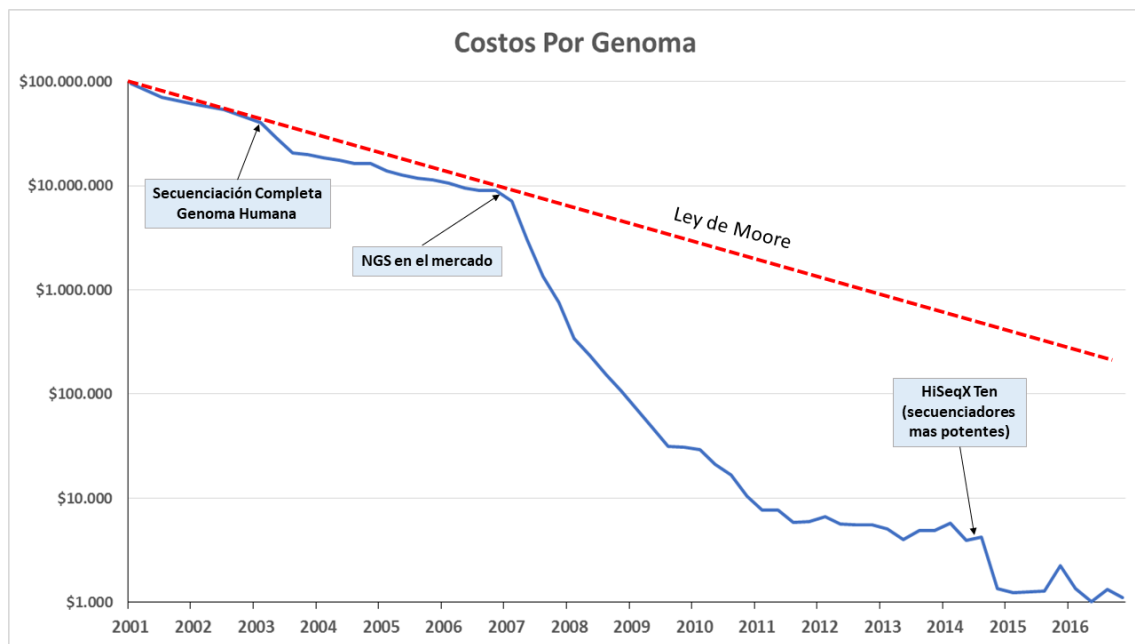


Figura 2.1: Evolución de los costos de secuenciación desde el año 2000. En el eje de las abscisas se representa el año, y en el de las ordenadas el costo estimado para secuenciar un genoma completo en dólares. Se observan los grandes hitos que cambiaron los costos de la misma, en especial la llegada al mercado de plataformas comerciales de secuenciación masiva en paralelo (Next Generation Sequencing o NGS) en el año 2007. Se observa como la línea roja que representa la ley de Moore aplicada a los microprocesadores (en donde la potencia de los mismos se duplica cada dos años) se ve superada por la tecnología de secuenciación. (Datos: NHGRI <https://www.genome.gov/27541954/dna-sequencing-costs-data/>).

2.1 ETIOLOGÍA MOLECULAR DE LA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Como ya fue descrito en el capítulo anterior, la MCH es el ejemplo clásico de enfermedad monogénica de herencia autosómica dominante en donde una mutación en un gen determinado es suficiente para causar la enfermedad, aunque con una penetrancia y una expresividad variables. Esta variabilidad depende de cada gen en particular y de la mutación específica, las que estarán sujetas a las modificaciones del entorno genético y ambiental.

Aproximadamente un 60 % de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica tienen una enfermedad familiar. Se han descrito modos de herencia autosómicos recesivos y ligados al cromosoma X, aunque son menos frecuentes. Más rara aún es la presentación matrilineal, típica de las enfermedades asociadas a genes que codifica el ADN mitocondrial. Cualquiera de estos patrones de herencia nos deben hacer pensar en la presencia de una fenocopia, como veremos más adelante en el capítulo.

2.1.1 Mutaciones en genes sarcoméricos

La MCH se describe con frecuencia como una enfermedad exclusiva del sarcómero cardíaco. Se han detectado variantes patogénicas en casi todas las proteínas sarcoméricas, las cuales son responsables de generar o regular la contracción del miocito. Las mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas son las causas más frecuentes y típicas de MCH, ya que el sarcómero representa la maquinaria responsable de la contracción cardíaca y de su regulación (figura 2.2). Casi todas las mutaciones patogénicas descritas se expresan clínicamente siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante, presentando una penetrancia incompleta y que depende de la edad [31].

La expresividad es variable: mutaciones en los mismos genes sarcoméricos pueden asociarse con diferentes fenotipos, que aparecen frecuentemente solapados; además de MCH, se pueden observar MCD, MCR, y miocardiopatía no compactada (MCNC); incluso algunos genes pueden producir miopatías esqueléticas y cardiopatías congénitas (defectos septales o anomalía de Ebstein, por ejemplo) [32]. Es importante destacar que no es rara la presencia de más de una mutación patogénica en genes de proteínas sarcoméricas en un mismo paciente, lo que sucede entre un 5 y un 10 % de los casos evaluados [33].

Mutaciones en genes del filamento grueso

Los genes más frecuentemente implicados en el desarrollo de MCH son *MYH7* y *MYBPC3*, que codifican dos proteínas pertenecientes a los filamentos gruesos del sarcómero: la cadena pesada de la beta miosina y la proteína C de unión a la miosina respectivamente. Mutaciones en estos dos genes explican aproximadamente un 40 % de los casos de MCH.

Proteína C de unión a la miosina (*MYBPC3*)

Este es el gen en el que más frecuentemente se detectan variantes causales de enfermedad en los pacientes estudiados mediante estudios genéticos. Mutaciones en este gen son responsables de aproximadamente un 20-30 % de los casos de MCH. Las variantes

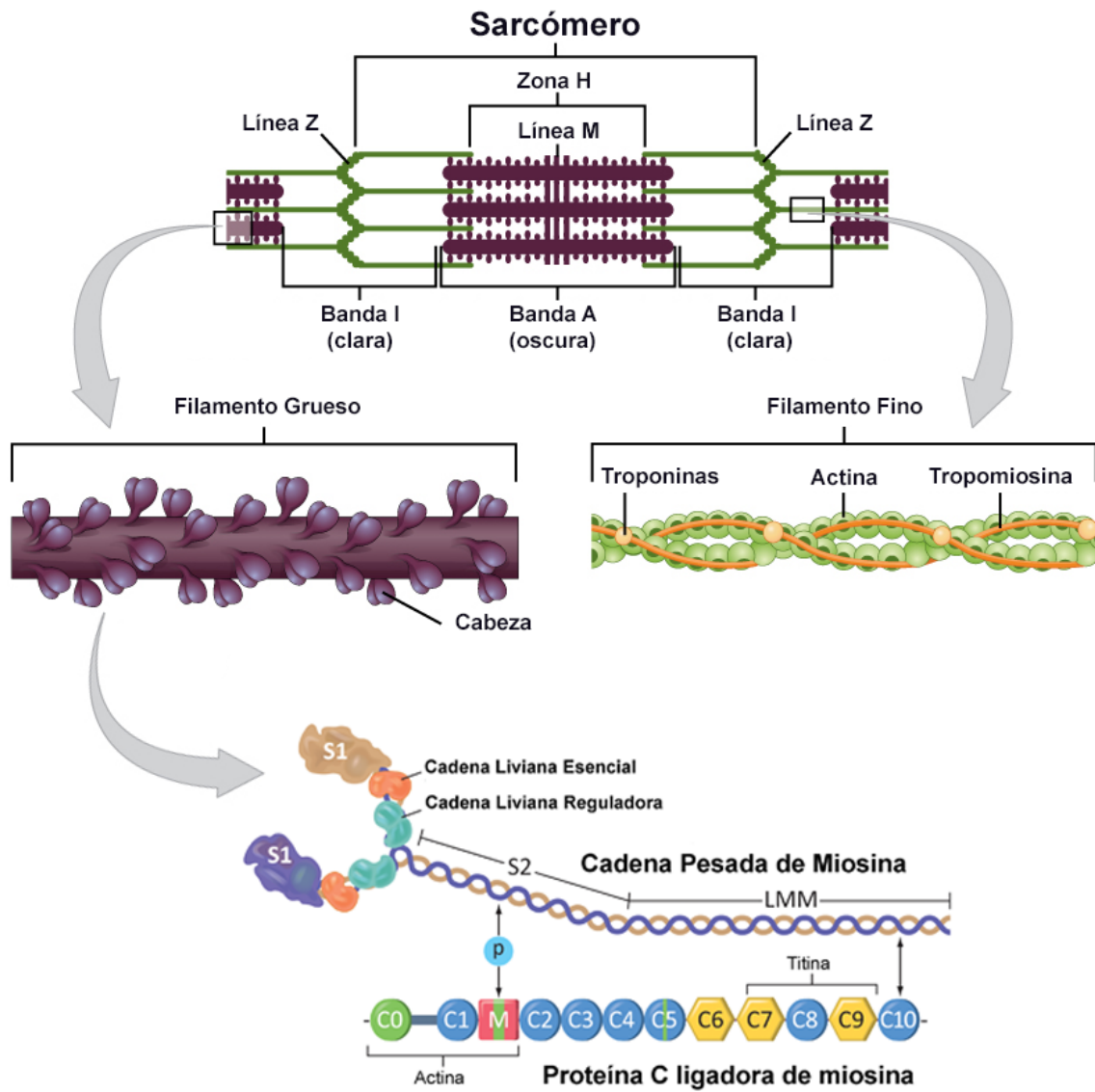


Figura 2.2: Esquema del sarcómero cardíaco, y las principales proteínas implicadas tanto en la mecánica de la contracción, como la regulación de la misma. El complejo de las troponinas incluye las troponinas T, I, y C.

mas relevantes son las de tipo truncamiento o codón de stop prematuro (inserciones o deleciones que producen cambios de la pauta de lectura, cambios que generan un codón de stop, o variantes que afectan el corte y empalme del ARN). En todos estos casos, el resultado final es la la presencia de transcritos aberrantes que son degradados, o que de ser traducidos producen proteínas truncadas o con pérdida importante de secuencias codificantes que las hacen disfuncionales siendo en la mayoría de los casos degradados por la maquinaria celular. También son frecuentes las variantes de tipo no sinónimas, que producen el cambio de un único aminoácido por otro y alteran la estructura y/o función de la proteína.

Clásicamente se han considerado a las mutaciones en *MYBPC3* como más benignas que las que se producen en otros genes sarcoméricos, con una expresión más tardía. Sin embargo, también existen casos con expresión clínica precoz, hipertrofia severa y alto riesgo de muerte súbita. Es importante tener en cuenta el momento de expresión de la enfermedad a la hora de evaluar el pronóstico [34]. En líneas generales, los predictores de riesgo clínico son adecuados en las variantes patogénicas de este gen: los eventos suelen producirse en pacientes que presentan fenotipos severos o marcadores de riesgo.

Cadena pesada de la beta miosina (MYH7)

La cadena pesada de la beta miosina, codificada por el gen *MYH7*, es el componente principal de los filamentos gruesos del sarcómero. Se han identificado hasta la fecha varios cientos de mutaciones asociadas la mayoría de las veces con MCH, pero también hay mutaciones relacionadas con MCD familiar, MCNC y con miopatía esquelética (miopatía distal tipo Laing) [35].

Las mutaciones en este gen se asocian en general con formas típicas de MCH, con una hipertrofia septal asimétrica de grado moderado a severo que se manifiesta en adolescencia o en adultos jóvenes. Dependiendo del tipo de población estudiada, las mutaciones en este gen son responsables de un 10 a 20 % de los casos de MCH.

Existe una gran variación en expresión clínica entre diferentes mutaciones, que depende en gran parte del tipo de mutación y la región afectada. Pero incluso dentro de una misma región hay diferencias importantes en la severidad y pronóstico asociado a mutaciones diferentes. Como ejemplo, nuestro grupo a demostrado como mutaciones en una región particular de la proteína (la región conversora, implicada en la transmisión del impulso mecánico) se asocian con un pronóstico más adverso que mutaciones en otras zonas, pero también como en esta región la severidad de la expresión clínica es mayor en algunas mutaciones que afectan a determinados aminoácidos (ver figura 1.5 del capítulo anterior) [20].

Las variantes causales de enfermedad que afectan a las cadenas livianas de miosina reguladora (*MYL2*) y esencial (*MYL3*) también se asocian al desarrollo de MCH, aunque representan un porcentaje mas pequeño de los casos (menos del 1 %) [36].

Mutaciones en genes del filamento fino

Los genes que forman parte del filamento fino siguen en frecuencia. Los mismos se encuentran implicados en el inicio y regulación de la contracción miocárdica (codifican las proteínas troponina T, I y C, y la tropomiosina), o representan el soporte . Estos genes en su conjunto explican aproximadamente un 10 % de los casos de MCH .

La troponina T cardíaca promueve el ensamblaje del complejo troponina-tropomiosina en los filamentos de actina. En algunas mutaciones en *TNNT2* la hipertrofia es ligera, y el fenotipo aparentemente leve; sin embargo hay un riesgo elevado de muerte súbita asociado con la presencia de desorganización miofibrilar severa.

Otras mutaciones tienen un alto riesgo relacionado con la evolución a disfunción sistólica con insuficiencia cardíaca y también se han descrito casos de mutaciones en estos genes con hipertrofia severa, mutaciones con hipertrofia de desarrollo tardío y mutaciones con bajo riesgo [37].

La troponina I cardíaca se conoce como subunidad inhibidora del complejo troponina porque impide la unión de la miosina a la actina en la diástole. Las mutaciones en troponina I se han asociado de manera predominante a MCH, y con menor frecuencia con miocardiopatía restrictiva y miocardiopatía dilatada. Del mismo modo que ocurre en el caso de la troponina T, en algunas mutaciones puede haber una disociación importante entre el riesgo de complicaciones (y en particular de muerte súbita) y el grado de hipertrofia ventricular [38].

Las mutaciones en la actina cardíaca (*ACTC1*) pueden ser además causa de miocardiopatía no compactada y de defectos septales de presentación familiar [39]. Debido a la importancia de la actina cardíaca en la función del sarcómero, la gran mayoría de las variantes detectadas tendrán relevancia clínica, aunque en el total terminan contribuyendo a un porcentaje de los casos de miocardiopatías (alrededor del 1 % de los casos de MCH).

Lo mismo sucede para el gen *TPM1* que codifica la tropomiosina 1, con algunas variantes con una clara asociación con MCH pero que explican una proporción pequeña de los casos, y la de algunas variantes en *TNNC1* (en este último caso existe una proporción similar de variantes asociadas a un fenotipo de MCH y MCD) [40].

2.1.2 Genes estructurales y reguladores que han demostrado una asociación con el desarrollo de MCH

Para ejercer correctamente su función, el sarcómero cardíaco no puede ser una entidad aislada dentro del miocito; el mismo debe formar parte de una compleja red interrelacionada que lo vincule con los otros sarcómeros, y a su vez con la membrana celular. Para cumplir esta función son esenciales las proteínas del disco Z del sarcómero, y también otras proteínas estructurales, los filamentos intermedios, que vinculan el disco Z con la membrana celular por medio de los costámeros.

Como puede observarse en la figura 2.3 esto da lugar a una compleja red, siendo muchos los genes de la misma que han sido propuestos como candidatos para el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica. A pesar de todo esto, son relativamente pocos los genes que han demostrado una asociación real con el fenotipo.

En esta sección solo vamos a referirnos a aquellos genes en donde existe suficiente evidencia como para considerarlos causales, porque existe cosegregación demostrada en familias y contribuyen significativamente al fenotipo [41].

Aunque no ha sido estudiado en forma sistemática en la literatura, es esperable que la contribución de estas mutaciones contribuya con menos del 5 % a los casos de MCH, con excepción de algunas mutaciones fundadoras en algunas regiones que pueden contribuir con un número mayor de casos.

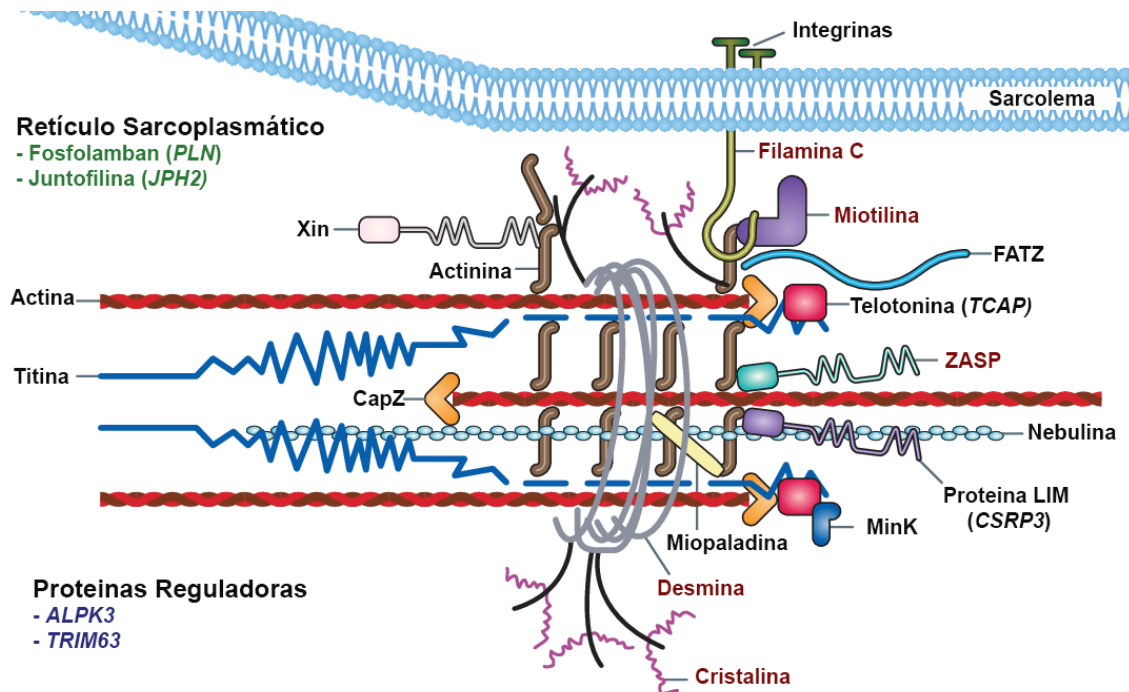


Figura 2.3: Esquema de las proteínas que forman parte del disco Z del sarcómero cardíaco, y sus diferentes interacciones con otros filamentos intermedios y proteínas de anclaje que sirven como estructura y soporte para su unión con el sarcolema.

Genes que codifican para proteínas del disco Z

Los discos Z son fundamentales para el anclaje del aparato contráctil, la transmisión de fuerza y el sensado de la tracción mecánica y la distensión sarcomérica. Dentro de estas se pueden mencionar telotonina (TCAP), proteína lim muscular (CSR3), vinculina (VCL), y miozenina (MYOZ2). Las mutaciones en proteínas del disco Z se han asociado con miocardiopatía dilatada, no-compactación miocárdica y con la miocardiopatía hipertrófica, pero existe poca evidencia acerca de su asociación con enfermedad [42].

De todas estas la que probablemente tenga mayor evidencia es el gen CSR3, que codifica la proteína LIM cardíaca rica en cisteínas: las variantes raras han demostrado estar enriquecidas en MCH, y algunas de ellas han demostrado cosegregación en familias en forma significativa (LODs mayor de 3.3) [43].

Recientemente también nuestro grupo ha demostrado una clara asociación entre mutaciones bialélicas en el gen TRIM63 y el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica [2]. Este gen codifica una proteína que se localiza en la línea Z del sarcómero, teniendo una función dual de unión entre las miofibrillas a los microtúbulos y los filamentos intermedios, pero también de ubiquitinación interviniendo en la degradación proteica.

Aunque parece ser una causa poco común de MCH, probablemente sea la causa más frecuente de MCH con un patrón de herencia autosómico recesivo. Se asocia a un fenotipo particular de hipertrofia concéntrica con una elevada incidencia de evolución a la disfunción sistólica.

Genes que regulan el metabolismo del Calcio

El fosfolamban es una proteína que regula la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico. Mutaciones en el gen que la codifica, *PLN*, se han asociado al desarrollo de miocardiopatía arritmogénica y dilatada. No está definitivamente establecido la relación entre mutaciones en este gen y MCH [38], aunque existen algunas variantes de tipo truncamiento que en forma bialélica se asociarían a MCD, y en heterocigosis simple a MCH pero con una penetrancia incompleta. De todas maneras, este es un gen muy pequeño (con un solo exón codificante), por lo que son muy pocas las variantes identificadas hasta la fecha [44].

Dentro de este grupo también incluimos a *JPH2*, que codifica la juntofilina, una proteína que hace de unión entre el retículo sarcoplásmico y la membrana plasmática, y que ha cosegregado con MCH en algunas familias, con un grado de evidencia moderado [45, 46].

Filamentos intermedios

Aunque son varios los genes que codifican filamentos intermedios que se han asociado claramente con enfermedad, su asociación con miocardiopatía hipertrófica genera más dudas, ya que la evidencia suele basarse en casos anecdóticos. Un ejemplo es el gen *DES*, que codifica la desmina, en donde se describen algunos casos aislados de MCH, pero los fenotipos con asociación demostrada son las enfermedades del músculo esquelético (miopatía miofibrilar) y la miocardiopatía dilatada (también se describen algunos casos de restrictiva) que puede estar asociados a los trastornos de conducción cardíaca [47].

Tal vez el gen con el que existe más dudas es la *FLNC*. Es un gen en donde los truncamientos producen un fenotipo específico de MCD asociada a arritmias ventriculares y MS [1], y algunas variantes missense se han asociado en forma convincente con MCH [48, 49]. También son causa de miopatía miofibrilar .

Se ha postulado la asociación de mutaciones puntuales en el gen *FLNC* (filamina C) con el desarrollo de MCH, pero llama la atención que en la mayoría de los estudios no describen datos evidentes de cosegregación familiar. En el artículo más importante publicado al respecto algunas variantes missense en *FLNC* podrían cosegregar en algunas familias, aunque llama la atención que algunos portadores considerados afectados en esta publicación no cumplieran criterios estrictos de MCH [50]. Consideramos que por el momento esta relación aún debe ser demostrada.

2.1.3 *Fenocopias*

Enfermedades de depósito y metabólicas

La MCH forma parte de las manifestaciones fenotípicas de diversas enfermedades metabólicas y de depósito provocadas por defectos en la producción o función de enzimas que participan en diferentes rutas metabólicas. En la mayor parte de estos casos se trata de enfermedades raras que presentan manifestaciones extra-cardíacas, aunque no siempre diagnóstico el diagnóstico es sencillo.

Tener en cuenta la posible existencia de estas patologías en el estudio genético de un paciente con diagnóstico clínico de MCH puede ser clave para un diagnóstico precoz

de enfermedades que pueden tener un tratamiento específico, como es el caso de la enfermedad de Fabry [51].

La mayor parte de las enfermedades incluidas en este epígrafe son enfermedades raras. Habitualmente tienen un patrón de herencia autosómico recesivo o recesivo ligado a X, pero en algunos casos los portadores heterocigotos pueden tener formas más leves de la enfermedad. Es por ello importante sospechar estas etiologías cuando exista o se sospeche consanguinidad con herencia recesiva o un patrón de herencia ligada a X (con manifestaciones exclusivas o más severas en varones y ausencia de transmisión de varón a varón).

Las enfermedades metabólicas son especialmente importantes en el diagnóstico de pacientes con MCH en edad pediátrica. En un registro publicado recientemente aproximadamente el 50% de las MCH en edad infantil fueron de causa metabólica [52].

Dentro de este grupo de enfermedades metabólicas que producen MCH se encuentran diversas glucogenosis, enfermedades lisosomales, enfermedades mitocondriales, trastornos del metabolismo de los ácidos grasos y la amiloidosis.

MCH por mutaciones en genes de la vía de señalización RAS-MAP quinzas (RASopatías)

Las llamadas RASopatías son un conjunto de síndromes secundarios a mutaciones en genes que codifican proteínas de la vía de señalización RAS/MAPK, implicada en múltiples procesos relacionados con el crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular. Dentro de las RASopatías, los síndromes de Noonan, Leopard, Costello y cardiofacio-cutáneo son los que se incluyen en el diagnóstico diferencial de la MCH [53].

Estos síndromes se caracterizan por un conjunto variable de manifestaciones que incluyen dimorfismo facial (frente ancha, macrocefalia, pliegues epicánticos, hipertelorismo, puente nasal deprimido, orejas de implantación baja, etc.) y anomalías esqueléticas (talla baja, pectum excavatum, tórax en escudo), cardiopatías, alteraciones cutáneas (lentiginosis, manchas café con leche, pelo lanoso, hiperqueratosis, distrofia ungueal, etc.), grados variables de retraso mental o dificultades de aprendizaje y posible predisposición a desarrollo de tumores benignos y/o malignos.

Dentro de las manifestaciones cardíacas, son frecuentes la estenosis valvular pulmonar (50-60% de los casos), la miocardiopatía hipertrófica (aproximadamente 30% de los pacientes) y los defectos septales auriculares o ventriculares (aproximadamente 20%). La frecuencia de las diferentes manifestaciones puede variar en función del gen afectado y del tipo de mutación. La MCH es más frecuente por ejemplo en pacientes con mutaciones en RAF1 (hasta el 95% de los Noonan con mutaciones en este gen presenta MCH) [54, 55].

2.2 RENTABILIDAD DEL ESTUDIO GENÉTICO EN LA MCH:

La rentabilidad diagnóstica cuando realizamos un estudio genético en cualquier patología nunca llega al 100 %. Siempre habrá un porcentaje de pacientes que presentan la enfermedad (fenotipo positivo), no pudiendo determinarse cuál es la mutación causal de la misma a pesar de haber realizado un estudio genético adecuado.

Es importante remarcar que en estos casos un estudio genético negativo no excluye el diagnóstico de la enfermedad en el paciente. El diagnóstico de la enfermedad es clínico, y el estudio genético ayuda a confirmar las sospechas diagnósticas, pero no descarta la enfermedad. También es importante evaluar si los genes del panel fueron analizados completos, y con una buena cobertura (es decir, si el estudio es técnicamente fiable) [28].

El porcentaje de diagnósticos positivos (rentabilidad de un estudio genético) en la miocardiopatía hipertrófica se encuentra alrededor del 50 %; o sea que en casi la mitad de los casos el estudio genético será negativo o incierto.

Es difícil establecer cual es la contribución de cada gen en particular a la enfermedad. Mientras que para los genes principales suele haber muy poca discusión, al revisar la literatura se pueden observar muchas discrepancias en las distintas series. Estas discrepancias comienzan con la rentabilidad del estudio genético, ya que suele haber bastante disparidad a la hora de categorizar una variantes como patogénica, o más aún, en la diferenciación entre las variantes de significado incierto y las que son posiblemente patogénicas.

Además, como ya lo mencionamos previamente, existen efectos fundadores de determinadas mutaciones, que pueden llegar a representar una proporción no despreciable del total, inclinando la balanza a ese gen en particular.

También no todos los centros evalúan los mismos genes en sus paneles. Incluso hay algunos que solo unos pocos genes sarcoméricos, dejando de lado las fenocopias u otros genes relevantes que podrían tener relación con la enfermedad. De esta manera no podemos saber cual es la contribución de ciertos genes relevantes, como podrían ser el *GLA* (asociado a enfermedad de Fabry), la *TTR* (asociada a amiloidosis familiar), o incluso genes que tienen una presentación casi exclusiva a nivel cardíaco y asociados a MCH como pueden ser los genes *LAMP2* (enfermedad de Danon) o *PRKAG2*.

Como ejemplo podemos citar una de las últimas publicaciones del registro SHARE, con datos de 4,591 pacientes de los cuales 2,763 fueron genotipados [56]. Aunque ese tipo de publicaciones representa un avance para la comprensión de la correlación fenotipo-genotipo, suele quedarse corta a la hora de aportar datos importantes con respecto a la etiología molecular. Como puede observarse en la figura 2.4, en este estudio solo se incluyeron en el análisis los genes sarcoméricos, no pudiendo determinarse al menos evaluando los datos de la publicación la contribución de otros genes relevantes.

La rentabilidad será mayor si existe historia familiar de la enfermedad o de muerte súbita, fenotipos severos, presentación a edades tempranas, presencia de «banderas rojas» (trastornos de conducción cardíaca, miopatía asociada, hallazgos extracardíacos), o ausencia de sospecha de otras causas no genéticas que puedan explicar el fenotipo [57].

Por el contrario, la rentabilidad será más baja en pacientes que presenten diagnósticos clínicos limítrofes o borderline, en donde la probabilidad pre-test de obtener un resultado genético positivo es muy baja. Aunque el estudio genético no deja de estar indicado, era esperable que se pudiese obtener un resultado negativo en estos casos [58].

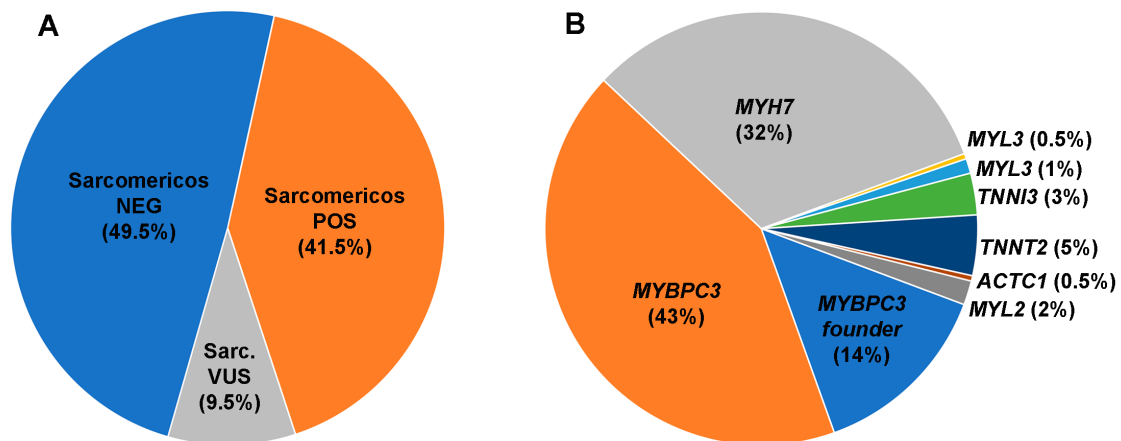


Figura 2.4: Se observan los resultados del estudio genético en 2,405 probandos con MCH genotipados en el registro SHARE. En el panel A se muestran los resultados globales de la secuenciación; se observa como un 41.5% de los probandos presentaban una variante posiblemente patogénica, o patogénica en un gen sarcomérico. En el panel B se muestra la distribución por gen. Se observa como casi el 90% de los casos de los pacientes con un estudio positivo presentaban mutaciones en los genes *MYBPC3* (más del 55% de los casos) o *MYH7*.

También es muy importante considerar otros diagnósticos y descartar fenocopias. Debemos preguntarnos si el paciente tiene un fenotipo claramente compatible con una miocardiopatía. Hay que tener en cuenta la presencia de fenocopias, ya que el pronóstico es totalmente diferente para cada una de estas enfermedades, y algunas pueden tener tratamiento específico, como ya fue mencionado.

Aunque cada una de estas enfermedades tiene características clínicas particulares, en la práctica este diagnóstico diferencial no es tan fácil, especialmente porque son enfermedades muy raras y que no suelen sospecharse. Todos estos genes asociados a enfermedades consideradas "fenocopias" deben ser incluidos dentro del panel diseñado para cada fenotipo particular [59].

2.3 ESTUDIOS GENÉTICOS NEGATIVOS Y DIRECCIONES FUTURAS

Como ya mencionamos previamente, más del 50 % de los estudios genéticos tiene un resultado negativo, es decir no se identifica la variante causal a pesar de haber realizado un estudio completo y adecuado. Siempre habrá que como primera medida que evaluar que los genes más relevantes se encuentren incluidos en el panel realizado, y que se haya descartado la presencia de fenocopias.

Son muchos los estudios que muestran que aquellos pacientes con un diagnóstico de miocardiopatía hipertrófica y con un estudio genético negativo presentan un mejor pronóstico que aquellos cuyo estudio genético es positivo. Hay que remarcar que en la mayoría de estos casos, se refieren a pacientes que fueron positivos para mutaciones en alguno de los genes sarcoméricos principales.

Cuando se comparan estas poblaciones, los pacientes con genotipo negativo desarrollan la enfermedad en forma más tardía que los pacientes con genotipo positivo, presentando grados de hipertrofia más bajos y menos obstrucción al tracto de salida del ventrículo izquierdo [58]. A su vez, la tasa de complicaciones es menores y presentan una menor tasa de eventos en el seguimiento, especialmente de muerte súbita e insuficiencia cardíaca terminal [60].

2.3.1 Herencia no Mendeliana

Muchos de los pacientes con genotipo negativo no presentaban historia familiar de la enfermedad. Esta «Miocardiopatía Hipertrófica No Familiar» o «Esporádica», definida como aquella en donde no hay historia familiar y no se detecta una mutación causal de la enfermedad, presenta una muy baja rentabilidad del screening clínico en los familiares de primer grado, a diferencia de los pacientes con historia familiar y genotipo positivo [61].

Aunque las guías continúan recomendando que todo familiar de una probando con MCH y genotipo negativo debe ser seguido clínicamente a través del tiempo (ver Figura 1.4 en el capítulo anterior), la realidad es que la probabilidad de que estos desarrollen la enfermedad es baja [62].

Es probable que modelos genéticos más complejos tengan la respuesta a la mayoría de estos casos, y que no sigan los patrones de herencia clásicos Mendelianos. Es decir, que la explicación no sea una causa monogénica, sino que la expresión de la enfermedad dependa de la sumatoria de varios factores genéticos (variantes raras o polimorfismos) y/o ambientales (hipertensión, diabetes, deporte, etc.) que en forma independiente no son suficientes para que la enfermedad se exprese, pero que combinados determinan la expresión fenotípica en un individuo en particular.

Sin embargo, las investigaciones sobre tales modelos hasta ahora se han visto limitadas ya que para tener suficiente poder estadístico se necesitan cohortes de pacientes muy grandes que todavía no están disponibles. Además, son muchos los factores confundidores que pueden influir en los resultados y que es muy difícil de manejar para que los resultados sean válidos.

2.3.2 *Nuevos genes asociados con la enfermedad*

La MCH sigue siendo esencialmente una enfermedad del sarcómero. Aunque se pueden encontrar genes causales adicionales, lo más probable es que expliquen solo una pequeña proporción de casos, como lo demuestran los pocos genes no sarcoméricos hasta que han demostrado una asociación clara con la enfermedad. Ya han pasado 30 años desde que se empezaron a determinar las causas genéticas de estas enfermedades, y son múltiples los estudios de GWAS (del inglés «genome-wide-association-study») y análisis de ligamiento que se han llevado a cabo.

También cada vez es más frecuente la realización de exomas y genomas completo en pacientes en donde los estudios iniciales no arrojaron resultados positivos; en este sentido la realización de tríos mediante estas estrategias puede ayudar a determinar nuevas variantes y genes candidatos. Por todo esto es esperable que la mayoría de los genes relacionados con la enfermedad, al menos en forma monogénica, hayan sido identificados. Es poco probable que un gen muy relevante y que explique un porcentaje alto de casos no haya dado alguna señal en alguno de estos estudios en forma previa [63].

Otro tema de discusión es si vale la pena incluir genes candidatos y de segundo orden en los paneles de genes, para la realización de estudios genéticos amplios. Muchos grupos recomiendan que los genes que no han demostrado una clara asociación con la enfermedad deberían excluirse, y empezar la evaluación con paneles reducidos de genes, ya que los paneles amplios ofrecen un aumento muy discreto en el rendimiento del diagnóstico, pero aumentan considerablemente el ruido al identificar un número muy elevado de variantes de significado incierto [64].

Todo lo expuesto no invalida que se deba seguir investigando la presencia de potenciales genes candidatos. En este sentido los clínicos debemos estar atentos a las pistas que nos pueden proporcionar aquellas familias en donde existe una historia clara de enfermedad, con varios miembros afectados, y en donde no se ha identificado una causa genética [41].

Estas familias en donde existe un patrón de herencia Mendeliano son aquellas en las que vale la pena profundizar con los estudios de investigación para tratar de determinar la causa de la enfermedad (por ejemplo la realización de tríos mediante exomas). Antes de proceder con estas investigaciones, deberemos analizar si todos los genes relacionados con el fenotipo del paciente han sido incluidos en el estudio, al igual que descartadas las fenocopias.

El grado de conocimiento y experiencia clínica del equipo que realiza la interpretación e informe es fundamental a la hora de evitar descartar variantes que pueden ser relevantes, pero a la vez controlar todo el ruido que se puede generar por el aumento de variantes de significado incierto detectadas.

2.3.3 *Variantes intrónicas profundas*

Recientemente algunos grupos han demostrado que un análisis más exhaustivo de genes conocidos y con una asociación probada con MCH puede aumentar significativamente el rendimiento diagnóstico del test genético en esta enfermedad. Más concretamente, la evaluación de regiones intrónicas profundas en genes en donde la haploinsuficiencia es un mecanismo probado de enfermedad podría ser relevante.

MYBPC es un gen donde existen algunas variantes intrónicas profundas que a priori presentaban una baja probabilidad de ser deletéreas, pero que se asocian a enfermedad ya que afectan el proceso de corte y empalme, alterando la síntesis proteica. En un trabajo en donde se evaluaron casos de MCH con un estudio genético negativo, se realizó secuenciación completa por genomas y se identificaron 3 variantes intrónicas profundas que afectaban el splicing produciendo el agregado o la extensión de un exón, generando una proteína disfuncional [65].

Debido a la relevancia que tiene *MYBPC3*, en donde las variantes de tipo pérdida de función son la principal causa genética de miocardiopatía hipertrófica), en nuestro centro actualmente estamos secuenciando en forma completa este gen (exones, intrones y regiones UTR). Hemos identificado un número no despreciable de variantes candidatas, que aparecen ausentes de la población control.

En algunas de ellas se ha demostrado cosegregación con el fenotipo, o se han realizado estudios funcionales mediante mini-genes que confirmaban que las variantes finalmente eran patogénicas ya que generaban transcritos aberrantes.

Una técnica relativamente sencilla y menos costosa que puede utilizarse y que ha demostrado ser un método eficaz para determinar la potencial relevancia de estas variantes es el análisis directo de los transcritos de ARN de *MYBPC3* en sangre de los pacientes [66].

Un ejemplo es la variante c.3331-26A>G, identificada en una familia Española en donde los 4 miembros afectados de la misma eran portadores, mientras que los tres familiares no afectados genotipados no portaban la misma; los 5 predictores bioinformáticos utilizados predecían que el splicing no se encontraba afectado, pero la secuenciación directa del ARNm en sangre de unos de los afectados demostró que existían transcritos aberrantes que contradecían dicha predicción, al igual que la realización de un estudio de expresión en un vector (mini-gen) que demostraba que la variante afectaba el splicing.

Resultados similares se han obtenidos para la variante en c.1898-23A>G en un estudio llevado a cabo por Lopes et al. del que participamos como coautores, en donde se la secuenciación de regiones intrónicas profundas de *MYBPC3* aumentaba el rendimiento de las pruebas genéticas [67].

Debido a que son muy pocos los genes sarcoméricos o que han demostrado clara asociación con MCH en donde la pérdida de función es un mecanismo de enfermedad, todavía no está clara si la estrategia de secuenciar las regiones intrónicas profundas de otros genes podría aumentar el rendimiento diagnóstico. Teniendo en cuenta que las variantes de tipo pérdida de función en *MYH7* (el segundo gen más relevante) serían toleradas en heterocigosis simple, parece poco probable que el rendimiento aumente en forma sustancial.

2.3.4 *Grandes deleciones o duplicaciones*

En general, más del 95 % de las variantes genéticas asociadas a miocardiopatías son cambios puntuales, o pequeñas inserciones/deleciones de nucleótidos. Sin embargo, algunos genes tienen mayor tendencia a presentar mutaciones que suponen la deleción o duplicación de grandes regiones genómicas.

Este tipo de variantes, denominadas genéricamente variaciones en el número de copias (CNVs, por su sigla en inglés «copy-number-variations») se detectan con un abordaje

técnico específico y distinto al utilizado para identificar cambios puntuales, como por ejemplo los estudios de array, ya sea por CGH (hibridación genómica comparativa) o por SNPs (polimorfismos de nucleótido único, del inglés «single-nucleótido-polimorphism»), o la técnica de MLPA («multiplex ligation-dependent probe amplification»). De todas maneras, desde hace años se ha perfeccionado la técnica de secuenciación masiva en paralelo (NGS) para detectar este tipo de variantes dentro del mismo estudio por medio de programas bioinformáticos especiales.

Un ejemplo típico de patología en donde la detección de CNVs es muy importante es la MCD secundaria a mutaciones en distrofina (gen *DMD*), ya que las variantes estructurales representan más del 80% de los casos en esta enfermedad [68]. Un estudio genético negativo en un paciente con una sospecha de esta patología que no haya evaluado la presencia de grandes deleciones o duplicaciones en *DMD* supondrá una limitación grande, con muchas probabilidades de ser un falso negativo.

Dentro de la MCH, todavía no hay un gen que tenga la relevancia que pueden tener este tipo de variantes en otras patologías. Hay muy pocas publicaciones en donde se ha reportado la evaluación sistemática de CNVs en MCH [69, 70]. Según los datos de los que disponemos en nuestro centro luego de haber evaluado casi sistemáticamente las CNVs en los últimos 5 años, el porcentaje de estudios de MCH en los que se detecta una CNV relevante que pueda explicar la enfermedad sería menor del 0.5%, y la mayoría de las mismas se producirían en *MYBPC3*.

FHOD₃ COMO CANDIDATO PARA MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

3.1 LAS FORMINAS Y SU FUNCIÓN: LA POLIMERIZACIÓN DE LA ACTINA

Las forminas son proteínas ubicuas ampliamente extendidas dentro de la naturaleza. Prácticamente todas las células eucariotas presentan diferentes isoformas lo que sugiere que cumplen roles y funciones diferentes (Figura 3.1). Son proteínas modulares que tienen una serie de dominios y motivos que les permiten ejercer diferentes funciones, pero siempre relacionadas con la regulación de la dinámica de la actina en las diversas células de cada organismo [71].

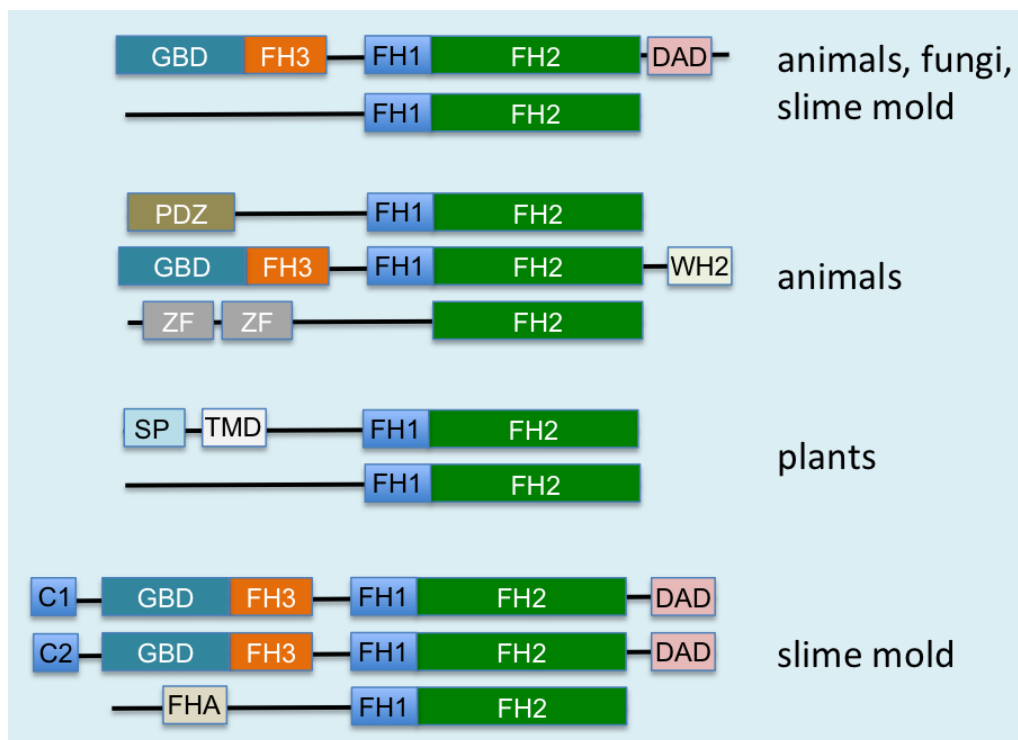


Figura 3.1: Las forminas se encuentran ampliamente distribuidas dentro de las células eucariotas, tanto en el reino animal como vegetal. Como puede observarse, en las células de una misma especie existen diferentes proteínas e isoformas. Puede observarse como el dominio FH2 y FH1 se encuentran altamente conservados, estando presente en todas las forminas y sus isoformas.

La nucleación de la actina para formar filamentos, y su posterior regulación, es un proceso complejo del que participan múltiples proteínas regulatorias y que necesita de la energía del ATP. Los filamentos de actina tienen dos extremos denominados extremo barbado (barbed end) y extremo puntiagudo (pointed end). Los monómeros de actina primero forman dímeros que son incorporados al extremo barbado del filamento (polimerización de la actina), mientras que la despolimerización de la actina ocurre en

el otro extremo distal puntiagudo del filamento. De acuerdo a cual de estos procesos predomina, el filamento se elongará o se hará más corto.

En algunas organismos como las amebas, o incluso en células humanas como los macrófagos, esta función y regulación esta relacionada con el movimiento, ya que forman los pseudopódos que se alargan y acortan para que las mismas cumplan su función.

En otras células, en donde la actina cumple una función estructural o de soporte, como el músculo, la longitud del mismo debe mantenerse prácticamente constante. Sin embargo, existe un reciclaje constante de las proteínas dentro del mismo -se estima que la vida media de un monómeros de actina es de 3 a 10 días- con un ritmo de polimerización y despolimerización similares y constantes para mantener la estructura [72].

Las forminas cumplen funciones tanto en la nucleación como en la elongación de los filamentos de actina, y en la protección del extremo barbado, aumentando el ritmo de ensamblado de la actina (Figura 3.2).

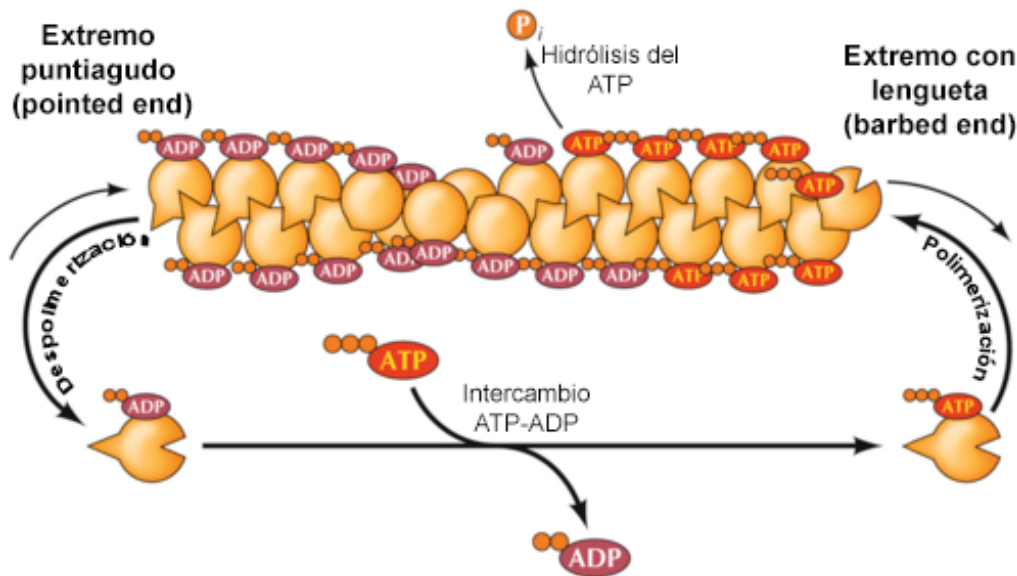


Figura 3.2: Las polimerización de la actina (ganancia) tiene lugar por el extremo barbado o con lengüeta (barbed end) del filamento, mientras que su despolimerización (pérdida) por el extremo puntiagudo de la misma. De acuerdo al mecanismo que predomine en un determinado momento, el resultado final será que el filamento se alargue, se acorte o se mantenga constante si ambos procesos están en equilibrio. Este complejo proceso necesita de la energía del ATP para ser llevado a cabo, y se encuentra bajo la regulación de múltiples proteínas diferentes.

Como puede observarse en la Figura 3.1 la estructura que define a esta familia de proteínas es el dominio FH2 (del inglés «formin homology domain 2»). Esta secuencia de unos 350 aminoácidos se encuentra presente en prácticamente todas las eucariotas, y los mamíferos presentan 15 genes que la contienen dentro de su secuencia [73]. El dominio FH2 se localiza generalmente en el extremo C-terminal de la proteína, previa a la región de la cola que también tiene una importante función en la polimerización de la actina.

El dominio FH2 está precedido por un dominio FH1 («formin homology domain 1») rico en prolina (35-100 %) y de longitud variable en las diferentes isoformas y especies (15-229 aminoácidos).

Las forminas regulan la polimerización de la actina uniéndose mediante su dominio FH2 en forma de dímeros al extremo barbado del filamento de actina. Una vez unida a esta región, inhibe el anillado del filamento evitando que la elongación del filamento se bloquee por medio del encapuchado (capping). Los dominios de tipo formina FH2 son la mínima unidad necesaria para que se produzca este proceso regulatorio, como lo demuestran diferentes estudios.

El dímero de FH2 va progresando sobre el filamento a medida que este se alarga permitiendo su elongación mientras permanece unido al extremo barbado. La elongación del filamento por medio de las forminas es más lenta que si se produjere con el agregado de monómeros de actina libres, lo que sugiere que FH2 se encuentra entre dos conformaciones: una «abierta» que permite a los monómeros de actina incorporarse al filamento, y una «cerrada» que lo evita. El factor de elongación que permite cada dímero de FH2 varía entre cada una de las isoformas, y a la vez está gobernado por diferentes procesos regulatorios propios de cada célula [74].

El dominio FH1 también sería importante en este proceso. La mayoría de la actina no polimerizada en las células está unida a la profilina, una proteína que tiene una gran afinidad por la lisina; incluso el complejo actina-profilina aumenta esta afinidad por la poli-lisina en más de 10 veces. Es por este motivo que el dominio FH1 rico en lisina, y además muy flexible, es capaz de unirse a estas moléculas encajándolas en el extremo barbado del filamento en el momento en que el dominio FH2 se encuentra en un estado «abierto» para poder incorporar los monómeros de actina [75] (Figura 3.3).

A diferencia de los dominios FH1 y FH2, que se encuentran en prácticamente todas las forminas de las diferentes especies, el resto de los dominios es mucho más variable (Figura 3.1). La mayor parte de esta variabilidad se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína.

En la mayoría de los metazoos estas proteínas se categorizan como «Forminas de tipo diáfanos» (del inglés DRF, «diaphanous related formins»). En estas los dominios se mantienen más o menos constantes, y FHOD3 no es la excepción [76].

Los dominios que se pueden observar, desde el extremo N-terminal, son los siguientes (figura 3.4):

- Un dominio GBD de unión a una GTPasa (*RhoGTPase-binding domain*)
- Un dominio DID inhibitorio (*diaphanous inhibitory domain*)
- Un dominio DAD autoregulatorio (*diaphanous autoregulatory domain*), localizado en el extremo C-terminal en la cola de la proteína

Las forminas se encontrarían en un estado auto-inhibido inactivo que depende de la interacción entre los dominios DID y DAD. La unión de la RhoGTPasa al dominio GBD podría romper la interacción entre DID y DAD, evitando la autoinhibición, aunque como veremos más adelante para la activación completa de estas forminas se necesitan eventos adicionales con el juego de otros actores.

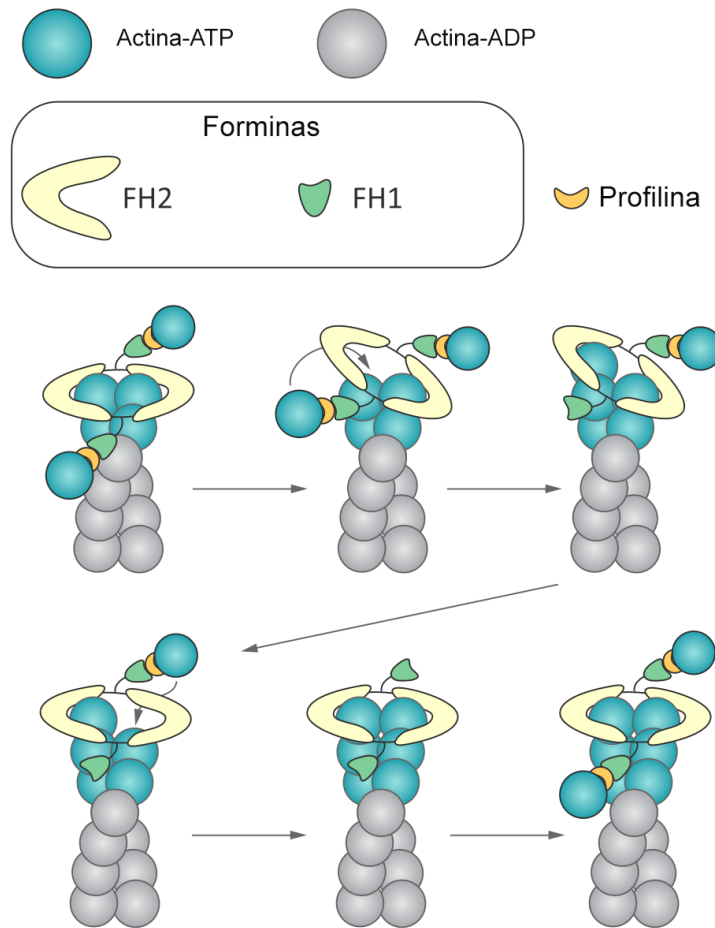


Figura 3.3: Las polimerización de la actina es un complejo mecanismo regulado por las forminas entre otras proteínas. Estas forman una estructura en forma de dímeros por medio de la interacción entre el dominio FH2 en el extremo barbado del filamento, mientras que el dominio flexible FH1 se une al complejo actina-profilina incorporando para incorporar los monómeros de actina.

3.2 FHOD3 Y SU IMPORTANCIA EN EL SARCÓMERO CARDÍACO

Aunque el ensamblado de la actina había sido estudiado ampliamente, la información acerca de su importancia en las células musculares y la regulación del proceso en unidades funcionales como el sarcómero, eran desconocidas. Los estudios pioneros al respecto recién comenzaron hace unos 10 años.

El primer trabajo importante fue el de Taniguchi y colaboradores, en el año 2009, que por primera vez demostraron que FHOD3 se localizaba en los filamentos de actina formando un patrón estriado y regulaba la organización del sarcómero en los cardiomiocitos [77]. En este primer trabajo, por medio de técnicas de inmunohistoquímica en cardiomiocitos de ratas neonatas, identificaron la localización de FHOD3 entre la línea Z y la línea M, pero más cercana a ésta última, a nivel de donde parecería finalizar el filamento de actina.

Estos hallazgos llamaban la atención, ya que en el sarcómero, el extremo barbado de la actina se localiza a nivel del disco Z, mientras que el extremo puntiagudo apunta hacia la línea M; por lo tanto existía una discrepancia entre la localización de FHOD3 -más cercana a la línea M donde está el extremo puntiagudo de la actina- y el lugar donde se supone ejercería su función de polimerización de la actina -el extremo barbado del filamento- en la línea Z. Una explicación posible es que existan extremos barbados del filamento de actina cercanos a la línea Z, y que se vayan formando filamentos más cortos de actina que posteriormente se van «anillando» unos con otros mediante la unión extremo-extremo.

Lo más interesante de este trabajo fue que la depleción de FHOD3 por medio de RNAs de interferencia producía una marcada reducción de la actina, y una disrupción de la estructura del sarcómero; estos defectos eran rescatados solamente con el agregado de FHOD3 salvaje, sugiriendo que esta era fundamental y crítica para la organización del sarcómero.

Los siguientes trabajos llevados a cabo por Iskratsch y colaboradores ampliaron el conocimiento sobre FHOD3 al demostrar que la isoforma más larga de la proteína era la más relevante a la hora del mantenimiento de la estructura del sarcómero [78]. Los hallazgos más relevantes de este grupo fueron los siguientes:

- La isoforma más larga de *FHOD3* contiene un exón alternativo altamente conservado. Denominaron a este exón «exón T(D/E)₅XE» por su secuencia proteica. El mismo consta de una secuencia de 8 aminoácidos que se localiza en el extremo C-terminal de la proteína, inmediatamente después del dominio FH2 (en rosa en la Figura 3.4). Este exón sería específico del músculo estriado. Probablemente en los trabajos anteriores del grupo Japonés no identificaron esta isoforma debido a que utilizaron clones de tejido cerebral, en donde predomina la isoforma corta de *FHOD3* que carece de este exón [79].
- La presencia del exón T(D/E)₅XE sería necesaria para dirigir la proteína a las miofibrillas, ya que constructos llevados a cabo sin el mismo formaban agregados citoplasmáticos sin llegar a su localización sarcomérica. Este evento también podría ser regulado por la fosforilación de los residuos de Treonina en posiciones 1474 y 1476 de la proteína (la fosforilación de los mismos también formaba agregados



Figura 3.4: Esquema representando la isoforma cardíaca de FHOD₃ y sus dominios principales. Los números equivalen a las posiciones a nivel de los aminoácidos en la secuencia proteica. A la izquierda se observa el extremo N-terminal, y a la derecha el extremo C-terminal que contiene los dominios FH1 y FH2.

citoplasmáticos).

Este exón no sería necesario para la función de polimerización de la actina de FHOD₃, para la que sería suficiente la presencia del dominio FH2.

- A diferencia del trabajo de Taniguchi, este grupo localizó a FHOD₃ mediante un anticuerpo específico en la región del disco Z del tejido cardíaco maduro. Más tarde, la hipótesis fue que en realidad se distribuye en un rango más amplio dentro del sarcómero en el tejido embrionario, mientras que está restringido al disco Z en el tejido adulto.
- Confirmaron mediante diversos experimentos los hallazgos previos de que FHOD₃ es un componente esencial y necesario que permite la polimerización de la actina para formar los filamentos finos en el sarcómero cardíaco.
- Mediante un modelo experimental de miocardiopatía dilatada en ratones, observaron que en los mismos existía un cambio en la expresión de las isoformas de FHOD₃, predominando aquellas que carecían del exón T(D/E)₅XE. Esta «regulación en menos» de la isoforma larga predominante en el miocardio adulto por otras diferentes -y probablemente más frecuentes en el miocardio fetal- también fue corroborada mediante inmunohistoquímica en muestras de biopsias de pacientes con miocardiopatía dilatada, tanto isquémica como familiar.
- Según este grupo, las dos isoformas de FHOD₃ se expresarían en el corazón embrionario de los vertebrados. La fosforilación de FHOD₃ por la proteína caseína-quinasa (CK2) sería un requisito necesario para poder dirigir a FHOD₃ hacia su lugar en las miofibrillas en los cardiomiocitos embrionarios.
- Otro evento importante sería la fosforilación de tres aminoácidos en el extremo C-terminal de FHOD₃ por la proteína serina/treonina quinasa ROCK1. Esta fosforilación sería suficiente para la activación, lo que daría como resultado una mayor síntesis de filamentos de actina en los cardiomiocitos y también un patrón de localización más amplio de FHOD₃ en las miofibrillas. Probablemente esto ocurra a nivel del dominio DAD, logrando la fosforilación evitar la interacción con el dominio DID y la consecuente formación de monómeros inactivos, para que FHOD₃ pueda formar dímeros activos. FHOD₃ parece ser el mediador por el cual se produce una formación exagerada de filamentos de actina inducida por la sobre-expresión de ROCK1 activado en los cardiomiocitos [80].

El mismo grupo Japonés del trabajo original de Taniguchi también demostró por medio de inmunohistoquímica que la isoforma larga de FHOD₃, que contiene los exones 11,

12 y 25 (este último el denominado T(D/E)₅XE) es la principal en músculo cardíaco y esquelético, tanto en tejido embrionario como en tejido adulto de ratones; por el contrario, la isoforma corta carente de estos tres exones, se expresaba predominantemente en cerebro y riñones [81].

A diferencia de los estudios de Iskratsch, los autores concluyeron que el exón T(D/E)₅XE no era esencial para dirigir a la proteína a su localización en el sarcómero, y de hecho no era ni siquiera necesario para la organización de los filamentos de actina en el embrión, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por el contrario, los exones 11 y 12 sí serían esenciales para esta función. En este trabajo nuevamente localiza a FHOD3 en dos bandas paralelas que se encuentran cercanas a la banda M, en el medio del sarcómero, y no a nivel del disco Z.

Más recientemente nuevos estudios coincidieron en que la localización de FHOD3 se daría a este nivel cercano a la banda M, más específicamente a nivel de la zona C (C-zone). Como puede observarse en la figura 3.5, este es el lugar a nivel de la banda A en donde se localiza la proteína C ligadora de miosina, más cercana a la línea M.

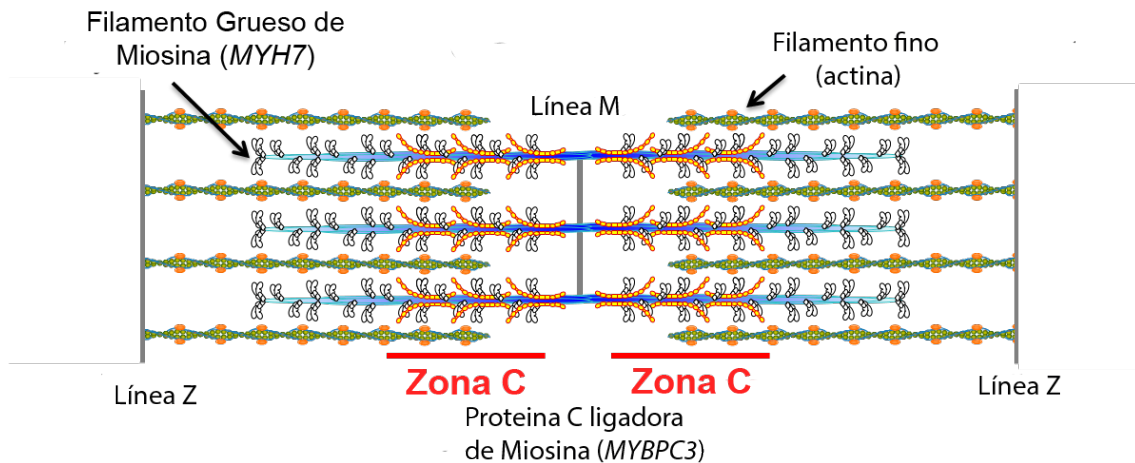


Figura 3.5: A nivel del sarcómero cardíaco la proteína FHOD3 se localizaría a nivel de la zona C. Este es el lugar perteneciente a la banda A más cercano a la línea M, en donde se localiza la proteína C de unión a la miosina, codificadas por el gen MYBPC3. Estas dos proteínas interactuarían, y serían necesarias ambas para una correcta colocalización a nivel del sarcómero cardíaco.

Matsuyama y colaboradores demostraron también que este proceso depende de la unión de la proteína C ligadora de miosina con FHOD3 [82]:

1. En primer lugar, el dominio Ig-like cardioespecífico localizado a nivel N-terminal de MYBPC3 (dominio Co) interactúa con una región cardioespecífica de FHOD3 localizada a nivel N-terminal. Este dominio cardioespecífico de FHOD3 está representado por los exones 11 y 12, que a nivel de la isoforma cardíaca de FHOD3 representan los aminoácidos del 400 al 552 (152 residuos).
2. La interacción sería necesaria para dirigir a FHOD3 a su localización a la zona C, ya que las isoformas más cortas de FHOD3 que carecen del dominio cardioespecífico no son capaces de dirigirse a esta zona.

3. La presencia de MYBPC₃ sería necesaria para que FHOD₃ también se dirija a su localización en el sarcómero. En ratones knock-out para MYBPC₃, la isoforma cardíaca de FHOD₃ también es incapaz de llegar a su localización, desarrollando estos ratones un fenotipo de MCH.
4. Este fenotipo de MCH en ratones nulos para MYBPC₃ era exacerbado por la sobreexpresión de FHOD₃, generando a su vez un defecto en la integridad del sarcómero. Este defecto era parcialmente corregido por la disminución en la producción de FHOD₃. Todo esto sugiere que en ausencia de MYBPC₃, FHOD₃ ejerce un efecto deletéreo en la función cardíaca debido a su localización aberrante.
5. Debido a que el fragmento N-terminal de FHOD₃ aislado interacciona con MYBPC₃ con mucho mayor fuerza y afinidad que la proteína completa FHOD₃, es probable que la interacción entre MYBPC₃-FHOD₃ este regulada por un cambio conformacional de este último. Este cambio podría ser un proceso de fosforilación en el extremo C-terminal que genera un cambio de un estado auto-inhibido a un estado activado, o también algún proceso de fosforilación que pueda tener lugar a nivel de los exones 11 o 12.

Todos estos puntos sugieren que FHOD₃ por su interacción directa con MYBPC₃ participa de la regulación de la función cardíaca a nivel del sarcómero, y por lo tanto podría contribuir a la patogénesis de la miocardiopatía hipertrófica relacionada con alteraciones en MYBPC₃.

3.3 FHOD3 Y SU POTENCIAL PARTICIPACIÓN DENTRO DE LAS MIOCARDIOPATÍAS

3.3.1 Miocardiopatía Hipertrófica

Wooten y colaboradores realizaron un estudio de GWAS de casos y controles que tenía como finalidad identificar polimorfismos genéticos potencialmente asociados con MCH, para después evaluar si dichas variantes se encontraban sobrerrepresentadas en MCH o podían explicar la heterogeneidad fenotípica de esta enfermedad [83].

Los autores detectaron una variante intrónica en *FHOD3* (rs516514) que se encontraba sobrerrepresentada en la subpoblación de MCH de la cohorte de Tufts con respecto a los controles, con un OR (odds ratio) de 2.45 (IC95 %: 1.76-3.41). Las frecuencias de alelo menor (MAF) fueron respectivamente 0.61 en la población de MCH, y de 0.48 en los controles. Este hallazgo posteriormente fue validado en una cohorte independiente de MCH de la clínica Mayo (OR de 1.26; IC95 %: 1.12-1.41).

Posteriormente, luego de identificar como gen candidato a *FHOD3* identificaron una variante de tipo no sinónima, p.Val1326Ile si la referimos a la isoforma cardíaca de *FHOD3*, que se encontraba en desequilibrio de ligamiento con esta variante intrónica.

Esta variante también presentaba una asociación con MCH significativa, con un OR de 2.01 (IC95 %: 1.64-2.64) en la cohorte de MCH del Tufts, y de 1.36 (IC95 %: 1.20-1.54) en la cohorte de la Mayo Clinic. Sin embargo, cuando intentaron ver diferencias en la expresión fenotípica en la cohorte de pacientes de la Mayo Clinic, observaron que no existían diferencias entre los homocigotos, heterocigotos o salvajes para esta variante.

Hay que remarcar que la variante p.Val1326Ile es un polimorfismo frecuente. En la base de datos gnomAD presenta un MAF de 0.34 (0.31 en la población Europea), con más de 17,000 individuos homocigotos considerados controles. Con esta MAF, más del 50 % de la población sería portadora de esta variante, lo que excede largamente la frecuencia de la miocardiopatía hipertrófica. En la discusión, los autores dejan claro que esta variante no puede ni debe ser considerada una variante causal. Aunque comentan que ser portador de esta variante podría representar estar en mayor riesgo de expresar un fenotipo manifiesto de MCH, esto no fue probado en el trabajo e incluso es puesto en duda en la editorial del mismo [84].

3.3.2 Miocardiopatía dilatada

En el año 2013 también se plantea una posible asociación entre el gen *FHOD3* y el desarrollo de miocardiopatía dilatada. Arimura y colaboradores [85] identificaron un paciente con una variante no sinónima en el gen *FHOD3*, p.Tyr1249Asn, en un paciente adulto con MCD luego de analizar 48 familias Japonesas con este diagnóstico, en busca de variantes en el gen que pudiesen explicar la enfermedad.

Se trataba de una paciente de sexo femenino, de 48 años, que se encontraba en clase funcional I de la NYHA. Su fracción de eyección era de 44 %, con un diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI) de 55 mm; también llama la atención que el septum interventricular (SIV) y la pared posterior (PP) eran de 13 mm, aunque la MCH no fue un diagnóstico a considerar por los autores.

Lamentablemente la segregación de la variante con el fenotipo no pudo ser determinada, ya que solo una hija de 24 años y un hijo de 22 fueron genotipados, siendo no

portadores de la variante y encontrándose no afectados hasta ese momento. En la familia existía también una historia de insuficiencia cardíaca en el padre y la hermana de la paciente, ambos muertos súbitamente a los 66 y 27 años respectivamente, pero no se dispone del genotipo.

La mayor limitación de este estudio es la imposibilidad de demostrar una relación causal entre esta variante y el fenotipo de la paciente. Además, no se aclara en el artículo si todos los genes que potencialmente pueden causar MCD fueron evaluados. Muchos de los genes que claramente se asocian con este fenotipo, como *FLNC*, *BAG3* y *RBM20*, fueron incorporados sistemáticamente en la evaluación de pacientes en años posteriores. De hecho, la *TTN*, el gen más prevalente en MCD y que podría explicar hasta un 25 % de los casos de MCD familiar, solo fue genotipada en un 30 % de su extensión.

Más recientemente, en el año 2017, se realizó un exome-wide association study (EWAS) donde se evaluaron 116,855 SNVs (variantes de cambio de nucleótido único, del inglés «single nucleotide variant») en 2,796 pacientes con MCD y 6,877 controles de 6 diferentes países Europeos [86].

En el mismo se identificaron 8 loci asociados con MCD, donde se identificaron debido a sus características 8 genes candidatos: *FHOD3* fue uno de estos 8 genes (los otros 7 estaban representados por *BAG3*, *TTN*, *SLC39A8*, *MLIP*, *FLNC*, *ALPK3* y *ZBTB17*). Llama la atención que el SNV evaluado era la misma variante no sinónima asociada con MCH por Wooten y colaboradores en el año 2013: p.Val1326Ile, aunque en este caso se asoció en forma negativa con MCD, o sea con una reducción del riesgo: OR =0.82 (IC95 %: 0.77-0.89).

Parte II

ESTUDIOS REALIZADOS

FHOD₃ ES UN NUEVO GEN CAUSAL DE MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

4.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1.1 *Hipótesis*

Existe una relación causal entre algunas mutaciones en el gen *FHOD₃* y el desarrollo de MCH

4.1.2 *Objetivos*

- *Principal:* Demostrar la asociación entre mutaciones en el gen *FHOD₃* y el desarrollo de MCH
- *Secundarios:*
 - Determinar si las variantes genéticas muy raras en el gen *FHOD₃* están sobre-representadas en una subpoblación de pacientes con MCH con respecto a los controles
 - Evaluar si alguna de estas variantes candidatas cosegregan con un fenotipo de MCH en familias, y determinar el patrón de herencia
 - Determinar las características fenotípicas y pronósticas de los portadores de variantes causales de enfermedad en el gen *FHOD₃*

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 *Diseño y población del estudio*

El estudio se dividió en dos fases diferentes para contestar a la pregunta generada por la hipótesis y para cumplir con los objetivos:

- **Fase I o de «screening» (cribado):** esta fase se planteó para identificar variantes genéticas candidatas en una cohorte de probandos con diferentes enfermedades cardíacas hereditarias que habían sido secuenciados y evaluados de una manera homogénea; posteriormente se evaluaría si las variantes candidatas se encontraban enriquecidas (sobrerrepresentadas) en la subpoblación de pacientes con MCH con respecto a los controles.
- **Fase II o de cosegregación:** en donde aquellos pacientes portadores de variantes candidatas y que presentaban un fenotipo de MCH eran invitados a participar junto a sus familias para determinar la cosegregación de dichas variantes con el fenotipo; en esta fase también se buscaría determinar la forma de presentación clínica (expresividad, penetrancia y pronóstico)

Fase I de cribado (screening)

En la fase I del estudio se secuenciaron mediante una estrategia de NGS las muestras de ADN de 7,881 probandos consecutivos no relacionados con diagnóstico de diferentes afecciones cardíacas hereditarias (desde febrero de 2014 hasta agosto de 2017).

Los fenotipos de cada uno de los probandos había sido establecido previamente por cada uno de los centros participantes antes de realizarse los estudios genéticos.

De estos probandos, 3,189 tenían un diagnóstico de MCH. Se utilizaron como controles 2,777 casos índices adicionales sin evidencia de enfermedad cardíaca estructural (principalmente canalopatías y enfermedades aórticas). Los pacientes con otras miocardiopatías distintas de la MCH y aquellas víctimas de MS fueron excluidos del análisis posterior (figura 4.1).

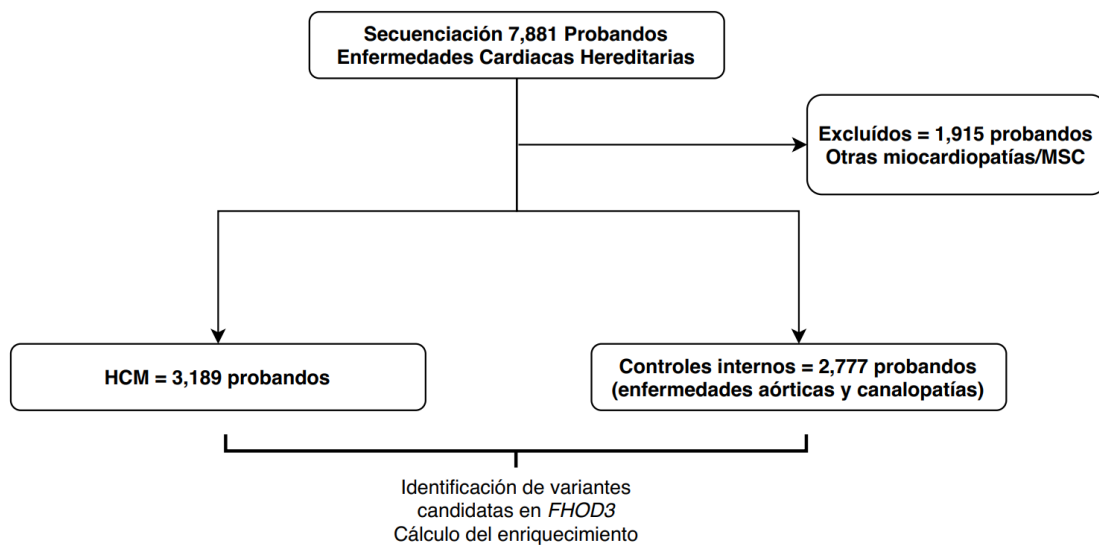


Figura 4.1: Diagrama de flujo que muestra los probandos incluidos en la fase I del estudio y su distribución en los grupos MCH y control

Las muestras de pacientes fueron derivadas principalmente de centros de España, seguidos de centros del Reino Unido, Dinamarca, Estados Unidos, Alemania y Argentina. La etnia predominante fue Europea (más del 90% de los probandos), y no hubo diferencias estadísticas entre el grupo MCH contra los controles.

Las frecuencias de las variantes genéticas en la población general se extrajeron de la base de datos gnomAD versión r2.0, de Agosto del 2017 (<http://gnomad.broadinstitute.org>) [87].

En la fase de selección inicial, se identificaron variantes candidatas en *FHOD3* según un punto de corte determinado para seleccionar solamente aquellas variantes con una frecuencia muy baja en la población general.

Definición de variante candidata

Se definió como variante candidata a toda variante genética detectada en cualquier probando secuenciado de la cohorte que cumpliera con las siguientes características, siguiendo los mismos argumentos utilizados por Walsh et al. reevaluar la patogenicidad de variantes genéticas en miocardiopatías [88]:

1. Que la MAF fuera menor de 5×10^{-5} dentro de la frecuencia global de las variantes en la base de datos gnomAD
2. No estuviera enriquecida en subpoblaciones específicas (etnias) de la base de datos gnomAD, excluyéndose aquellas variantes con una MAF $\geq 1 \times 10^{-4}$ en cualquier de estas subpoblaciones

Posteriormente, se compararon las frecuencias de estas variantes candidatas en el subgrupo de probandos con MCH versus la frecuencia en los controles para determinar si estaban enriquecidas (sobrerrepresentadas) en la subpoblación de MCH (figura 4.1).

Fase II de cosegregación y recopilación de datos clínicos

En la segunda fase del estudio, los probandos del grupo MCH que eran portadores de variantes candidatas en *FHOD3* fueron invitados a participar en el estudio de cosegregación familiar.

El cribado clínico y genético familiar en cascada se realizó después del obtener el consentimiento informado por escrito en aquellas familias que aceptaron participar. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de A Coruña-Ferrol (código de registro 2015/576).

Se excluyeron los portadores de variantes en otros genes sarcoméricos que podrían estar relacionadas con el fenotipo. Se evaluaron las características clínicas basales y en el seguimiento de todos los portadores de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en *FHOD3* (incluidos probandos y familiares).

4.2.2 Estudios genéticos, filtrado de variantes y clasificación de variantes

Los estudios genéticos fueron realizados mediante NGS (secuenciación de nueva generación o masiva en paralelo). Las muestras recibidas (sangre, saliva, tejido) se sometieron a un proceso de extracción y purificación automatizada para obtener el ADN genómico (QIAsymphony SP®, Qiagen).

La preparación de las genotecas se llevó a cabo utilizando los reactivos SureSelect Reagent library preparation kit (Agilent) para el método de secuenciación multiplexada paired-end de Illumina, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El enriquecimiento de las regiones de interés se realizó mediante un kit de sondas SureSelect (SureSelect Target Enrichment Kit para Illumina, método de secuencia multiplexada de extremo emparejado; Agilent Technologies, Santa Clara, California, E.E.U.U.) que captura selectivamente las zonas codificantes y las áreas intrónicas flanqueantes de los genes seleccionados. Las sondas de captura se diseñaron para que cubran adecuadamente todas las regiones codificantes y al menos las 10 pares de bases de las regiones intrónicas flanqueantes; por tanto, este test no detecta variantes localizadas en zonas intrónicas alejadas del sitio de splicing o regiones UTR.

Tras la generación de clusters, las librerías de ADN se secuenciaron en la plataforma Illumina HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, California, EE.UU.). El análisis de los datos de secuenciación se realizó mediante un pipeline bioinformático propio que comprende tanto el demultiplexado de la muestra como todos aquellos pasos requeridos para la obtención de un informe de variantes anotadas junto a su cobertura y parámetros de calidad correspondientes.

El diseño de la librería de genes y sondas de captura incluyó los siguientes 213 genes relacionados con enfermedades cardíacas hereditarias y muerte súbita (en el apéndice D figura la nomenclatura de cada uno de los genes incluidos en la librería):

AARS2, ABCC9, ACAD9, ACADM, ACADVL, ACTA1, ACTA2, ACTC1, ACTN2, ACVRL1, ADAMTSL4, AGK, AGL, AGPAT2, AKAP9, ALMS1, ANK2, ANK3, ANKRD1, APOA5, APOB, APOC3, ATPAF2, BAG3, BMPR1B, BMPR2, BRAF, BSCL2, CACNA1C, CACNA1D, CACNA2D1, CACNB2, CALM1, CALM2, CALR3, CAPN3, CASQ2, CAV1, CAV3, CAVIN4, CBL, CBS, CETP, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COQ2, COX15, COX6B1, CRELD1, CRYAB, CSR3, CTF1, CTNNA3, DES, DLD, DMD, DNAJC19, DOLK, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, ELN, EMD, ENG, EYA4, FAH, FBN1, FBN2, FHL1, FHL2, FHOD3, FKRP, FKTN, FLNA, FLNC, FOXD4, GAA, GATA4, GATA6, GATAD1, GDF2, GFM1, GJA1, GJA5, GLA, GLB1, GNPTAB, GPD1L, GUSB, HCN4, HFE, HRAS, JAG1, JPH2, JUP, KCNA5, KCND3, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE5, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ8, KCNK3, KCNQ1, KLF10, KRAS, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, LDLR, LIAS, LMNA, LRP6, MAP2K1, MAP2K2, MIB1, MLYCD, MRPL3, MRPS22, MTO1, MYBPC3, MYH11, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK, MYLK2, MYOT, MYOZ2, MYPN, NEBL, NEXN, NKX2-5, NOTCH1, NOTCH3, NPPA, NRAS, OBSL1, PCSK9, PDHA1, PDLIM3, PHKA1, PITX2, PKP2, PLN, PLOD1, PMM2, PRDM16, PRKAG2, PRKG1, PSEN1, PSEN2, PTPN11, RAF1, RANGRF, RBM20, RYR2, SCN10A, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, SGCA, SGCB, SGCD, SHOC2, SKI, SLC22A5, SLC25A4, SLC2A10, SLMAP, SMAD1, SMAD3, SMAD4, SMAD9, SNTA1, SOS1, SPRED1, SURF1, TAZ, TBX1, TBX20, TBX5, TCAP, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB2, TMEM43, TMEM70, TMPO, TNNC1, TNNT2, TNNT3, TNNT4, TPM1, TRDN, TRIM63, TRPM4, TSFM, TTN, TTR, TXNRD2, y VCL.

La profundidad de lecturas (número de veces que una base fue secuenciada obteniendo lecturas independientes) de cada nucleótido de la región de interés de los genes relacionados con el fenotipo de referencia (incluyendo a *FHOD3*) fue mayor que 30x (media 250-400x).

Los exones que no cumplieron con este estándar fueron secuenciados de forma complementaria utilizando el método Sanger, al igual que las variantes en regiones de baja mapeabilidad o alineamiento múltiple, y las inserciones y/o deleciones y/o indels con tamaño >4 pb.

Se seleccionaron aquellas variantes candidatas que generarían alguna alteración a nivel proteico a nivel del transcrito más largo y relevante del gen *FHOD3* (NM_001281740.1; 1,644 aminoácidos):

- Variantes no sinónimas (cambio de un aminoácido por otro diferente)
- Pequeñas inserciones o deleciones sin alteración del marco de lectura
- Variantes que predicen la generación de un codón de stop prematuro: deleciones o inserciones con un desplazamiento del marco de lectura, y variantes sin sentido
- Variantes que afectaban el sitio consenso de corte y empalme del ARN

Para establecer la patogenicidad de las variantes identificadas, desarrollamos un esquema de clasificación personalizado basado en las recomendaciones del American College of Medical Genetics and Genomics (cuadro 4.1 y tabla de la página siguiente) [89].

Clasificación	Equivalencia ACMG
Patogénica (+++)	Patogénica
Muy posiblemente patogénica (++)	Posiblemente patogénica
Posiblemente patogénica (+?)	VUS (+)
De significado incierto (?)	VUS
Posiblemente no patogénica (-?)	Posiblemente benigna
No patogénica (-)	Benigna

Cuadro 4.1: Esquema de clasificación de la patogenicidad de las variantes genéticas utilizado. El mismo se basa en una modificación del esquema propuesto por la ACMG, cuya equivalencia puede observarse a la derecha del cuadro.

La clasificación final de cada variante se acordó por consenso entre dos cardiólogos con experiencia en la interpretación de variantes genéticas.

Clasificación	Criterios Principales	Criterios de Apoyo	Utilidad Clínica
PATOGENICA O ASOCIADA CON LA ENFERMEDAD [+ + +]	<ol style="list-style-type: none"> 1 Variante ampliamente descrita en la literatura, con evidencia contundente de asociación genotipo-fenotipo, y con consenso acerca de su patogenicidad. 2 Cosegregación demostrada con un fenotipo (>10 meiosis). 3 Cosegregación en al menos 2 familias (≤10 meiosis), o presente en al menos 5 casos índice con el mismo fenotipo, y que cumple al menos 2 de los criterios de apoyo: 	<p>A Variante de tipo truncamiento en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo probado de patogenicidad.</p> <p>B Estudios funcionales que apoyan la patogenicidad.</p> <p>C Presentación "de novo" originando una nueva enfermedad en la familia (con maternidad y paternidad confirmadas).</p> <p>D Variante "missense" que genera el mismo cambio de aminoácido que una variante previamente descrita como patogénica.</p> <p>E Variante con muy baja frecuencia alélica/ausente en poblaciones control (MAF<0.001%).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Valor clínico predictivo. • Información clínica. • Consejo genético. • Recomendado estudio familiar.
MUY POSIBLEMENTE ASOCIADA CON LA ENFERMEDAD [+ +]	<ol style="list-style-type: none"> 1 Variante de tipo truncamiento en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo probado de patogenicidad que explica el fenotipo del paciente, y que cumple al menos 1 criterio de apoyo: 2 Variante missense/inserción o deleción "in frame" en zona no repetitiva de un gen con asociación genotipo-fenotipo demostrada que explica la enfermedad del paciente, y cumple al menos 2 criterios de apoyo: 	<p>A Estudios funcionales que apoyan la patogenicidad.</p> <p>B Presentación "de novo" originando una nueva enfermedad en la familia (con maternidad y paternidad confirmadas).</p> <p>C Afecta a un residuo en donde previamente se han identificado otras variantes patogénicas (hot spot mutacional); o se localiza en un dominio funcional o región relevante de la proteína.</p> <p>D Variante con muy baja frecuencia alélica/ausente en poblaciones control (MAF<0.001%).</p> <p>E Cosegregación probable en al menos una familia, o en varios casos índice, pero que no cumple los criterios para considerarla patogénica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Valor clínico predictivo. • Consejo genético (información sobre penetrancia y expresividad incompleta). • Recomendado estudio familiar.
POSIBLEMENTE ASOCIADA CON LA ENFERMEDAD [+ ?]	<ol style="list-style-type: none"> 1 Variante de tipo truncamiento con muy baja frecuencia alélica/ausente en poblaciones control (MAF<0.001%), que afecta a un gen en donde la pérdida de función no es un mecanismo patogénico establecido, o no cumple los criterios para considerarla patogénica. 2 Variante intrónica fuera de la región de consenso del gen, para la que los predictores bioinformáticos coinciden en que afectaría al mecanismo de "splicing". 3 Variante "missense"/inserción o deleción "in frame" en zona no repetitiva de un gen que no cumple los criterios para considerarla patogénica/probablemente patogénica, pero sí cumple al menos 3 de los criterios de apoyo: 	<p>A Variante con muy baja frecuencia alélica/ausente en poblaciones control (MAF<0.001%).</p> <p>B Presentación "de novo" originando una nueva enfermedad en la familia (con maternidad y paternidad NO confirmadas).</p> <p>C Fenotipo del paciente e historia familiar sugieren una enfermedad explicada por mutaciones en el gen (gen con asociación fenotipo-genotipo documentada).</p> <p>D Estudios bioinformáticos coinciden en que sería deletérea.</p> <p>E Localizada en "hot-spot" mutacional, dominio funcional, o región relevante de la proteína.</p> <p>F Descrita en al menos 2 individuos no relacionados que presentan el mismo fenotipo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Por el momento, SIN valor clínico predictivo. • Evaluación de cosegregación puede ser útil para definir la patogenicidad.
PATOGENICIDAD DESCONOCIDA [?]	<ol style="list-style-type: none"> 1 Variante con información contradictoria acerca de su patogenicidad. 2 Variantes que no cumplen criterios para ser incluidas en otra categoría de la clasificación. 		<ul style="list-style-type: none"> • SIN valor clínico predictivo. • Evaluación de cosegregación, si hay familiares afectados, según criterio del médico tratante (sólo para investigación).
POSIBLEMENTE NO ASOCIADA CON LA ENFERMEDAD [- ?]	<ol style="list-style-type: none"> 1 La frecuencia alélica de la variante en poblaciones control es mayor que la esperada para la enfermedad, o presenta una MAF >0.05%. 2 Ausencia de cosegregación de la variante con el fenotipo en al menos 1 familia. 3 Cumplimiento de al menos 2 de los criterios de apoyo: 	<p>A Variante de tipo "missense" en un gen en donde sólo las variantes de tipo truncamiento han demostrado ser causa de enfermedad.</p> <p>B Estudio funcional que demuestre que la variante no altera la estructura-función de la proteína que codifica.</p> <p>C Predictores bioinformáticos coincidentes en que la variante no alteraría la función de la proteína (se incluyen variantes de tipo "splicing" fuera de la zona de consenso).</p> <p>D Inserciones/deleciones "in frame" en una región repetitiva del gen sin función conocida.</p> <p>E Presencia de la variante en homocigosis en población control.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • SIN valor clínico predictivo. • NO recomendada su inclusión en el estudio familiar (sólo para investigación).
NO ASOCIADA CON LA ENFERMEDAD [- -]	<ol style="list-style-type: none"> 1 MAF >5% en cualquiera de las bases de datos utilizadas como controles. 2 Variante previamente descrita, con evidencia contundente y consenso acerca de su benignidad, sin datos contradictorios en la literatura. 3 Ausencia de cosegregación con la enfermedad descrita en al menos 2 familias. 4 Cumplimiento de al menos dos de los criterios de apoyo: 	<p>A Frecuencia alélica mayor que la esperada para la enfermedad, o MAF >0.05%.</p> <p>B Ausencia de cosegregación de la variante con el fenotipo en al menos 1 familia.</p> <p>C Estudio funcional que demuestre que la variante no altera la estructura-función de la proteína que codifica.</p> <p>D Presencia de la variante en sujetos sanos (no afectados) a una edad en la cual la enfermedad debería ser completamente penetrante (la variante debe estar en homocigosis en enfermedades de herencia recesiva, o en hemocigosis en enfermedades ligadas a X).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • BENIGNAS • NO deben ser incluidas en el estudio familiar.

4.2.3 *Métodos estadísticos utilizados*

Las variables continuas se expresaron como media \pm DE, y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de T de Student o la prueba de Mann-Whitney según la distribución de los valores.

Las variables no continuas se expresaron como un número entero (porcentaje del total) y se compararon mediante la prueba de chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según corresponda. Se consideró un valor de $p < 0.05$ (a dos lados) como estadísticamente significativo.

El análisis se realizó con la versión R 3.4.3 (The R Foundation for Statistical Computing Platform).

Cálculo del puntaje LOD (Logaritmo de probabilidades)

En las familias informativas calculamos la puntuación LODs utilizando el paquete PARAMLINK para el software R [90]. El modelo se estableció con un valor de $\phi = 0$ y con una tasa de fenocopias del 0.005.

Se establecieron dos penetrancias diferentes para el cálculo, de 80 % y 95 % respectivamente.

Se asignó un estado indeterminado a los miembros de la familia con un diagnóstico cardíaco dudoso o cuando este no estaba disponible; también se consideraron con un estado indeterminado a los hombres menores de 45 años y las mujeres menores de 50 años que no cumplieran con los criterios clínicos de MCH considerando que podían desarrollar la enfermedad a edades más avanzadas, de acuerdo a la penetrancia estimada.

Análisis de supervivencia

La probabilidad acumulada de muerte cardiovascular en portadores de mutaciones causantes de enfermedad en FHOD3 desde el nacimiento y después del diagnóstico de miocardiopatía hipertrófica (seguimiento) se estimó utilizando el método de Kaplan-Meier. El comienzo del seguimiento se estableció como la primera visita clínica cuando el paciente tuvo un diagnóstico de la enfermedad (los portadores no afectados y los casos de MSC en los que se diagnosticó MCH post-mortem se excluyeron de este análisis, aunque fueron incluidos en el análisis de sobrevida desde el nacimiento).

La muerte cardiovascular se definió como la presencia de muerte súbita cardíaca, choque apropiado del desfibrilador, muerte por insuficiencia cardíaca y/o trasplante cardíaco.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Variantes candidatas en el gen *FHOD3* identificadas

Se identificaron un total de 94 variantes candidatas en *FHOD3* distribuidas en 132 probandos, lo que representa el 1.67% de los 7,881 probandos no relacionados consecutivos que fueron secuenciados. De estas variantes, 90 eran de tipo no truncamiento (88 no sinónimas, y dos de tipo delección «in-frame» sin pérdida del marco de lectura), y cuatro eran de tipo truncamiento o codón de stop prematuro (tres sin sentido, y una inserción de tipo «frame-shift» que provocaba un cambio en el marco de lectura de la proteína).

En 74 de los 132 probandos (56.1%) que portaban una variante candidata en *FHOD3* el diagnóstico fue el de MCH. En cinco probandos el fenotipo no estaba disponible, y 18 individuos eran controles sin evidencia de enfermedad cardíaca estructural. Se excluyeron del análisis treinta y cinco pacientes: 27 tenían un diagnóstico de una miocardiopatía distinta de la MCH (18 miocardiopatía dilatada, 5 miocardiopatía arritmogénica, 3 no compactación ventricular izquierda y 1 miocardiopatía restrictiva), mientras que ocho muestras eran de pacientes post-mortem sin evidencia de cardiopatía previa o en la autopsia.

Una descripción detallada de las variantes identificadas, las frecuencias poblacionales, los scores de los predictores bioinformáticos, y el fenotipo en los portadores se muestran en la Tabla 4.2.

Cuadro 4.2: Tabla de variantes candidatas identificadas en *FHOD3* en la fase I del estudio

Variante	Tipo	DANN	FATHMM	GnomAD	HIC	Ptes.	Fenotipo
p.Thr14Ala	Missense	0.9945	0.9641	0.0011	0.0127	2	MCH (1), MSC (1)
p.Gly40Arg	Missense	0.9982	0.8859	0.0000	0.0064	1	MCA (1)
p.Thr60Ile	Missense	0.9987	0.9919	0.0000	0.0064	1	MSC (1)
p.Leu172Phe	Missense	0.9991	0.9884	0.0025	0.0064	1	MSC (1)
p.Val185Ile	Missense	0.9959	0.9839	0.0008	0.0064	1	MCH (1)
p.Ser201Pro	Missense	0.9987	0.9930	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Ala225Ser	Missense	0.9906	0.9892	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Ile247Val	Missense	0.9027	0.9711	0.0028	0.0064	1	MCD (1)
p.Thr307Ala	Missense	0.9901	0.9841	0.0000	0.0064	1	N/D (1)
p.Ala321Val	Missense	0.9983	0.9866	0.0046	0.0127	2	MCH (1), Control (1)
p.Gly351Arg	Missense	0.9267	0.1396	0.0022	0.0127	2	MCH (1), MCD (1)
p.Arg363Cys	Missense	0.9995	0.9932	0.0008	0.0064	1	MCH (1)
p.Ser366Leu	Missense	0.9993	0.9932	0.0040	0.0064	1	MCD
p.Lys371Arg	Missense	0.9026	0.9080	0.0007	0.0127	2	MCH (2)
p.Lys371*	Nonsense	0.9997	0.9413	0.0000	0.0064	1	MCD
p.Gln383His	Missense	0.9923	0.6314	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg397Ser	Missense	0.3126	0.9118	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Glu404Lys	Missense	0.9167	0.9175	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Thr410Met	Missense	0.8225	0.9367	0.0019	0.0191	3	MCH (2), Control (1)
p.Thr440Ala	Missense	0.5507	0.0618	0.0023	0.0064	1	MCH (1)
p.Val454Gly	Missense	0.7256	0.1877	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Ser458Thr	Missense	0.6358	0.1184	0.0015	0.0064	1	MCH (1)
p.Glu482Lys	Missense	0.6760	0.8975	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Ser509Leu	Missense	0.8204	0.9648	0.0000	0.0064	1	MCD (1)

Variante	Tipo	DANN	FATHMM	GnomAD	HIC	Ptes.	Fenotipo
p.Ser527del	Deletion	NA	NA	0.0008	0.0764	12	MCH (12)
p.Tyr528Cys	Missense	0.7658	0.9807	0.0000	0.0382	6	MCH (6)
p.Ala542Glu	Missense	0.7840	0.9573	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg574Ile	Missense	0.7729	0.9747	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Ser576Arg	Missense	0.9859	0.9794	0.0000	0.0064	1	MCD (1)
p.Ser593Gly	Missense	0.9409	0.2062	0.0000	0.0064	1	MSC (1)
p.Val594Glu	Missense	0.7691	0.3362	0.0004	0.0127	2	MCH (1), MCD (1)
p.Thr596Ala	Missense	0.9546	0.9197	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Pro604His	Missense	0.9907	0.5228	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Pro615Leu	Missense	0.4535	0.1851	0.0018	0.0127	2	MCH (1), N/D (1)
p.His626Tyr	Missense	0.9981	0.9919	0.0000	0.0064	1	MSC (1)
p.Arg634Gly	Missense	0.9977	0.9775	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg637Gly	Missense	0.9972	0.9699	0.0000	0.0191	3	MCH (3)
p.Arg637Trp	Missense	0.9992	0.9688	0.0014	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg637Pro	Missense	0.9975	0.9925	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg641Ser	Missense	0.9975	0.9782	0.0000	0.0127	2	MCH (2)
p.Arg644Ser	Missense	0.9776	0.5758	0.0000	0.0127	2	MCH (2)
p.Asn654Lys	Missense	0.9982	0.9849	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Glu687Lys	Missense	0.9993	0.9816	0.0004	0.0064	1	MCD (1)
p.Arg697Trp	Missense	0.9993	0.9699	0.0016	0.0064	1	MCH (1)
p.Gln728Pro	Missense	0.9903	0.6746	0.0008	0.0064	1	MCH (1)
p.Leu731Pro	Missense	0.8307	0.1676	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Glu758Lys	Missense	0.9983	0.9743	0.0016	0.0064	1	MCH (1)
p.Gly766Val	Missense	0.9523	0.2870	0.0004	0.0064	1	MSC (1)
p.Ser821Arg	Missense	0.9982	0.9890	0.0008	0.0064	1	MCNC (1)
p.Thr828Met	Missense	0.9993	0.9968	0.0022	0.0127	2	MCH (1), N/D (1)

Variante	Tipo	DANN	FATHMM	GnomAD	HIC	Ptes.	Fenotipo
p.Glu832Lys	Missense	0.9994	0.9968	0.0008	0.0127	2	MCH (2)
p.Gly845Cys	Missense	0.9974	0.9962	0.0004	0.0064	1	MCH (1)
p.Ala849Thr	Missense	0.8171	0.1982	0.0020	0.0064	1	MCH (1)
p.Val856Ile	Missense	0.9882	0.9790	0.0000	0.0064	1	MCA (1)
p.Ala906Val	Missense	0.9991	0.9788	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Arg934Gly	Missense	0.9984	0.9810	0.0013	0.0064	1	MCD (1)
p.Arg934Trp	Missense	0.9992	0.9800	0.0013	0.0064	1	MCD (1)
p.Ser936Thr	Missense	0.9856	0.9714	0.0009	0.0064	1	MCH (1)
p.Asp962Asn	Missense	0.9987	0.9636	0.0000	0.0127	2	MCH (1), MCA (1)
p.Val970Met	Missense	0.8893	0.1950	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Glu1003Ala	Missense	0.9952	0.9871	0.0000	0.0127	1	MCH (1)
p.Pro1024Ala	Missense	0.9951	0.9940	0.0005	0.0064	1	Control (1)
p.Pro1024Gln	Missense	0.9941	0.9868	0.0012	0.0127	1	MCD (1)
p.Pro1057Leu	Missense	0.9984	0.9817	0.0007	0.0064	1	MCH (1)
p.Ala1063Thr	Missense	0.5780	0.1951	0.0036	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg1123Ser	Missense	0.9913	0.9708	0.0000	0.0064	1	MCD (1)
p.Lys1140*	Nonsense	0.9972	0.9927	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Ala1213Thr	Missense	0.9993	0.9921	0.0029	0.0127	2	MCH (1), N/D (1)
p.Lys1245Asn	Missense	0.9989	0.9842	0.0004	0.0064	1	MCH (1)
p.Ala1284Val	Missense	0.9991	0.9937	0.0012	0.0064	1	MCA (1)
p.Glu1303Lys	Missense	0.9994	0.9886	0.0011	0.0064	1	MCD (1)
p.Ser1337Leu	Missense	0.9991	0.9894	0.0012	0.0127	2	Control (1), MCD (1)
p.Asp1355Ala	Missense	0.9937	0.9925	0.0012	0.0064	1	MSC (1)
p.Lys1384Glu	Missense	0.9992	0.9925	0.0000	0.0064	1	MSC (1)
p.Arg1386Gln	Missense	0.9996	0.9836	0.0011	0.0127	2	MCH (2)
p.Leu1417delinsGlnIle	Indel	N/A	N/A	0.0000	0.0064	1	MCH (1)

Variante	Tipo	DANN	FATHMM	GnomAD	HIC	Ptes.	Fenotipo
p.Lys1433Serfs*10	Frameshift	N/A	N/A	0.0004	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg1449Lys	Missense	0.9977	0.9958	0.0008	0.0064	1	MCD (1)
p.Pro1492Leu	Missense	0.9907	0.3471	0.0012	0.0064	1	MCD (1)
p.Ala1493Val	Missense	0.9969	0.2186	0.0000	0.0064	1	ND (1)
p.Leu1501Val	Missense	0.9798	0.9634	0.0011	0.0064	1	MCD (1)
p.Ala1508Ser	Missense	0.9862	0.9906	0.0000	0.0064	1	Control (1)
p.Val1516Ala	Missense	0.9981	0.9927	0.0033	0.0191	2	MCNC (1), Control (1)
p.Val1524Met	Missense	0.9725	0.2198	0.0012	0.0127	2	MCD (1), Control (1)
p.Arg1534Ser	Missense	0.9979	0.9870	0.0013	0.0064	1	MCH (1)
p.Asn1556His	Missense	0.9826	0.4811	0.0000	0.0064	1	MCH (1)
p.Arg1568Cys	Missense	0.9993	0.9376	0.0016	0.0064	1	MCH (1)
p.Gln1575His	Missense	0.9966	0.9356	0.0000	0.0064	1	MCA (1)
p.Val1576Gly	Missense	0.9953	0.9490	0.0000	0.0191	3	MCH (1), Control (2)
p.Pro1583Leu	Missense	0.9993	0.9758	0.0014	0.0064	1	MCNC (1)
p.Arg1590Gln	Missense	0.9996	0.9831	0.0029	0.0064	1	Control (1)
p.Arg1597*	Nonsense	0.9935	0.8755	0.0020	0.0127	2	MCH (1), MCR (1)
p.Thr1605Asn	Missense	0.9919	0.9365	0.0004	0.0064	1	MCH (1)
p.Ala1611Thr	Missense	0.9993	0.9357	0.0004	0.0064	1	Control (1)

DANN: Deep Neural Network (DNN) for annotating genetic variants (July, 2015) [91]; FATHMM: Functional Analysis through Hidden Markov Models, coding (v2.3) [92]; HIC: frecuencia de la variante en la cohorte de Health In Code; gnomAD: frecuencia de la variante en la base de datos gnomAD (controles); MCH: miocardiopatía hipertrófica; MCD: miocardiopatía dilatada; MCA: miocardiopatía arritmogénica; MCNC: miocardiopatía no compactada; MCR: miocardiopatía restrictiva; MSC: muerte súbita cardíaca; cont: control

4.3.2 Enriquecimiento de las variantes candidatas en FHOD3 en MCH

En la figura 4.2 se puede observar la distribución de las variantes identificadas en la proteína FHOD3 en la fase I del estudio; cada fenotipo es representado mediante un esquema de colores. En la parte inferior (panel B) se representa el número de individuos para cada posición del aminoácido correspondiente en la base de datos gnomAD (número de controles).

La prevalencia de las variantes candidatas en *FHOD3* fue mayor en la cohorte de probandos con MCH (2.32 %; 47 variantes en 74 de 3,189 probandos) que en los controles utilizados de nuestra cohorte (0,65 %; 17 variantes en 18 de 2,777) o de los controles de la base de datos gnomAD (0,76 %; 587 variantes en 1,049 de 138,606 individuos). Esto representó un O.R. de 3.64 (IC95 %: 2.17-6.11; $p < 0.001$) y 3.02 (IC95 %: 2.45-3.95; $p < 0.001$) respectivamente (figura 4.3).

Frec. MCH	Frec. Controles	OR	<i>p</i>
2.32 % (74/3,189)	0.65 % (18/2,777) ¹	3.64 (IC95 %: 2.17-6.11)	<0.001
	0.76 % (1,049/138,606) ²	3.02 (IC95 %: 2.45-3.95)	<0.001

Cuadro 4.3: Frecuencia de variantes candidatas en probandos con MCH y en controles pertenecientes a la cohorte de pacientes sin miocardiopatías (1) y de la base de datos gnomAD (2).

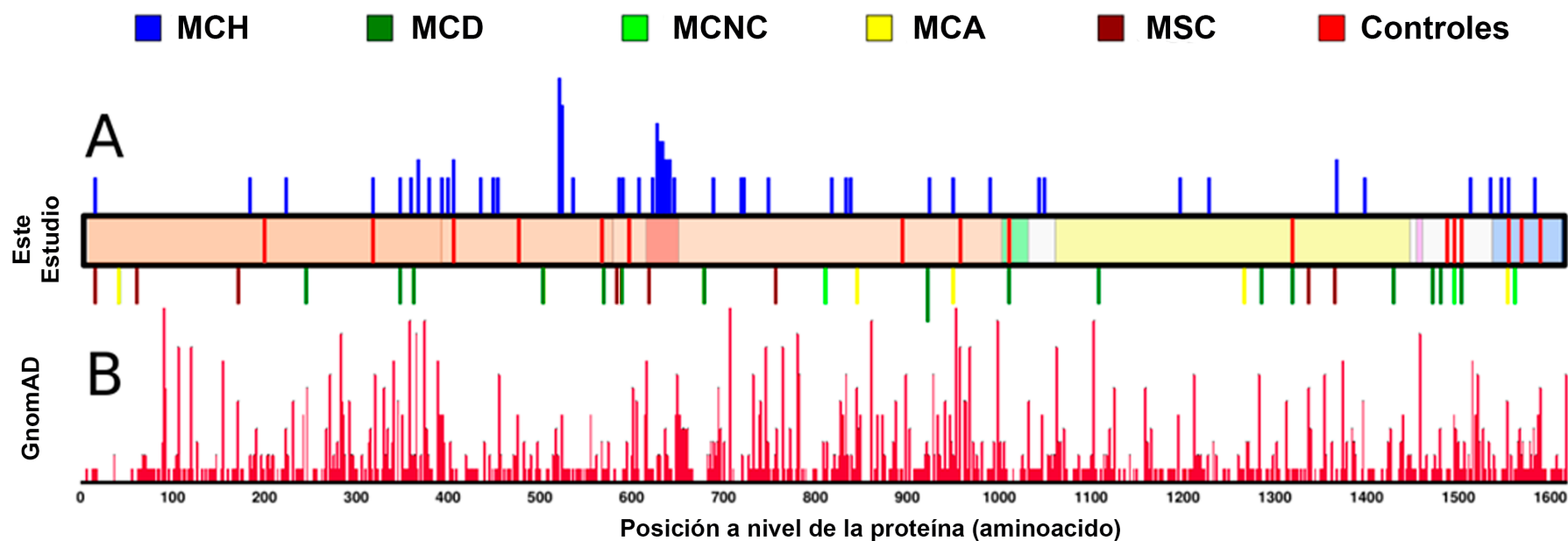


Figura 4.2: Distribución a nivel de la proteína de las variantes candidatas identificadas en FHOD₃.

En el panel A se observan cada una de las variantes identificadas en la fase I del estudio a través de los residuos de la proteína FHOD₃. Se representa en colores cada uno de los fenotipos identificados: por encima, en azul, los probandos con un fenotipo de MCH. Abajo, en diferentes colores, aquellos con otras miocardiopatías diferentes a la MCH. Por último, dentro de la proteína, en rojo, la frecuencia de los controles internos (pacientes sin evidencia de miocardiopatía).

En el panel B se observa al número de controles identificados en la base gnomAD a nivel de cada residuo de la proteína, lo que sirve para determinar áreas sujetas a mayor o menor conservación (espacios vacíos).

De los 74 probandos con diagnóstico de MCH, 14 fueron excluidos porque eran portadores de variantes adicionales potencialmente relacionadas con el fenotipo en otros genes: 12 de 74 (16,2 %) presentaban una variante patogénica o probablemente patogénica (nueve en *MYBPC3* y tres en *MYH7*) y 2 de 74 (2,7 %) una variante de significado clínico desconocido (uno en *MYBPC3* y uno en *MYL2*) (Cuadro 4.4).

Fenotipo	Variante FHOD3	Gen	Variante	Efecto	Descrita	Patogenicidad
MCH	p.Ala225Ser	<i>MYBPC3</i>	p.Arg810His	Missense	Yes	Patogénica
MCH	p.Thr410Met	<i>MYH7</i>	p.Arg723Cys	Missense	Yes	Patogénica
MCH	p.Thr440Ala	<i>MYBPC3</i>	p.Trp792*	Nonsense	Yes	Patogénica
MCH	p.Ser458Thr	<i>MYBPC3</i>	p.Trp191*	Nonsense	No	Patogénica
MCH	p.Thr596Ala	<i>MYBPC3</i>	c.2308+1G>A	Splicing	Yes	Patogénica
MCH	p.Glu758Lys	<i>MYBPC3</i>	p.Leu1258*	Nonsense	No	Patogénica
MCH	p.Ala1213Thr	<i>MYH7</i>	p.Arg463Cys	Missense	Yes	Patogénica
MCH	p.Lys1245Asn	<i>MYBPC3</i>	p.Trp196*	Nonsense	Yes	Patogénica
MCH	p.Thr1605Asn	<i>MYBPC3</i>	p.Arg495Gly	Missense	Yes	Patogénica
MCH	p.Leu731Pro	<i>MYBPC3</i>	p.Arg17Gln	Missense	Yes	VUS
MCH	p.Lys1433Serfs*10	<i>MYBPC3</i>	p.Arg17Gln	Missense	Yes	VUS
MCH	p.Val454Gly	<i>MYH7</i>	p.Gly708Asp	Missense	No	Posible
MCH	p.Gln728Pro	<i>MYL2</i>	p.Glu134Ala	Missense	Yes	VUS
MCH	p.Ser936Thr	<i>MYBPC3</i>	p.Pro794Leu	Missense	No	VUS

Cuadro 4.4: Probandos excluidos del estudio debido a ser portadores de otras variantes relevantes o potencialmente relevantes en genes sarcoméricos

4.3.3 *Evaluación de cosegregación familiar de las variantes candidatas - descripción de las familias*

Finalmente, 49 probandos con un fenotipo de MCH reclutados de 27 centros diferentes aceptaron participar en la fase de segregación del estudio. Los mismos eran portadores de alguna de las 27 variantes candidatas en FHOD3, como se muestra en el diagrama de flujo del estudio (Figura 4.3).

La evaluación clínica fue posible en los familiares de 30 probandos. La presentación fue familiar (al menos un miembro de la familia afectada) en 25 familias (83 %), y cinco casos (17%) fueron esporádicos (no había antecedentes familiares y ninguno de los familiares evaluados se encontraba afectado al momento de la evaluación clínica).

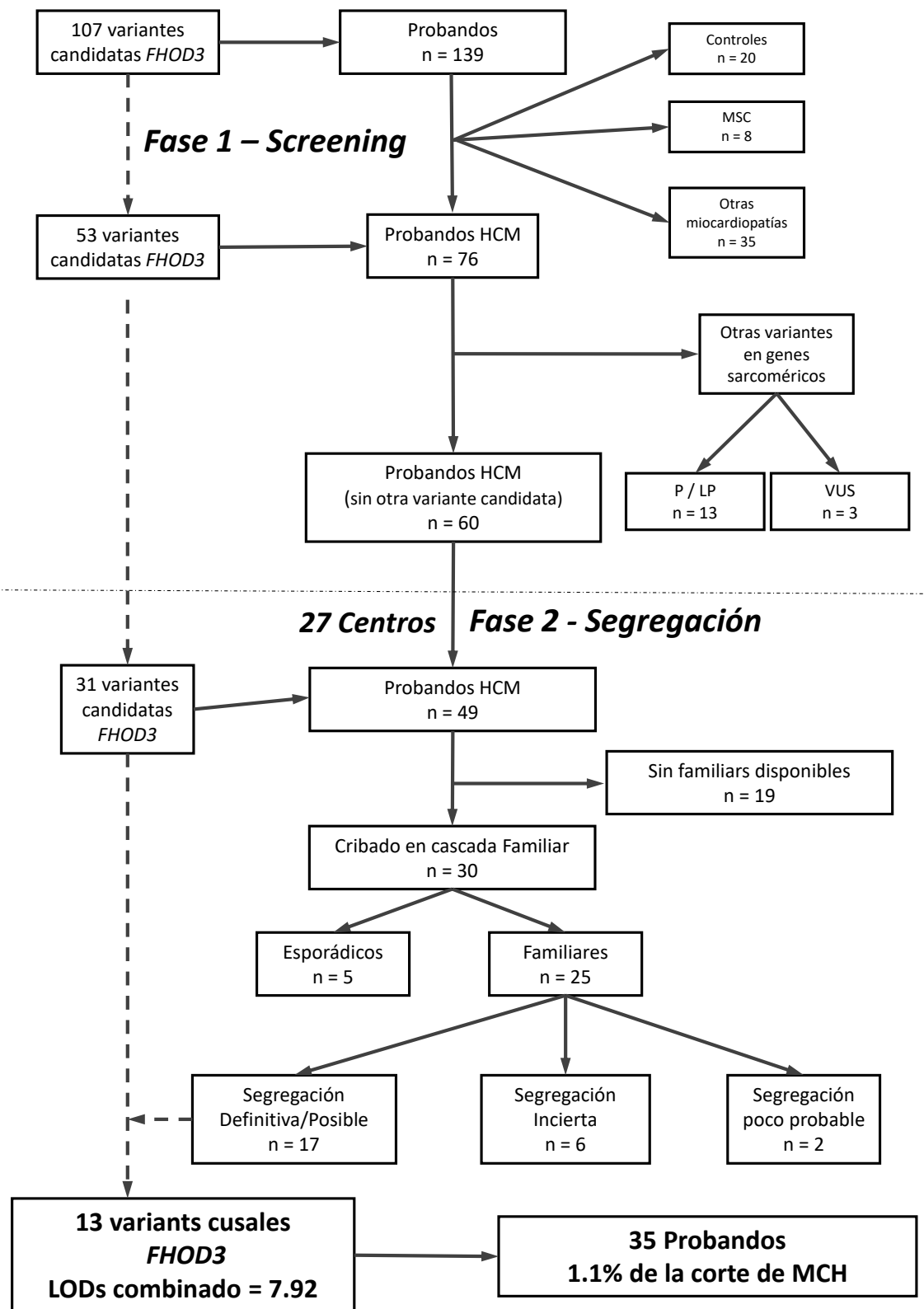







Figura 4.3: Diagrama de flujo general del estudio, dividido en las dos fases de screening (fase I), y de evaluación de la cosegregación familiar de las variantes (fase II).

Signos utilizados en los árboles familiares

	Miocardiopatía hipertrófica (afectado)	E1-/+	Heterocigoto
	Miocardiopatía hipertrófica (posiblemente afectado)		
	Fenotipo desconocido	E1+/+	Homocigoto
	No afectado		
	Miocardiopatía no compactada (afectado)	E1-/-	Salvaje (no portador)

Acrónimos utilizados en las tablas (características clínicas de los portadores)

MCH = miocardiopatía hipertrófica
 MCNC = miocardiopatía no compactada
 HSA = hipertrofia septal asimétrica
 FA = fibrilación auricular
 DAI = desfibrilador automático implantable
 VI = ventrículo izquierdo
 ACV = accidente cerebrovascular
 NYHA = clase funcional de la New York Heart Association
 FE = fracción de eyección
 MCP = marcapasos
 TVNS = taquicardia ventricular no sostenida
 MS = muerte súbita
 ICC = insuficiencia cardíaca congestiva

4.3.4 Variante p.Tyr528Ser

La variante p.Tyr528Cys fue la primera variante en el gen *FHOD3* que demostró cosegregar con el fenotipo de MCH. La misma fue identificada en seis probandos.

Cuatro de estos probandos provenían de la misma región de España (Mula, Murcia). Un análisis genealógico tras analizar la información disponible en el registro civil demostró que eran descendientes de un antepasado común nacido hace siete generaciones (Figura 4.4), a pesar de que todos habían sido evaluados como probandos de familias independientes.

En esta familia multigeneracional, la variante cosegregaba con la enfermedad con el puntaje LOD más alto (3.82) para una familia individual. De echo, este valor ya se considera significativo (LODs mayor de 3) estableciéndose como probada la cosegregación de la variante con el fenotipo.

De los 23 portadores de la variante, solo 7 no habían desarrollado el fenotipo cuando fueron evaluados; todos ellos eran menores de 30 años, a excepción de dos mujeres de 64 y 42 años. En general, la mayoría de los portadores desarrollaron una hipertrofia de leve a moderada, y ninguno de ellos presentó una hipertrofia masiva.

Llamaba la atención que 5 de los portadores presentaban además de la miocardiopatía hipertrófica hipertrabeculación ventricular. Alguno de los pacientes cumplían criterios de no compactación, y de hecho dos de ellos habían sido diagnosticados con este fenotipo.

Se describen pocos eventos en esta familia: un paciente de 53 años presentó un choque apropiado del DAI (desfibrilador automático implantable), mientras que dos varones de 52 y 54 años -este último también con diagnóstico de fibrilación auricular (FA)- presentaron un ACV (accidente cerebro vascular) sin muerte.

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
	V-3	F	62/77	MCH	HSA. Disfunción severa VI.	16	NYHA IV, FA crónica.	AF. Hipertrofia VI.	-
H399	V-4	M	52/69	MCH	HSA.	23	Síncope.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	VI-4	F	34	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Anormal (Hipertrofia VI?)	-
	VI-6	F	16/43	MCH/MCNC	HSA. MCNC.	14	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	VII-1	M	13/18	MCNC	MCNC	11	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H18	V-12	M	65/79	MCH	HSA.	24	NYHA II, FA crónica.	AF. Hipertrofia VI.	-
	V-9	M	77/86	MCH	HSA.	22	Angina, Síncope.	Sinusal. Normal.	-
	VI-12	F	42	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
	VI-14	F	34/52	MCH/MCNC	HSA.MCNC.	24	NYHA II. DAL.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	VI-16	F	64	No afectado	No hipertrofia	8	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
	VI-18	M	45/58	MCH	HSA.	16	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	ACV (52a)
	VI-20	M	44/64	MCH	HSA. Hipertro- beculación.	28	NYHA II, FA crónica.	AF. Hipertrofia VI.	ACV (54a)
	VII-12	M	24	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
	VII-7	M	24/36	MCH	HSA. Hipertro- beculación.	20	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	VII-8	F	34/34	MCNC	MCNC	11	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
VII-9	F	30	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-	
H1563	V-2	M	68/71	MCH/MCNC (?)	Concéntrica. Hi- pertrabeculación	13	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	VI-1	M	42/45	MCH	HSA.	15	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	VI-2	F	38/42	MCR (?)	Llenado restrictivo	10	NYHA III	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	VI-3	F	38/41	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H315	V-8	F	50/78	MCH	HSA. Disfunción sistólica (FE:45%)	20	NYHA III, FA crónica. DAI 71y.	MCP.	-
	VI-9	M	31/57	MCH	HSA.	18	NYHA II, Síncope. DAI 49y.	Sinusal. Hipertrofia VI.	Choque apropiado DAI (53a)
	VII-4	F	29	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-

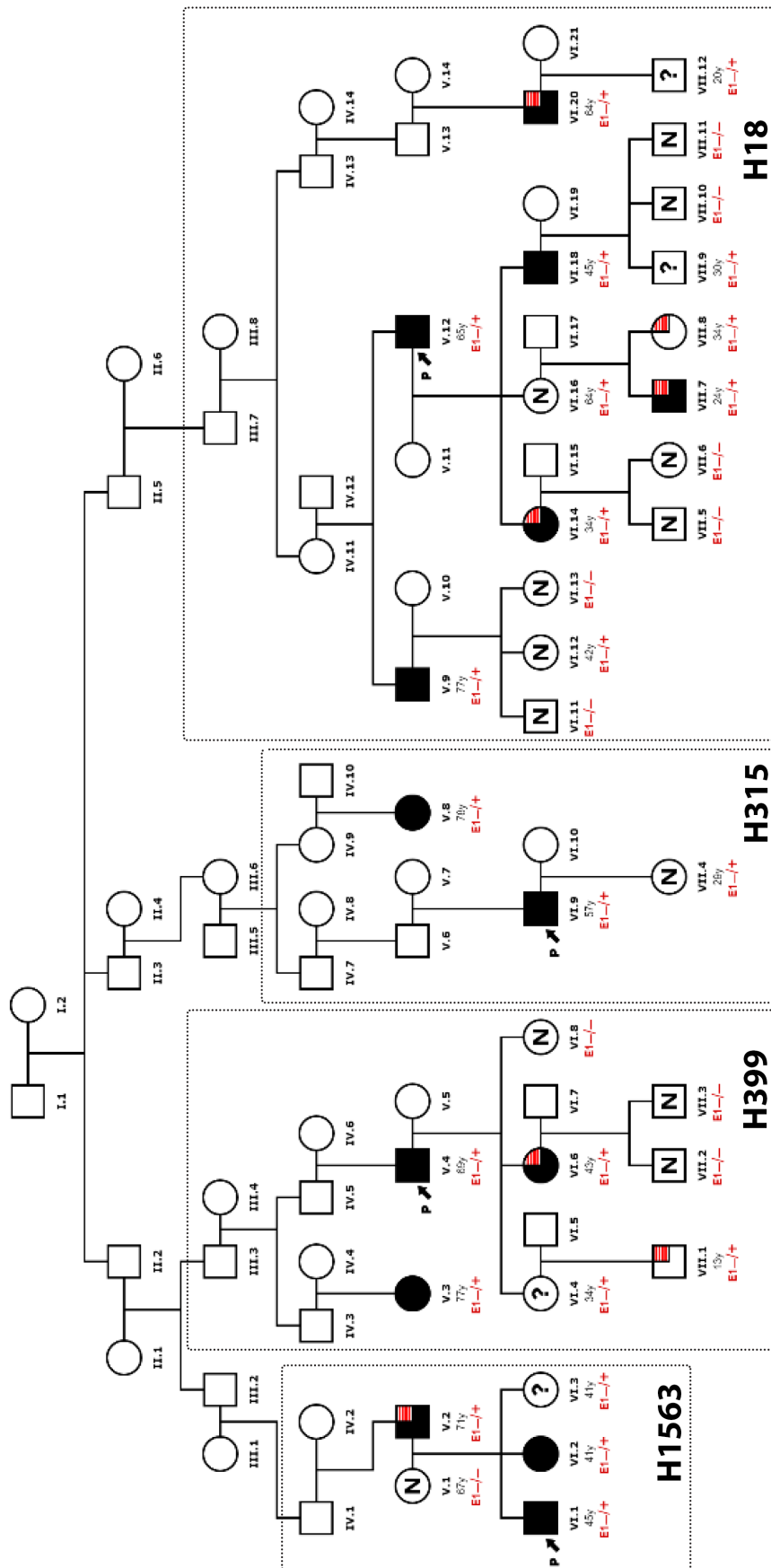


Figura 4.4: Familia multigeneracional portadora de la variante p.Tyr528Ser

Los otros dos probandos fueron remitidos por centros del Reino Unido y Dinamarca.

En la familia Danesa el probando había sido diagnosticado a los 35 años, y en su última evaluación a los 61 años presentaba una hipertrofia septal asimétrica de 20 mm; se le había implantado un DAI por el alto riesgo, debido a que había presentado episodios de TVNS (taquicardia ventricular no sostenida). Otros tres familiares fueron evaluados, los cuales se encontraban hasta ese momento no afectados: su hermana de 58 años, y una hija de 38 años eran no portadoras de la variante. Su otra hija de 28 años se encontraba asintomática, y hasta ese momento no había desarrollado el fenotipo pese a ser portadora.

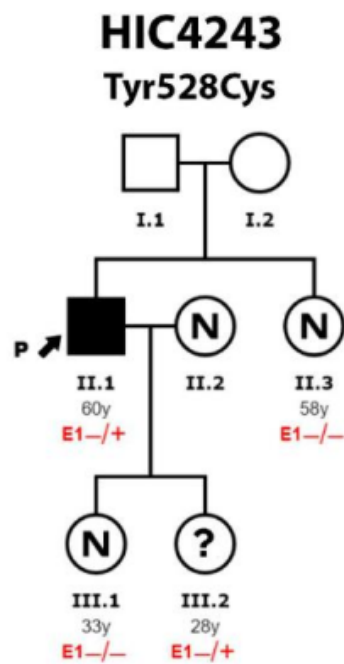


Figura 4.5

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H4243	II-1	F	35/61	MCH	HSA.	20	NYHA II, TVNS. DAI.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	III-2	M	28	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-

En la familia restante del Reino Unido solo tenemos información del probando, ya que no fue evaluada la cosegregación familiar de la variante al no estar disponibles los familiares para su evaluación. Se trataba de una mujer de 51 años, que se encontraba sintomática por disnea en clase II, y había evolucionado con disfunción y dilatación del VI, presentando un ACV a los 50 años.

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H3466	II-2	F	49/51	MCH	HSA. Disfunción y dilatación VI (58 mm).	16	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	ACV (50 a)

4.3.5 Variante p.Ser527del

La variante p.Ser527del, que afecta al residuo anterior a p.Tyr528 fue la variante identificada en un mayor número de familias: se detectó en 12 probandos con MCH de diferentes áreas geográficas de España, Dinamarca y el Reino Unido.

Ninguno de estos probandos tenía variantes adicionales en genes sarcoméricos que pudieran explicar la enfermedad, y se confirmó la cosegregación con el fenotipo en las 5 familias con familiares disponibles para su evaluación.

H2858

La familia más grande (H2858) provenía de Dinamarca, en donde la cosegregación fue evaluada en 9 miembros de la familia, cosegregando la variante con el fenotipo, con un LODs de 0.88. Todos los portadores de la variante se encontraban afectados, a excepción de una mujer de 53 años que no había expresado el fenotipo.

Dos de los portadores habían presentado eventos: un hombre con una MS a los 32 años, con diagnóstico de MCH en la autopsia; y una mujer de 58 años que murió por insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), con un diagnóstico de MCH septal asimétrica, aunque también tenía una valvulopatía reumática (estenosis mitral) que puede haber contribuido a esta evolución clínica.

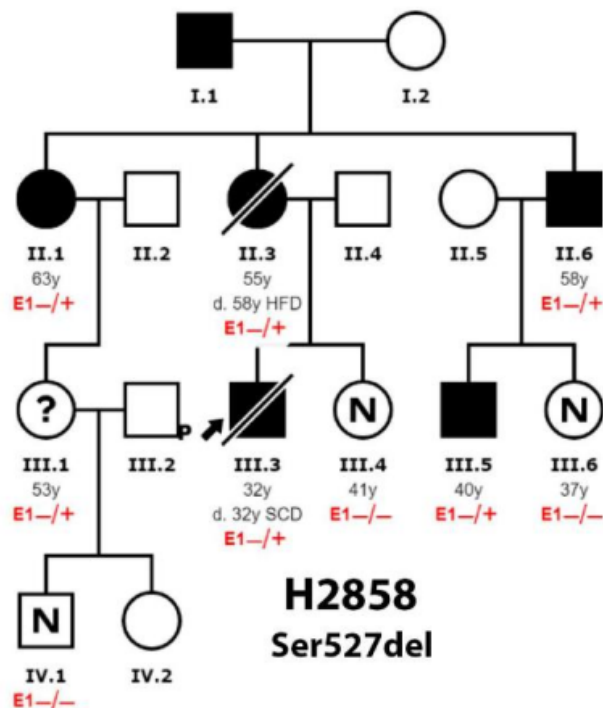


Figura 4.6

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H2858	II-1	F	63/74	MCH	HSA.	19	FA paroxística.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	II-3	F	55/58	MCH	HSA. Disfunción severa VI.	N/A	NYHA IV, FA paroxística. TVNS	Sinusal. Hipertrofia VI.	Muerte ICC (58a)
	II-5	M	58/65	MCH	HSA.	13	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
	III-1	F	53	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
	III-5	M	32/32	MSC	Disarray e hipertrofia (autopsia)	-	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	MSC (32a)
	III-8	M	40/40	MCH	HSA.	18	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

H2768

En la familia H2768, la variante también cosegregaba con la enfermedad.

Existían 3 portadores en 3 generaciones diferentes, todos ellos afectados con una MCH septal asimétrica (el menor presentaba también signos de hipertrabeculación); el abuelo de la familia, de 75 años, había presentado episodios de TVNS y FA. Una mujer de 16 años no portadora se encontraba no afectada.

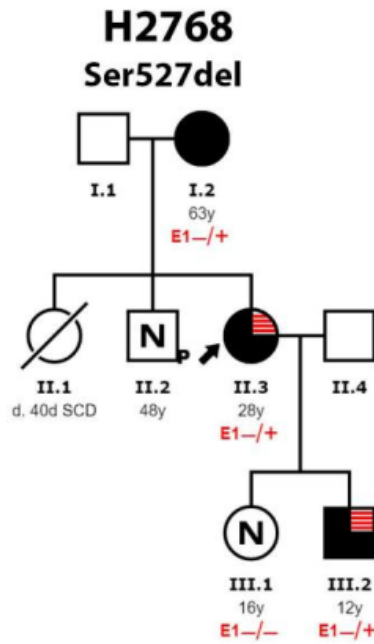


Figura 4.7

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H2768	II-1	F	40	MSC	No hipertrofia	-	-	N/A	MSC (40 a)
	II-3	F	28/47	MCH	HSA.	20	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	II-3	F	63/75	MCH	HSA.	20	NYHA II, FA paroxística. TVNS	AF. Hipertrofia VI.	-
	III-2	M	05-dic	MCH	HSA. Hipertra- beculación.	14	Síncope.	Sinusal. Normal.	-

H7217

La variante p.Ser527del también cosegregaba con la enfermedad en la familia H7217, con tres portadores afectados de dos generaciones diferentes, también todos con una hipertrofia septal asimétrica sin un fenotipo severo, a excepción del mayor de la familia, que también había presentado FA y TVNS.

Había dos mujeres portadoras en la generación inferior (nietas) que no habían desarrollado el fenotipo con 15 y 13 años respectivamente.

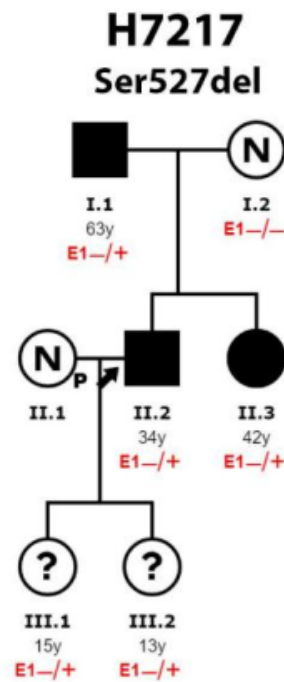


Figura 4.8

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H7217	I-1	M	63/80	MCH	HSA. Disfunción severa VI.	N/A	NYHA II, FA crónica. TVNS	AF. Hipertrofia VI.	-
	II-2	M	39/46	MCH	HSA.	15	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	II-3	F	42/42	MCH	HSA.	14	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	III-1	M	15	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
	III-2	F	13	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-

H3868 y H3504

En las otras dos familias con información disponibles se evaluaron un número menor de miembros, pero en ninguna de ellas hubo información que pusiera en duda el carácter causal de la variante.

En la primera madre e hijo eran portadores y se encontraban afectados, con 73 y 34 años respectivamente. Este último era el probando, presentando una hipertrofia de 26 mm a nivel septal, y episodios previos de TVNS.

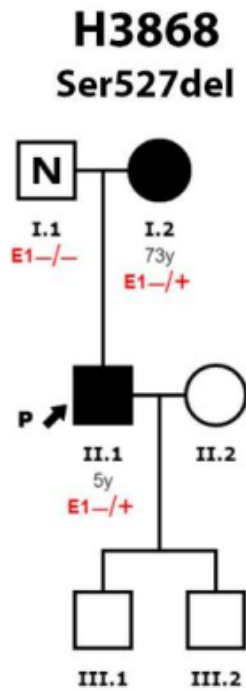


Figura 4.9

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H3868	I-1	F	73/73	MCH	Apical	14	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	II-1	M	32/34	MCH	HSA.	26	TVNS	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

En la familia H3504 las afectadas y portadoras eran madre e hija (55 y 33 años). La primera tenía un fenotipo de alto riesgo, con obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo (OTSVI) y movimiento anterior sistólico de la válvula mitral (MAS), habiendo requerido el implante de DAI por TVNS documentadas en el estudio Holter.

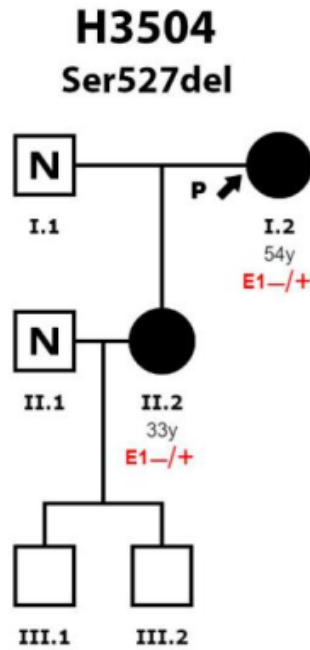


Figura 4.10

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H3504	I-2	F	54/55	MCH	HSA. OTSVI. SAM	22	NYHA III, TVNS, DAI	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	II-4	F	33/33	MCH	Apical	16	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Probandos aislados sin evaluación de la cosegregación familiar

Por último, se describen las familias en donde solamente tenemos información de los probandos de las familias en los que no hubo familiares disponibles para la evaluación de la cosegregación familiar de las variantes.

Como se puede observar en la tabla, todos tenían hipertrofias septales asimétricas de leves a moderadas, presentando una mujer de 60 años el fenotipo más severo, con 24 mm de espesor a nivel del septum interventricular (SIV) y la presencia de FA y TVNS.

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H4378	I-1	M	57/60	MCH	HSA.	20	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
H5086	I-1	M	66/66	MCH	HSA.	23	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
H5087	I-1	F	59/60	MCH	HSA.	24	NYHA II, FA crónica. TVNS	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
H5314	I-1	M	58/60	MCH	HSA.	?	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
H8554	I-1	M	24/24	MCH	HSA.	18	Síncope.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

4.3.6 Variantes localizadas a nivel de la hélice superenrollada de los residuos 622-655

Entre las variantes restantes, siete se agruparon en una hélice superenrollada muy conservada (aminoácidos 622-655, Figura 4.11).

El OR para el desarrollo de MCH ante la presencia de una variante candidata en FHOD3 en este dominio fue de 21.8 contra los controles (IC95 %: 1.3-37.9; $p < 0.001$) y 14.1 contra individuos de la base de datos gnomAD (IC95 %: 6.9-28.7; $p < 0.001$), lo que representa una clara sobrerrepresentación de este fenotipo en la región.

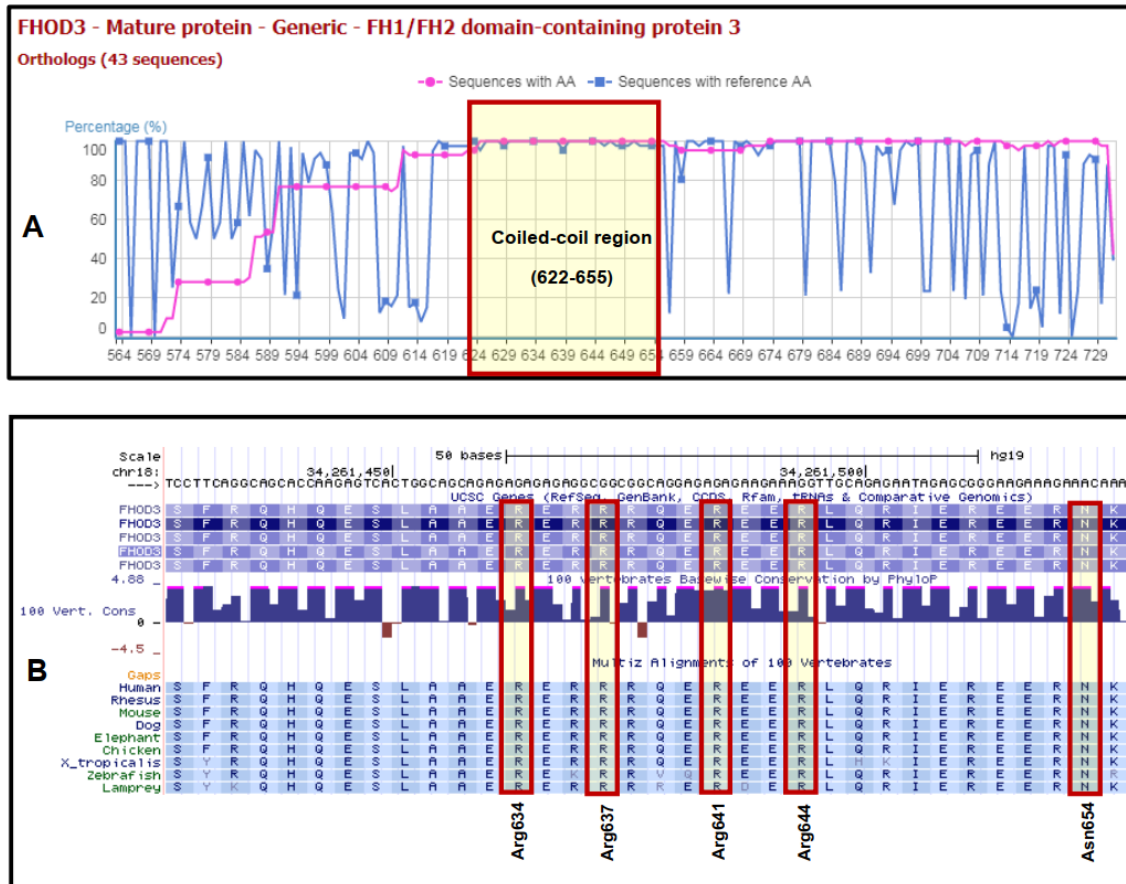


Figura 4.11: Panel A: Conservación después de la evaluación de 43 secuencias de ortólogos de FHOD3. La línea rosa muestra el % de secuencias con aminoácidos disponibles para el análisis, siendo 100 % en el caso de región en espiral de FHOD3. La línea azul muestra el % de secuencias que contiene el aminoácido de referencia (los residuos más conservados están presentes en el 100 % de las secuencias). Se puede observar cómo la región de la espiral está extremadamente conservada, en contraste con las áreas circundantes.

Panel B: conservación de los residuos de la secuenciación de referencia de la región de la espiral, considerando 8 especies. Los residuos afectados por variantes consideradas patogénicas/probablemente patogénicas que se detectaron en los probandos de MCH se señalan con signos rojos.

Variante *p.Arg637Pro*

En esta familia el probando fue diagnosticado de MCH en una evaluación pre-competitiva a los 12 años de edad.

Su padre, también portador de la variante, se encontraba afectado al ser sometido al screening clínico, a los 42 años de edad (una hipertrofia septal asimétrica de 22 mm).

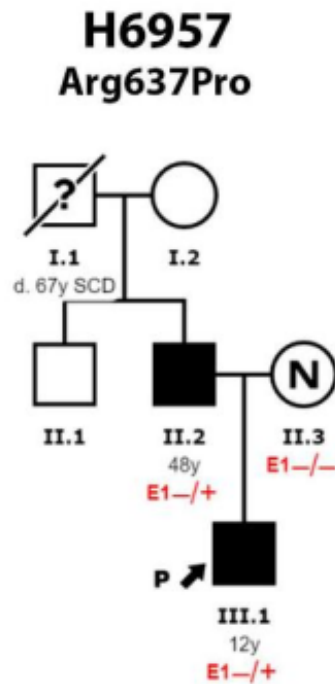


Figura 4.12

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H6957	II-2	M	42/43	MCH	HSA.	22	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	III-1	M	12/13	MCH	?	?	?	?	-

p.Arg637Gly

Afectando al residuo 637 también detectamos a esta variante, *p.Arg637Gly*, que cosegregaba en esta familia Española.

En realidad el caso índice de la familia fue un paciente de 39 años que murió súbitamente, con una autopsia en donde se constató hipertrofia ventricular y fibrosis, con un diagnóstico probable de MCH.

Al evaluarse la familia, se constató que tanto su padre como su hermano se encontraban afectados. El estudio genético reveló que ambos eran portadores de la variante (el padre fue quien se realizó el estudio amplio por NGS).

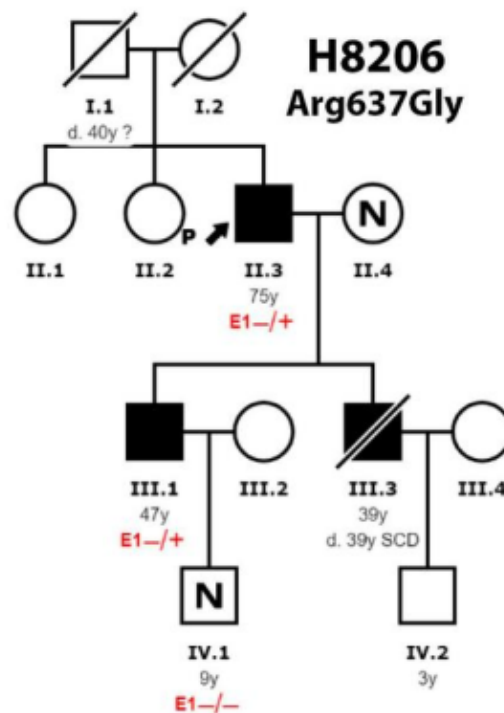


Figura 4.13

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H8206	II-3	M	75/76	MCH	HSA.	14	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	III-1	M	48/48	MCH	HSA	18	Asintomático	Sinusal. Norma	-
	III-3	M	39/39	MSC; MCH (?)	Fibrosis e hipertrofia (autopsia)	-	MSC	-	MSC (39a)

Por último, otros dos probandos fueron identificados portando esta variante, aunque no se pudieron evaluar a sus familiares.

Ambos Presentaban un fenotipo leve, sin eventos en el seguimiento. No existían en el estudio genético amplio realizado otras variantes que pudiesen explicar el fenotipo.

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H4961	II-1	M	48/50	MCH	HSA.	19	Asintomático.	Sinusal. IRBBB	-
H9904	II-1	M	44/62	MCH	HSA.	15	TVNS	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Variante p.Arg641Ser

La última variante de la región en la que se pudo determinar la cosegregación familiar fue p.Arg641Ser.

El probando fue un hombre al que se le diagnosticó la MCH tras sufrir una MSC abortada, por lo que se le implantó un DAI. El espesor septal no era severo, de 18 mm.

Su padre, también portador de la variante, había sufrido un ACV a 85 años, y presentaba una MCH septal asimétrica obstructiva, aunque con un espesor no tan importante (17 mm).

Tres hermanos del probando (dos mujeres y un varón), y su hija no se encontraban afectados, y ninguno era portador de la variante.

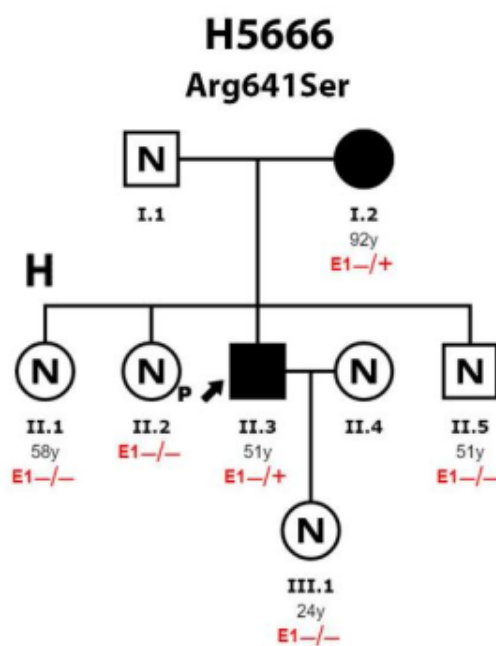


Figura 4.14

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H5666	I-2	F	91/92	MCH	HSA. OTSVI.	17	NYHA II, ESV frec.	Sinusal. BAV 1°	ACV(85a)
	II-3	M	45/51	MCH	HSA.	18	DAI.	Sinusal. Hipertrofia VI.	MSC (abortada)

También la variante fue identificada en otro probando en el que no se pudo evaluar la cosegregación familiar. Este sí tenía un fenotipo severo, habiendo sido diagnosticado muy precoz en la niñez, con 7 años. A los 19 años presentaba una MCH septal asimétrica masiva (34 mm de máximo espesor septal). Se le había implantado un DAI debido a registrarse una TVNS en el seguimiento.

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H1434	II-1	M	7/19	MCH	HSA.	34	TVNS. DAI.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Otras variantes localizadas en la región de en las que no fue posible evaluar la cosegregación familiar

Por ultimo se reportan las variantes de la región en donde solo se identificaron probandos en los que no estaban disponibles sus familiares para realizar el estudio de cosegregación. Como puede observarse en la tabla, algunos cambios de residuos similares se habían registrado en variantes muy cercanas, como es el caso de las variantes p.Arg634Gly, y p.Arg644Ser (esta última variante identificada en dos probandos diferentes).

Estas variantes fueron consideradas posteriormente como posiblemente asociadas a la enfermedad, ya que se localizarían en una región considerada un cluster de mutaciones patogénicas, encontrándose enriquecidas las mismas en la subpoblación de MCH con respecto a los controles. Además, los predictores bioinformáticos sugerían un efecto deletéreo, y cambios similares en la región ya habían sido considerados causales de enfermedad.

La variante p.Asn654Lys, perteneciente también a la región, fue identificada en otro probando con MCH.

En la siguiente tabla se describen las características clínicas de los portadores de estas variantes.

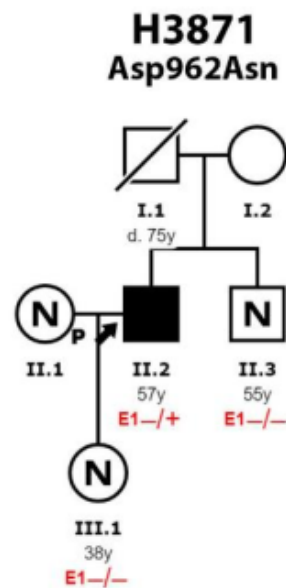
Variante	Probando	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
p.Arg634Gly	H3889	II-1	F	61/63	MCH	HSA.	23	TVNS	Sinusal. BAV 1°.	-
p.Arg644Ser	H2262	I-II	F	54/63	MCH	HSA. OTSVI.	31	NYHA II. DAI.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
p.Arg644Ser	H3667	II-1	F	18/18	MCH	HSA.	28	NYHA II, Síncope.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
p.Asn654Lys	H4821	II-1	M	23/23	MCH	HSA.	?	?	?	-

4.3.7 Portadores de variantes en otras regiones del gen consideradas posiblemente causales luego de que se evaluara la cosegregación familiar

Variante p.Asp962Asn

Esta variante fue identificada en dos probandos de dos familias diferentes.

En el primero de ellos, un varón de 57 años con una MCH apical, se evaluaron otros miembros de la familia. Su hermano de 55 años y su hija de 38 años se encontraban no afectados y resultaron ser no portadores de la variante.



Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H3871	II-2	M	57/57	MCH	Apical	?	?	?	-

El otro probando era un varón de 34 años (había sido diagnosticado a los 20 años), con una MCH concéntrica, en los que no se pudieron evaluar otros miembros de la familia.

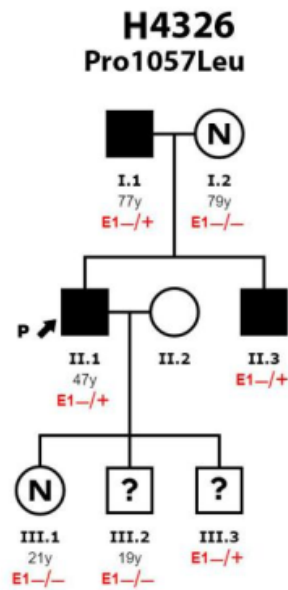
Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H220	I-1	M	20/34	MCH	Concéntrica.	13	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Variante p.Pro1057Leu

Esta variante fue identificada en una familia Española. El probando era un hombre de 49 años que había sido diagnosticado a los 45 de MCH, con una hipertrofia septal asimétrica de 25 mm.

Su padre y su hermano se encontraban afectados, con un fenotipo similar (el primero además presentaba FA), y eran portadores de la variante.

Un hijo de 16 años también era portador, aunque no evidenciaba un fenotipo evidente al momento de la evaluación; sus hermanos (una mujer y un varón de 21 y 19 años) se encontraban sanos, y eran no portadores de la variante.



Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H4326	II-1	M	46/49	MCH	HSA.	25	Asintomático.	Sinusal. HVI.	-
	I-1	M	77/77	MCH	HSA	21	Dinea CF II. FA paroxística.	HVI. FA.	-
	II-3	M	45/45	MCH	HSA	16	Asintomático.	Sinusal.	-
	III-3	M	16	No afectado	-	-	Asintomático.	Sinusal normal.	-

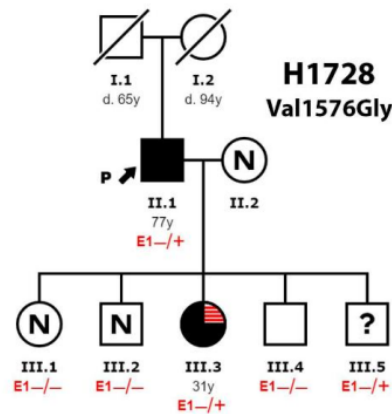
Variante p.Val1576Gly

Esta variante fue identificada en una familia Española. El probando era un hombre de 31 años que había sido diagnosticado con una miocardiopatía restrictiva, requiriendo un trasplante cardíaco a la edad de 37 años debido a su mala evolución.

Este paciente era portador también de una variante rara no sinónima en el gen *FLNC*, considerada de significado clínico incierto. Su madre era portadora de esta variante en *FLNC* y se encontraba no afectada, por lo que parece que por sí sola esta variante no era causa suficiente de enfermedad.

El padre era portador de la variante en *FHOD3* y presentaba una MCH septal asimétrica de 15 mm. Uno de los hermanos de este paciente también era portador de la variante en *FHOD3*; sus estudios no eran normales, con una hipertrofia del VI concéntrica de 12 mm que no era suficiente para considerarlo un portador no afectado.

Otros 3 hermanos habían sido evaluados, con fenotipo normal y siendo no portadores de la variante en *FHOD3*.



Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H1728	II-1	F	77/77	MCH	HSA.	15	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
	III-3	M	31/37	MCR	N/A	N/A	NYHA IV		Trasplante cardíaco (37a)
	III-5	M	39	No afectado	Hipertrofia VI concéntrica	12	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-

Variantes p.Arg1386Gln y p.Pro615Leu

Estas variantes fueron identificadas en una misma familia. Ambas fueron identificadas en el estudio del probando. Este era un varón de 51 años que había muerto súbitamente a la edad de 51 años, con una sospecha de MCH en la autopsia (presentaba hipertrofia concéntrica del VI de 15 mm, con disarray, enfermedad de pequeño vaso y fibrosis subendocárdica); se encontraba asintomático previo al episodio.

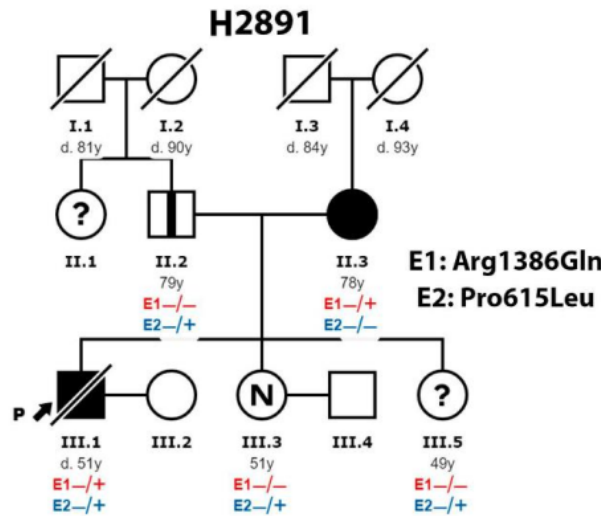
La evaluación de la cosegregación familiar de las variantes demostró que las dos se encontraban en heterocigosis compuesta en el paciente.

La madre del mismo se encontraba afectada, con una hipertrofia septal asimétrica de 16 mm, siendo portadora de p.Arg1386Gln.

El padre tenía un fenotipo borderline, con una hipertrofia de 13 mm, aunque también era hipertenso, y era portador de p.Pro615Leu.

Finalmente, se evaluaron dos hermanas del paciente, de 51 y 49 años, que presentaban un fenotipo normal (ambas tenían un SIV de 10 mm) y eran portadoras solamente de la variante p.Pro615Leu.

Ambas variantes aparecen con una muy baja frecuencia en controles. Luego de la evaluación de la familia, queda el interrogante de si ambas pudieron colaborar en este caso para el desarrollo de un fenotipo más severo en el probando, y sobre la patogenicidad de las mismas.



Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
	II-3	F	78/83	MCH	HSA.	16	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
H2891	III-1	M	51/51	MCH (?)	Concéntrica. LVH en autopsia.	15	Asintomático.	Sinusal. Normal.	MSC (51a)

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
	II-2	M	79/84	MCH	HSA.	13	NYHA II, FA crónica.	AF. Hipertrofia VI.	-
	III-3	F	51	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
	III-5	F	49	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-

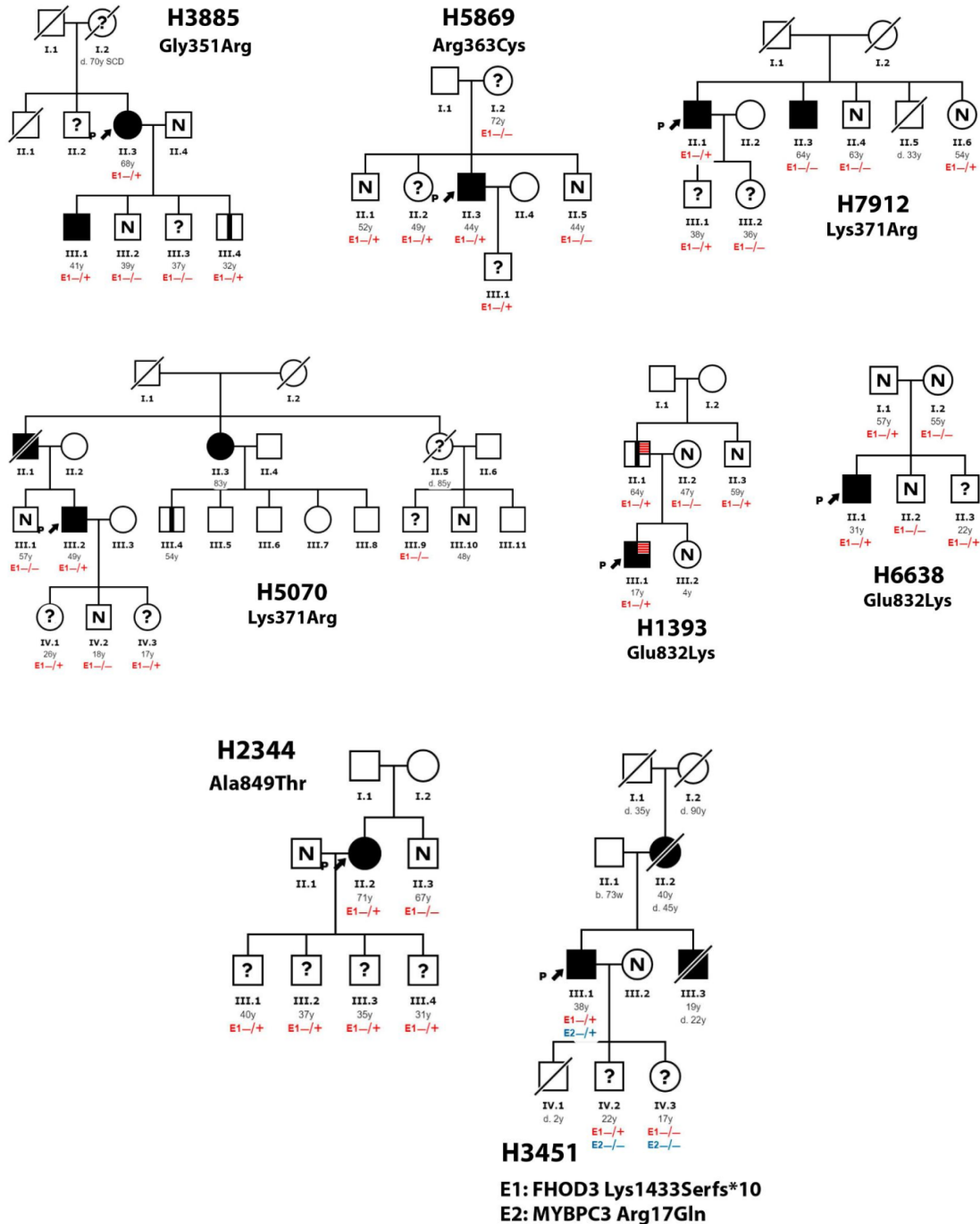
La variante p.Arg1386Gln fue identificada también en otro probando de la cohorte de MCH. Se trataba de una mujer de 70 años, con diagnóstico de una MCH septal asimétrica no obstructiva, con el antecedente de haber presentado un ACV.

No disponemos de datos familiares de esta paciente. Finalmente la variante fue considerada posiblemente patogénica luego de su evaluación en estas dos familias.

Familia	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
H7838	I-1	F	57/70	MCH	HSA.	21	Disnea CF II.	?	ACV (63 a)

4.3.8 Otras variantes que fueron evaluadas, y cuya cosegregación fue incierta o poco probable

En la siguiente figura se observan los árboles familiares de las variantes en las que no se pudo demostrar cosegregación familiar, siendo la misma incierta o poco probable.



Variante	Probando	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
p.Ala321Val	H3059	I-1	M	50/74	MCH	HSA. OTSVI. Mictomía.	N/A	NYHA III, FA crónica.	AF. Hipertrofia VI.	-
p.Gly351Arg	H3885	II-3	F	66/70	MCH	HSA. OTSVI.	17	Extrasístoles frecuentes	Sinusal. Normal.	-
		III-1	M	41/41	MCH	HSA.	14	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		III-4	M	32	No afectado	No hipertrofia	11	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
p.Arg363Cys	H5869	II-1	M	52	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		II-2	F	49	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		II-3	M	43/45	MCH	HSA. OTSVI.	19	NYHA II	Sinusal. Normal.	-
		III-1	M	17	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
p.Lys371Arg	H5070	III-2	M	48/49	MCH	HSA. OTSVI.	22	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
		IV-1	F	23	No afectado	No hipertrofia	11	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		IV-3	F	17	No afectado	No hipertrofia	9	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
p.Lys371Arg	H7912	II-1	M	59/67	MCH	Apical.	20	Asintomático.	Sinusal. Normal.	MSC aborta- da(59)
		II-6	F	54	No afectado	No hipertrofia	8	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		III-1	M	37/37	MCH/(MCNC ?)	HSA. Hipertrabe- culación.	18	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI, WPW.	-
p.Gln383His	H1405	II-2	M	55/58	MCH	HSA.	17	NYHA IV	Sinusal. Hipertrofia VI.	MSC (58a)
p.Thr410Met	H2120	I-1	M	38/38	MCH	HSA.	19	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Variante	Probando	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
p.Ala542Glu	H3607	II-2	M	63/63	MCH	HSA.	13	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
p.Val594Glu	H2210	I-1	M	64/67	MCH	HSA.	16	NYHA II. TVNS, ESV frec.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
p.Glu832Lys	H1393	I-2	M	64/66	MCH	HSA.	13	Síncope.	Sinusal. Normal.	-
		II-2	M	17/21	MCNC	HSA. LVNC.	12	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		II-4	M	59	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
p.Glu832Lys	H6638	I-1	M	56/56	MCH/MCNC (?)	HSA. Hipertrofe- culación.	12	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
		II-1	M	30/32	MCH	HSA.	13	Asintomático.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
		III-3	F	22	No afectado	No hipertrofia	-	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
p.Glu845Cys	H4702	II-1	M	20/23	MCH	Apical	15	Chest pain	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
		II-2	F	71/77	MCH	HSA. OTSVI.	22	NYHA III	Sinusal. BAV 1º.	-
p.Ala849Thr	H2344	III-1	M	42	No afectado	No hipertrofia	11	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		III-2	M	38	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		III-3	M	37	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
		III-4	M	33	No afectado	No hipertrofia	10	Asintomático.	Sinusal. Normal.	-
p.Pro1057Leu	H4326	I-1	M	46/49	MCH	HSA.	25	Asintomático.	-	-
p.Ala1063Thr	H10030	I-1	F	67/67	MCH	HSA.	14,5	NYHA II	Sinusal. Hipertrofia VI.	-

Variante	Probando	Pos.	Sexo	Diagn./Ult.Seg	Fenotipo	Tipo	Espesor Máx.	Síntomas	ECG	Evento
p.Leu1417_His 1421delinsGln	H5533	I-1	M	54/54	MCH	HSA. OTSVI. SAM	24	NYHA II, TVNS. DAI.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
p.Asn1556His	H1589	II-2	M	70/73	MCH	HSA. OTSVI.	18	Síncope.	Sinusal. Hipertrofia VI.	-
p.Arg1597*	H9122	I-1	M	75/78	MCH	HSA.	18	NYHA III. FA crónica.	MCP. Hipertrofia VI.	-

4.3.9 Cosegregación de las variantes con el fenotipo: LODs combinado

Después de la evaluación clínica y el genotipado de 129 miembros de 25 familias, se obtuvo una puntuación final combinada de LOD de 7.92, equivalente a un valor p inferior a 3×10^{-7} indicativo de una cosegregación muy fuerte (ver Cuadro 4.30).

Cuadro 4.30: Calculo del LODs combinado de las variantes causales

Familia	Variante	Genotipados	Portadores	LODs 95 %
H3885	p.Gly351Arg	5	3	0,2
H3504	p.Ser527del	2	2	0
H2768	p.Ser527del	4	3	0,16
H2858	p.Ser527del	8	5	0,88
H3868	p.Ser527del	3	2	0
H7217	p.Ser527del	6	5	0,29
H4243	p.Tyr528Cys	4	2	0,06
H1563				
H18	p.Tyr528Cys	41	22	3,82
H315				
H399				
H8206	p.Arg637Gly	3	2	0
H6957	p.Arg637Pro	3	2	0
H5666	p.Arg641Ser	6	2	1
H3871	p.Asp962Asn	3	1	0,06
H220 p.Asp962Asn				
H4326	p.Pro1057Leu	7	4	0,57
H1728	p.Val1576Gly	6	3	0,54
H2891	p.Arg1386Gln	5	2	0,54
TOTAL LOD SCORE COMBINADO				7,92

Un total de 13 variantes se consideraron patogénicas o muy probablemente patogénicas: en todas ellas había evidencia de cosegregación con MCH en al menos una familia. Las variantes causantes de la enfermedad se distribuyeron en 35 probandos con MCH sin variantes genéticas adicionales en otros genes que pudiesen explicar el fenotipo. Los probandos portadores de estas variantes representaron el 1,1 % de toda la cohorte de MCH (35 de 3.189) .

En seis familias, el análisis de segregación fue incierto y poco probable en dos (los probandos eran portadores de las variantes p.Lys371Arg y p.Glu832Lys). No fue posible determinar la patogenicidad de 14 variantes que finalmente se clasificaron como de significado clínico incierto (VUS).

Solo se identificaron dos variantes de tipo truncamiento en *FHOD3* en dos probandos con MCH: p.Lys1433Serfs*10 y p.Arg1597*. Ambas estaban presentes con frecuencias muy bajas en los controles de gnomAD (MAF % 0.002 y 0.0004, respectivamente).

La variante p.Lys1433Serfs*10 se identificó en un paciente que portaba una variante adicional, p.Arg17Gln, en *MYBPC3*. Aunque se excluyó del análisis, la segregación se evaluó en la familia, pero los resultados no fueron concluyentes (Familia H3451).

La variante sin sentido p.Arg1597 * se identificó en dos probandos: uno era un caso esporádico con un fenotipo no grave diagnosticado después de los 75 años, y el segundo era un paciente con una miocardiopatía restrictiva (la variante no cosegregaba completamente con la enfermedad en esta familia) . Ambas variantes se consideraron de significado clínico incierto.

En la tabla 4.31 se reportan todas las variantes evaluadas en la fase de cosegregación del estudio, y la clasificación final de su patogenicidad y los criterios utilizados para su determinación. Se puede observar la localización de cada una de ellas a nivel de la proteína correspondiente a la isoforma cardíaca de *FHOD3* en la figura 4.15.

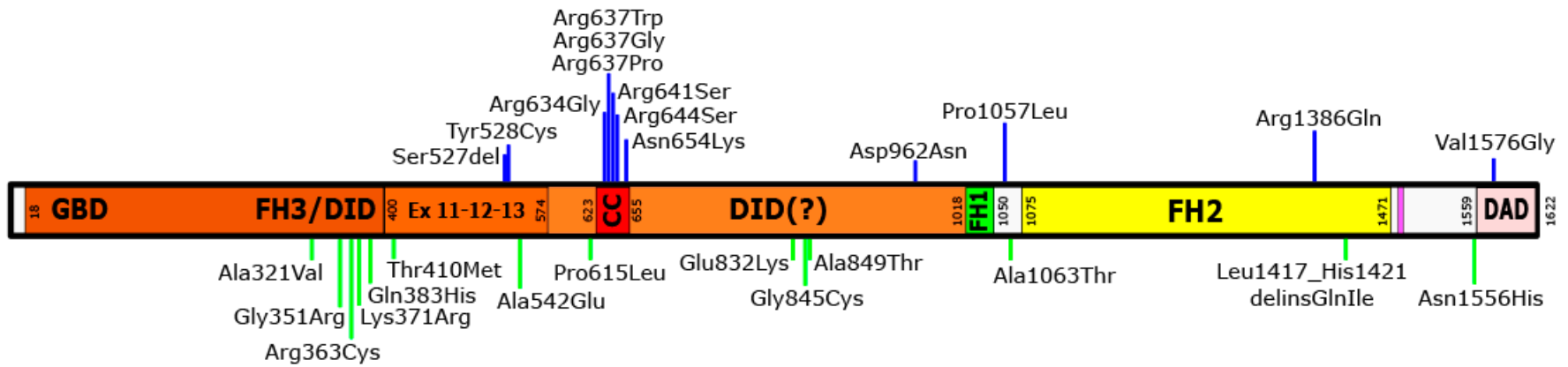


Figura 4.15: Localización de las variantes identificadas en el presente estudio en la proteína FHOD3. En la parte superior del gráfico, en azul, están representadas las variantes que fueron consideradas causales (patogénicas o posiblemente patogénicas), mientras que en la parte inferior, en verde, aquellas variantes de significado clínico incierto.

Cuadro 4.31: Clasificación final de las variantes evaluadas tras la fase II del estudio

VARIANTE	CLASIFICACIÓN	RAZONES PARA LA CLASIFICACIÓN	DOMINIO	FREC. CONTROLES (c/100,000)	DANN	FATHMM	CADD
p.Ala321Val	VUS	Identificado en un probando con MCH (H3059); no evaluada cosegregación. Identificada en un control; baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (++)	GBD/FH3	9,2	0,998292	0,95465	25,8
p.Gly351Arg	VUS	Identificado en un probando con MCH (H3885); segregación posible (+). Identificada también en una MCD (segregación no disponible). Ausente en controles; baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+/-).	GBD/FH3	4,4	0,926703	0,02937	11,49
p.Arg363Cys	VUS	Identificado en un probando con MCH (H5869); no evaluada cosegregación. Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+++).	GBD/FH3	1,6	0,999464	0,98848	35
p.Lys371Arg	VUS	Identificada en dos familias con MCH (H5070; H7912); segregación no concluyente. Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+/-).	GBD/FH3	1,4	0,902612	0,57525	6,988
p.Gln383His	VUS	Identificado en un probando con MCH (H1405); no evaluada cosegregación. Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (++)	GBD/FH3	0	0,992287	0,70538	22,4
p.Thr410Met	VUS	Identificada en dos probandos con MCH (H2120, no evaluada cosegregación; y H6131, portador de la variante patológica p.Arg723Cys en MYH7). Identificada en un control (LQTS). Baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+).	GBD/FH3	3,8	0,822468	0,83283	18,32
p.Ser527del	Patológica	Identificada en 12 probandos con MCH independientes (H2768, H3810, H2858, H3868, H4378, H5086, H5087, H5314, H3504, H7217, H8554, H8836); fuerte cosegregación (++) en 5 familias. Ausente en controles; extremadamente rara en gnomAD. Predictores bioinformáticos N/A.	Exón 11	1,6	N/A	N/A	N/A
p.Tyr528Cys	Patológica	Identificada en 6 probandos independientes con MCH(H399, H18, H315, H1563, H4243, y H3466); cosegregación definitiva (+++) en una familia. Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (++)	Exón 11	0	0,765751	0,96409	20,7
p.Ala542Glu	VUS	Identificado en un probando con MCH (H7048); no evaluada cosegregación. Ausente en controles y en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+).	-	0	0,783981	0,80274	21,2

VARIANTE	CLASIFICACIÓN	RAZONES PARA LA CLASIFICACIÓN	DOMINIO	FREC. CONTROLES (c/100,000)	DANN	FATHMM	CADD
p.Pro615Leu	VUS	Identificado en un probando con MCH (H2891) en heterocigosis compuesta con p.Arg1386Gln; segregación incierta. Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (-).	-	3,6	0,453525	0,00442	12,19
p.Arg634Gly	Posiblemente patogénica	Identificado en un probando con MCH (H3889); no evaluada cosegregación. Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (++). Localizada en una región relevante (hot-spot) de FHOD3.	Coiled coiled	0	0,997696	0,86706	27,3
p.Arg637Gly	Patogénica	Identificada en 3 probandos independientes con MCH (H4961, H8206, H9904); cosegregación fuerte (+). Ausente en controles y en gnomAD. Predictores bioinformáticos (++). Localizada en una región relevante (hot-spot) de FHOD3.	Coiled coiled	0	0,99724	0,8364	25,7
p.Arg637Trp	Posiblemente patogénica	Identificado en un probando con MCH (H9100); no evaluada cosegregación. Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+++). Localizada en una región relevante (hot-spot) de FHOD3.	Coiled coiled	2,8	0,999225	0,79656	34
p.Arg637Pro	Posiblemente patogénica	Identificado en un probando con MCH (H6957); cosegregación posible (+). Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (+++). Localizada en una región relevante (hot-spot) de FHOD3.	Coiled coiled	0	0,997542	0,98638	28,7
p.Arg641Ser	Posiblemente patogénica	Identificada en dos probandos independientes con MCH (H1434, H5666); cosegregación fuerte (+). Ausente en controles y en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+++). Localizada en una región relevante (hot-spot) de FHOD3.	Coiled coiled	0	0,997481	0,91289	24,5
p.Arg644Ser	Posiblemente patogénica	Identificada en dos probandos independientes con MCH (H2262, H3667); cosegregación fuerte (+). Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (++). Localizada en una región relevante (hot-spot) de FHOD3.	Coiled coiled	0	0,977605	0,55766	23,5
p.Asn654Lys	Posiblemente patogénica	Identificado en un probando con MCH (H4821); no evaluada cosegregación. Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+++). Localizada en una región relevante (hot-spot) de FHOD3.	Coiled coiled	0	0,998221	0,94918	29
p.Glu832Lys	VUS	Identificada en dos probandos independientes con MCH (H1393, H6638); segregación incierta (penetrancia incompleta?). Ausente en controles; frecuencia muy baja en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+++).	-	1,6	0,999418	0,99842	33
p.Gly845Cys	VUS	Identificado en un probando con MCH (H4702); no evaluada cosegregación. Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (+++).	-	0,8	0,997411	0,99304	26,6

VARIANTE	CLASIFICACIÓN	RAZONES PARA LA CLASIFICACIÓN	DOMINIO	FREC. CONTROLES (C/100,000)	DANN	FATHMM	CADD
p.Ala849Thr	VUS	Identificado en un probando con MCH (H2344); segregación incierta (caso esporádico). Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (-).	-	4	0,817056	0,08611	0,714
p.Asp962Asn	Posiblemente patogénica	Identificada en dos probandos independientes con MCH (H220, H3871); segregación posible en H3871 (+). Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (++)	-	0	0,998691	0,88875	16,5
p.Pro1057Leu	Posiblemente patogénica	Identificado en un probando con MCH (H4326); segregación muy posible (++)	-	1,4	0,998391	0,9833	23,2
p.Ala1063Thr	VUS	Identificado en un probando con MCH (H10030); segregación incierta (caso esporádico). Ausente en controles; baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (-).	-	7,2	0,578023	0,08639	7,03
p.Arg1386Gln	Posiblemente patogénica	Identificada en dos probandos independientes con MCH (H2891, H7838); segregación posible en H2891 (+). Ausente en controles; muy baja frecuencia en gnomAD. Predictores bioinformáticos (++)	FH2	2,2	0,999561	0,84555	33
p.Leu1417_His1421delinsGlnI	VUS	Identificado en un probando con MCH (H5533); cosegregación no disponible. Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos N/A.	-	0	N/A	N/A	N/A
p.Asn1556His	VUS	Identificado en un probando con MCH (H1589); no evaluada cosegregación. Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (++)	-	0	0,98255	0,76883	22,6
p.Val1576Gly	Posiblemente patogénica	Identificado en un probando con MCH (H1728); cosegregación muy posible(++). Ausente en controles y gnomAD. Predictores bioinformáticos (+). Localizada en un dominio relevante de FHOD3.	DAD	0	0,995308	0,74695	18,6
p.Arg1597*	VUS	Identificado en un probando con MCH (H9122) y otro con MCR ; no evaluada cosegregación. Ausente en controles y frecuencia muy baja en gnomAD. Predictores bioinformáticos (++)	DAD	4	0,993528	0,64804	38

4.3.10 Características clínicas de los portadores de variantes causales de MCH en FHOD3

Las características demográficas, clínicas, ecocardiográficas y electrocardiográficas de los portadores de variantes causales de MCH en el gen *FHOD3* se muestran en el cuadro 4.32.

Cuadro 4.32: Características clínicas de los portadores de variantes consideradas causales en el gen *FHOD3*

	Total (n = 70)	Varón (n = 43)	Mujer (n = 27)	valor de p
<i>Subtipo de MCH</i>				
- Septal asimétrica	35/41 (85.4 %)	22/25 (88 %)	13/16 (81.3 %)	NS
- Concéntrica	4/41 (9.8 %)	2/25 (8 %)	2/16 (12.5 %)	NS
- Apical	2/41 (6.3 %)	1/25 (4 %)	1/25 (4 %)	NS
Espesor máximo (mm)	18.8±5.4	18.9±5.4	18.6±5.6	NS
Espesor máximo > 30 mm	3/64 (4.7 %)	1/39 (2.6 %)	2/25 (8 %)	NS
Espesor máximo > 25 mm	7/64 (10.9 %)	4/39 (10.3 %)	3/25 (12 %)	NS
Dilatación VI	2/55 (3.6 %)	0/31 (0 %)	2/24 (8.3 %)	NS
DDVI (mm)	45.7±5.9	46.8±5.2	43.8±6.7	NS
Disfunción VI (FEVI < 50 %)	6/46 (13 %)	1/25 (4 %)	5/21 (23.8 %)	0.079
FEVI (%)	61.5±11.9	64.8±8.5	57.5±14.2	0.046
Hipertrabeculación	8/49 (16.4 %)	5/27 (18.5 %)	3/22 (13.6 %)	NS
Criterios de MCNC	4/49 (8.2 %)	1/27 (3.7 %)	3/22 (13.6 %)	NS
Dilatación de AI	19/39 (48.7 %)	11/22 (50 %)	8/17 (47.1 %)	NS
AI (mm)	41.7±8	44.4±8.2	38.2±7.9	0.026
OTSVI	9/42 (21.4 %)	4/24 (16.7 %)	5/18 (27.8 %)	NS
SAM	5/40 (12.5 %)	4/22 (18.2 %)	1/18 (5.6 %)	NS
Realce tardío (cardioresonancia)	11/17 (64.7 %)	6/10 (60 %)	5/7 (71.4 %)	NS
<i>Hallazgos ECG</i>				
- Sinusal	48/55 (87.3 %)	26/30 (86.7 %)	22/25 (88 %)	NS
- FA	6/55 (10.9 %)	4/30 (13.3 %)	2/25 (8 %)	NS
- Marcapasos	1/55 (1.8 %)	0/30 (0 %)	1/25 (4 %)	NS
Hipertrofia por ECG	39/49 (79.6 %)	19/27 (70.4 %)	20/22 (90.9 %)	0.076

	Total (n = 70)	Varón (n = 43)	Mujer (n = 27)	valor de p
<i>Historia de FA</i>				
Permanente	8/58 (13.8%)	5/33 (15.2%)	3/25 (12%)	NS
Paroxística	3/58 (5.2%)	0/33 (0%)	3/25 (12%)	NS
TVNS	11/41 (26.8%)	4/23 (17.4%)	7/18 (38.9%)	NS
Extrasístoles frecuentes	6/40 (15%)	3/23 (13%)	3/17 (17.6%)	NS
DAI implantado	10/58 (17.2%)	5/33 (15.2%)	5/25 (20%)	NS
<i>Historia y síntomas</i>				
Edad de diagnóstico	46.1±18.7	43.6±18.2	50.9±19.2	0.047
Hipertensión	8/43 (18.6%)	3/26 (11.5%)	5/17 (29.4%)	NS
<i>Disnea</i>				
CF II	19/59 (32.2%)	9/34 (26.4%)	10/25 (40%)	NS
CF III-IV	6/59 (10.1%)	1/34 (2.9%)	5/25 (20%)	0.069
Síncope	5/56 (8.9%)	4/31 (12.9%)	1/25 (4%)	NS
<i>Eventos</i>				
Muerte cardiovascular (total)	13/68 (19.1%)	10/41 (24.4%)	3/27 (11.1%)	NS
Muerte súbita	11/68 (16.2%)	9/41 (22%)	2/27 (7.4%)	NS
Muerte por fallo cardíaco/trasplante	2/68 (2.9%)	1/41 (2.4%)	1/27 (3.7%)	NS
ACV	5/64 (7.8%)	2/38 (5.3%)	3/26 (11.5%)	NS

Dos tercios (66.7%) de los probandos eran hombres. Este predominio también se observó en los familiares afectados (56.8% vs. 43.2%). No hubo diferencias en la edad al diagnóstico entre los casos índice y los familiares.

La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados después de los 30 años (mediana de 58 años en mujeres y 48 años en hombres).

Se observó penetrancia incompleta de la enfermedad: a los 70 años, el 15% de los hombres y el 32% de las mujeres no se encontraban clínicamente afectados (Figura 4.16).

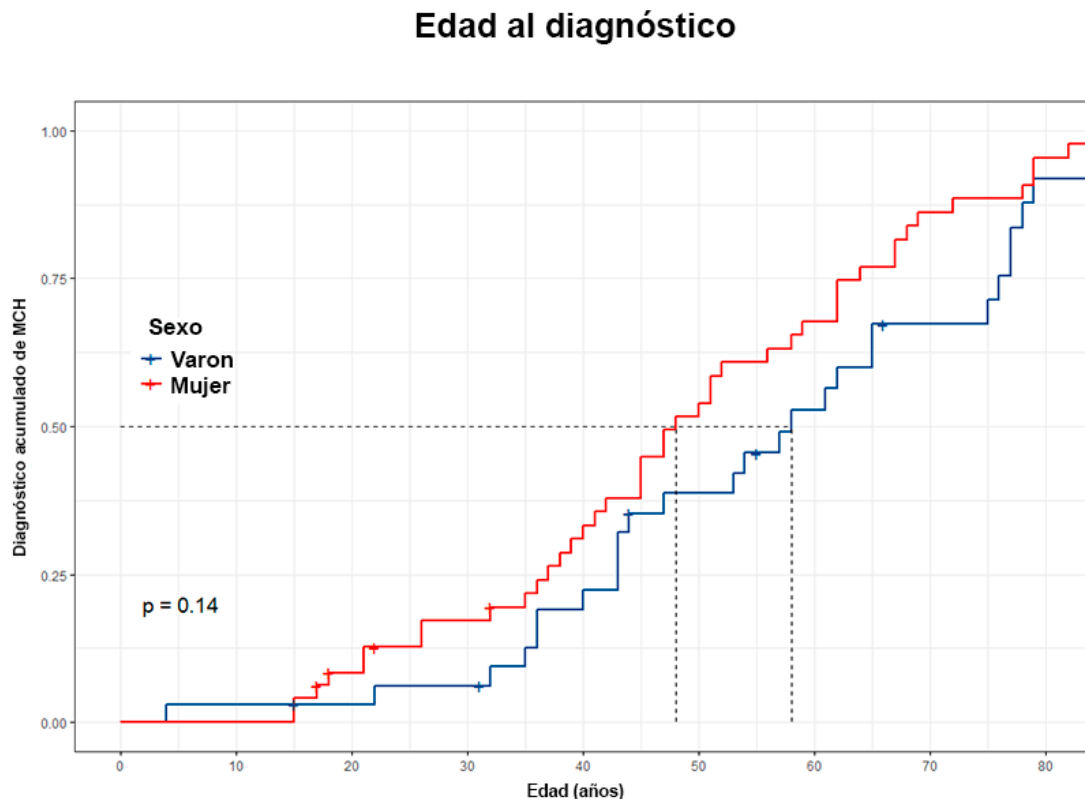


Figura 4.16: Gráfico que muestra el diagnóstico acumulado de MCH, distribuido por sexo. Se observa una tendencia a que las mujeres se diagnostiquen en forma más tardía que los hombres.

Aproximadamente el 40% de los pacientes se encontraban sintomáticos, siendo la disnea el síntoma más frecuente (42.3% de los pacientes la presentaron).

El subtipo de MCH predominante fue la hipertrofia septal asimétrica (82%). El grado de hipertrofia fue leve a moderado (media 18.8 ± 5 mm), y la presencia de hipertrofia masiva (≥ 30 mm) fue excepcional. La obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo y el movimiento sistólico anterior de la válvula mitral estuvieron presentes en el 21% y el 12,5% de los pacientes, respectivamente.

La disfunción sistólica del ventrículo izquierdo (fracción de eyección $< 50\%$) se describió en el 14% de los pacientes. La hipertrabeculación del ventrículo izquierdo estaba presente en el 16% (8/49) de los pacientes, la mitad de los cuales (4/49; 8%) cumplían criterios de no compactación ventricular izquierda (MCNC).

Eventos

Trece de los 81 probandos o familiares afectados (16 %) experimentaron una muerte cardiovascular. Los eventos fueron poco frecuentes antes de los 30 años.

A la edad de 55 años de edad, el 25 % de los hombres frente al 7 % de las mujeres habían muerto de un evento cardiovascular (Figura 4.17).

La muerte súbita fue la causa más frecuente (11 de 13; 85 %), siendo la primera manifestación de la enfermedad en cuatro probandos: el diagnóstico se realizó después de la reanimación exitosa del paro cardíaco en dos, y en la autopsia en otros dos casos, uno de los cuales era un portador heterocigoto compuesto de p.Arg1386Gln y p.Pro615Leu en *FHOD3*. Los otros siete eran familiares en los que los estudios genéticos no estaban disponibles. Dos pacientes (2 de 13; 15 %) experimentaron muerte por insuficiencia cardíaca: una mujer de 58 años que tenía un diagnóstico concomitante de estenosis mitral severa reumática y un hombre de 37 años con un patrón de llenado restrictivo.

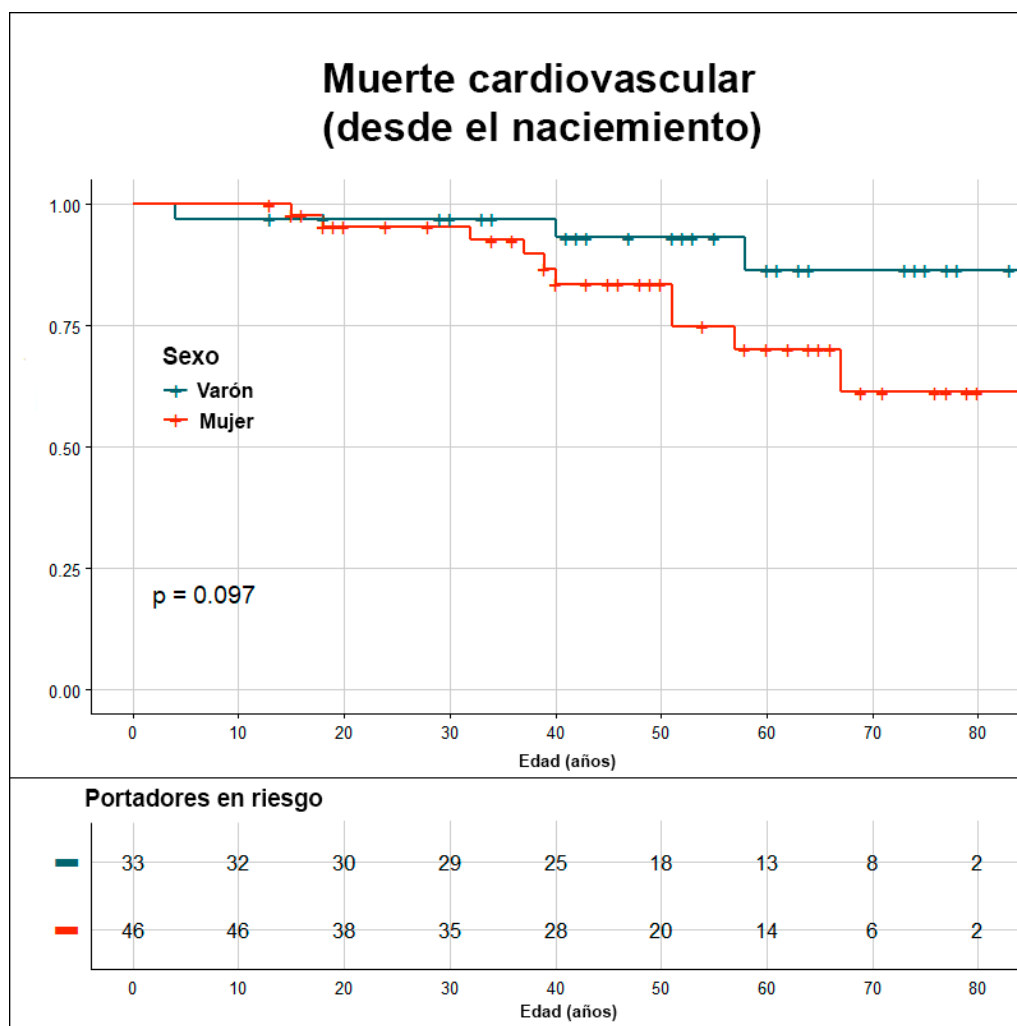


Figura 4.17: Gráfico que muestra la supervivencia libre de muerte cardiovascular en todos los portadores de variantes patogénicas en el gen *FHOD3* desde el nacimiento, independientemente del desarrollo del fenotipo.

Durante el seguimiento de los pacientes que recibieron un diagnóstico de MCH portadores de variantes patogénicas en *FHOD3*, el riesgo de muerte cardiovascular fue de 0.6 % por año (Figura 4.18).

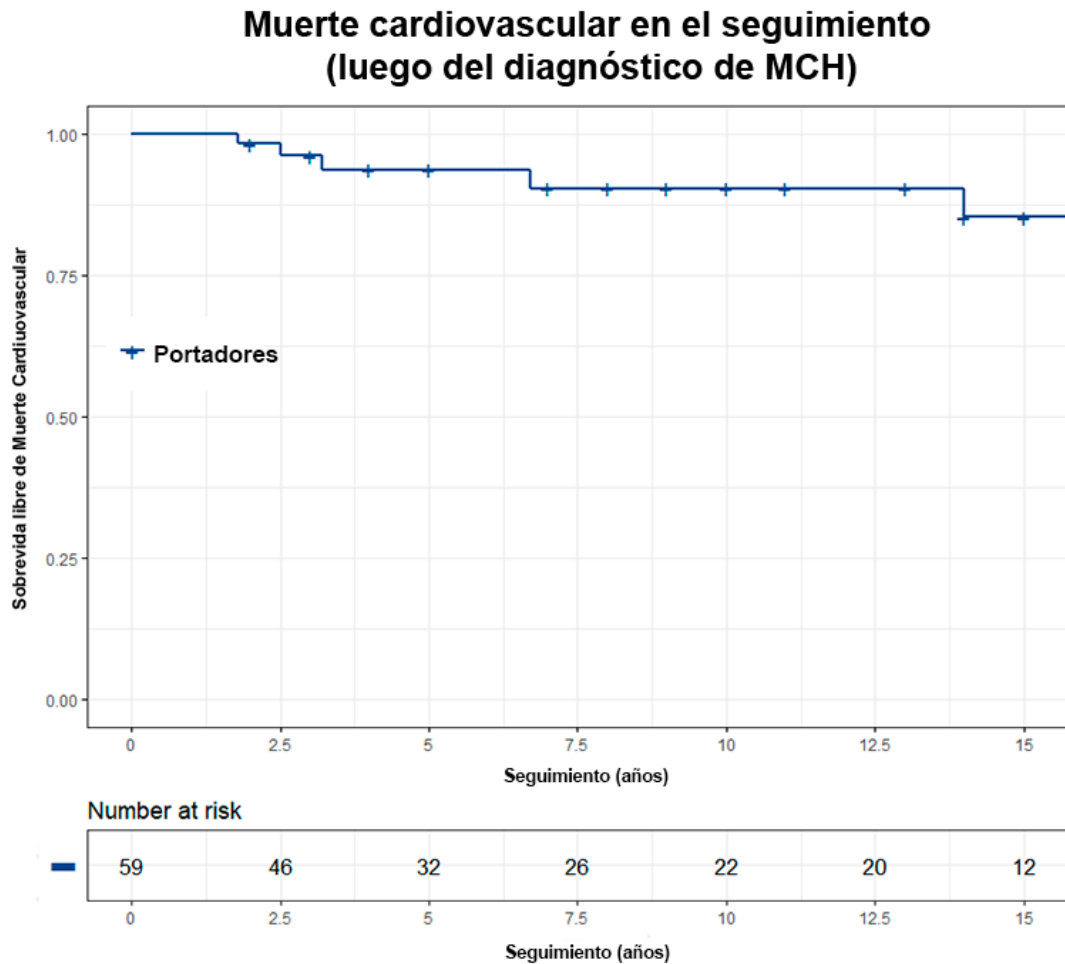


Figura 4.18: Gráfico que muestra la sobrevida libre de muerte cardiovascular en todos los portadores de variantes patogénicas en el gen *FHOD3*, luego de que se haya realizado un diagnóstico de MCH (en el seguimiento luego del diagnóstico).

4.4 DISCUSIÓN

En este estudio demostramos una relación clara entre las mutaciones en *FHOD3* y el desarrollo de MCH. Se examinaron casi 7,800 probandos para detectar la presencia de variantes candidatas muy raras en el gen *FHOD3*, y se observó un enriquecimiento (sobrerrepresentación) de estas variantes en la cohorte de pacientes con MCH con respecto a los controles ($OR \approx 3$).

Esta relación es más baja que las obtenidas por otros grupos que usan el mismo enfoque para otro tipo de variantes, como pueden ser los truncamientos en *MYBPC3* ($OR = 5.7$) o variantes patogénicas en *MYH7* ($OR = 12$) [88], lo que refleja que no todas las variantes candidatas con muy baja frecuencia alélica en *FHOD3* se encuentran necesariamente asociadas con la enfermedad. Como en otros genes sarcoméricos, es difícil predecir si una nueva variante candidata es patogénica o no. En estos casos, el análisis de cosegregación en la familia es mandatorio. En nuestro estudio, se confirmó la cosegregación de 13 variantes en *FHOD3*, lo que arrojó un puntaje de LOD score combinado de 7.95, lo que indica una cosegregación muy fuerte (valor altamente significativo).

Las variantes causales de enfermedades en *FHOD3* representaron al menos el 1 % de los casos de MCH de nuestra cohorte.

En este estudio:

- utilizamos una estrategia muy estricta para considerar una variante como causal de enfermedad (solo variantes con evidencia de cosegregación fueron recategorizadas)
- la cosegregación fue evaluable en solo la mitad de las variantes candidatas
- los casos con variantes adicionales potencialmente patogénicas en otros genes sarcoméricos fueron excluidos

Por todo esto es probable que las mutaciones de *FHOD3* representen más del 2 % de los casos de MCH y aproximadamente el 4 % de los estudios genéticos positivos. Esta prevalencia sería similar o mayor que la informada para mutaciones en genes de proteínas sarcoméricas como *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1* y *TNNC1* [93].

El fenotipo asociado a las mutaciones de *FHOD3* en nuestro estudio fue relativamente leve, con una baja tasa de eventos adversos en individuos jóvenes y una incidencia de muerte cardiovascular global similar a la descrita en cohortes no seleccionadas de pacientes con MCH [3]. Dos tercios de los casos índice eran hombres y el diagnóstico en las mujeres portadoras se realizó en promedio unos 10 años más tarde que en los hombres. Una aparición relativamente tardía de la enfermedad y la penetrancia incompleta se observaron en ambos sexos, aunque fue más frecuente en las mujeres.

La asociación entre *FHOD3* y MCH había sido postulada previamente solo en un estudio de GWAS [83]. Los autores identificaron dos polimorfismos en *FHOD3* (una variante intrónica profunda y la variante sin sentido p.Val1326Ile, ambas con MAFs $\geq 30\%$) que fueron más frecuentes en los casos de MCH con respecto los controles. Aunque esto alcanzó la significación estadística debido al gran tamaño de la muestra, los OR eran muy pequeños, como fue discutido en el capítulo 3 (3.3.1).

Además, los autores no pudieron demostrar una diferencia en la expresión de fenotipos entre homocigotos y portadores heterocigotos de la variante p.Val1326Ile. Estos hallazgos

pueden considerarse una asociación (una señal en el estudio GWAS) entre el gen y el fenotipo, pero hasta la publicación de nuestro trabajo no había ninguna variante genética en *FHOD3* que pueda ser considerada causal de MCH.

La explicación podría ser que la mayoría de los laboratorios de diagnóstico no incluían al gen *FHOD3* en sus paneles de secuenciación, por lo que estas variantes candidatas no eran identificadas. También puede ser difícil detectar una asociación en un GWAS cuando existen fenotipos leves con penetrancia incompleta; además, este tipo de estudios se enfocan en detectar polimorfismos frecuentes pero no están diseñados para detectar variantes muy poco frecuentes en la población general, o sea que sigan un patrón de herencia Mendeliana.

También se ha sugerido una posible asociación de mutaciones *FHOD3* con miocardiopatía dilatada (MCD). Como ya fue mencionado en el capítulo 3, hay un reporte de una pequeña familia japonesa (solo dos miembros fueron genotipados) en el que un estudio funcional in vivo sugería que la variante no sinónima p.Tyr1249Asn alteraba el ensamblaje de los filamentos de actina [85]. Estudios funcionales previos en modelos animales han demostrado que *FHOD3* juega un papel en el desarrollo miocárdico [94]. Por el contrario, un EWAS identificó a *FHOD3* como uno de los ocho loci asociados independientemente con MCD de presentación esporádica, pero en forma inversa (es decir con una asociación negativa o como factor protector; ver 3.3.2) [86].

En nuestro estudio, de los 130 probandos con variantes candidatas en *FHOD3*, 18 tenían un fenotipo de MCD por lo que fueron excluidos en la fase de selección del estudio. Estas variantes no estaban agrupadas en ninguna región particular del gen, y la mayoría de ellas se clasificaron como de patogenicidad desconocida en la evaluación inicial. Se necesitan más estudios para establecer la relevancia clínica de las mutaciones en *FHOD3* y su relación con MCD.

La relación entre *FHOD3* y la hipertrofia ventricular se había explorado recientemente en un estudio de hipertrofia cardíaca inducida por angiotensina II [95]. En condiciones basales, la proteína *FHOD3* existe en un estado autoinhibido debido a la interacción entre su dominio autorregulador diáfano y el dominio inhibidor diáfano (4.19). La fosforilación de residuos específicos de alguno aminoácidos capaces de ser fosforilados ubicados en el dominio autorregulador (p.Ser1590, p.Ser1596 y p.Thr1600) por la ruta de señalización RhoA/ROCK quinasa parece inhibir la interacción con el dominio inhibidor, permitiendo que la proteína *FHOD3* forme dímeros activos que permiten la nucleación de actina y el ensamblaje de miofibrillas en cardiomiocitos, causando hipertrofia celular [80].

Muchas de las variantes de las incluidas en este estudio se ubicaron en los dominios autorregulador e inhibidor de *FHOD3* o en sus residuos circundantes (ver figuras 4.2 y 4.15). Una hipótesis es que estas mutaciones alteran la interacción normal entre los dominios DAD y DID, lo que lleva a un predominio de la proteína *FHOD3* en un estado activado, un mecanismo que se ha descrito para las mutaciones en el parálogo *FHOD1* [96, 97].

La dimerización de la proteína *FHOD3* a un estado activado puede ser más compleja, incluyendo un dominio de dimerización y una región helicoidal (dominio de tipo hélice superenrollada) que forma un puente cruzado entre las cadenas opuestas y proporciona la flexibilidad conformacional requerida para el mecanismo de polimerización de actina [71] (Figura 4.19).

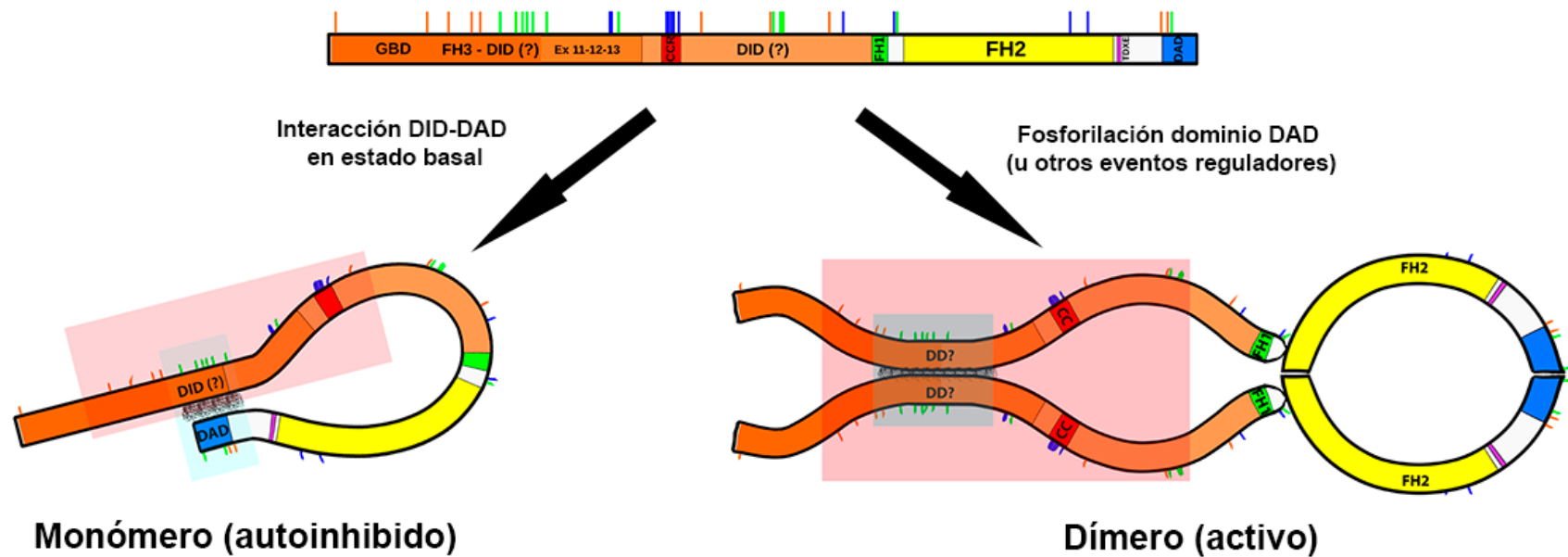


Figura 4.19: Organización molecular de la proteína FHOD₃ y dominios relevantes para la unión a la actina y las interacciones proteína-proteína. Se observa la distribución a través de la proteína FHOD₃ de las mutaciones consideradas patológicas / probablemente patológicas (en azul) y de significado incierto (en verde) en pacientes con MCH que participaron en el estudio de cosegregación. También se observan las variantes detectadas en probandos con MCH que no participaron en la Fase de Cosegregación del estudio (en naranja). La interacción intramolecular entre los dominios DID y DAD, que evita que la formina nucleee los filamentos de actina, se libera mediante la fosforilación de los residuos DAD de serina/treonina por la proteína ROCK. La regulación de la dimerización a un estado activo puede ser más compleja, incluyendo un dominio de dimerización (DD). Mientras que en algunas proteínas de formina, como FHOD₁ y mDia₁, los dominios DID y DD están claramente concentrados en regiones específicas, en FHOD₃ esto podría involucrar una zona más amplia (rojo claro). DID: dominio inhibidor diáfano; DAD: dominio autorregulador diáfano; GBD: dominio de unión a GTPasa; CCR: región en espiral (coil-coiled); DD: dominio de dimerización.

La mitad de las variantes causantes de enfermedad encontradas en nuestro estudio se ubicaron en el dominio de tipo hélice superenrollada, que parece ser específico para un fenotipo de MCH (no se identificaron controles en esta zona o pacientes con miocardiopatías diferentes a MCH). La ubicación exacta y la caracterización funcional de los dominios inhibitorios y de dimerización en FHOD₃ todavía no son del todo bien conocidos.

Se encontraron dos variantes claramente patogénicas que cosegregaron con MCH en varias familias (p.Ser527del y p.Tyr528Cys) cerca de estos dominios. Afectan al exón 12, que solo está presente en el transcrito más largo de FHOD₃ y que se considera la isoforma más importante en el miocardio ventricular del adulto [78].

Además, es en este exón donde parece que FHOD₃ interaccionaría con MYBPC₃ para un correcto direccionamiento y localización de FHOD₃ en la línea C cercana a la línea M del sarcómero (ver 3.2).

Como fue comentado en el capítulo 3 FHOD₃, es probable que la interacción entre MYBPC₃-FHOD₃ este regulada por un cambio conformacional de este último y que podría deberse a algún proceso de fosforilación en el extremo C-terminal que genera un cambio de un estado auto-inhibido a un estado activado [82].

Siendo los residuos Ser y Tyr susceptibles de fosforilación, no es descabellado pensar que p.Ser527 y Tyr528 podrían ser dianas de alguna proteína quinasa. De todos modos, se necesitan estudios funcionales para determinar los mecanismos exactos que subyacen al desarrollo de la MCH en los portadores de estas mutaciones en FHOD₃.

4.4.1 Limitaciones

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que la segregación fue limitada en algunas familias debido al pequeño número de parientes disponibles para la detección, y la evaluación clínica fue incompleta en algunos portadores.

Otra posible limitación es que los pacientes fueron examinados solo en busca de genes previamente asociados con afecciones cardíacas hereditarias; por lo tanto, no se puede descartar la presencia de mutaciones en otros genes que contribuyen al fenotipo que aún no hayan sido asociados a la enfermedad.

4.4.2 Perspectivas futuras

Este estudio fue diseñado específicamente para evaluar la relación entre las mutaciones de FHOD₃ y la MCH, pero no descarta la posibilidad de una asociación con otros fenotipos (especialmente miocardiopatía no compactada y miocardiopatía dilatada). Por otro lado, el número de variantes de tipo truncamiento detectadas fue demasiado bajo para extraer conclusiones válidas sobre su relevancia clínica. Se necesitan estudios colaborativos con un mayor número de pacientes para contestar estas preguntas.

En este estudio se generaron varias hipótesis sobre cómo las mutaciones en FHOD₃ podrían conducir al desarrollo de MCH. Se necesitan más estudios funcionales para determinar los mecanismos exactos que subyacen al desarrollo de este fenotipo en portadores de mutaciones FHOD₃, lo que podría llevar a una mejor comprensión de la enfermedad.

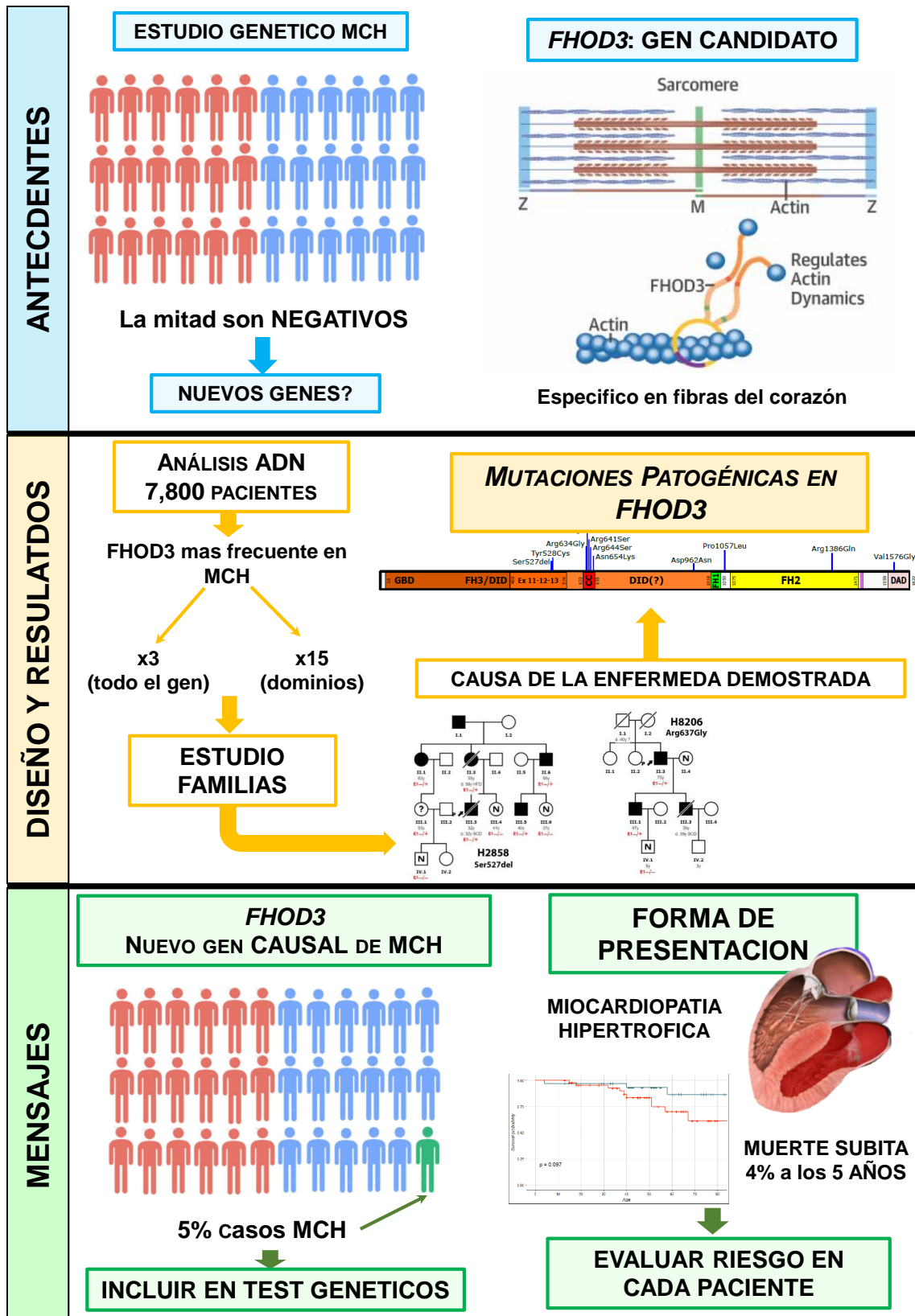


Figura 4.20: Diagrama que ilustra el la racionalidad del estudio, los resultados y los mensajes principales. Alrededor del 50% de las pruebas genéticas realizadas en MCH son negativas; *FHOD3* desempeña un papel en la organización del sarcómero, pero hasta la realización del trabajo solo se consideraba un gen candidato. Después de evaluar más de 7,800 probandos, identificamos variantes causales de enfermedad en *FHOD3* que cosegregan con MCH en varias familias y representan aproximadamente el 1-2% de los casos de MCH. *FHOD3* debe incluirse de manera rutinaria en los paneles de pruebas genéticas para MCH.

4.5 CONCLUSIONES

En este estudio hemos demostrado que *FHOD3* es un nuevo gen causal de enfermedad en la MCH. Las mutaciones patogénicas representarían aproximadamente el 1-2 % de los casos de MCH, una prevalencia que es similar o mayor a la descrita en otros genes secundarios de proteínas sarcoméricas, como *MYL2*, *MYL3*, y *TNNC1*.

El fenotipo asociado y la tasa de eventos cardiovasculares son similares a los descritos para cohortes no seleccionadas de pacientes con MCH, por lo que se recomienda un seguimiento clínico de todos los portadores.

El gen *FHOD3* debería incluirse rutinariamente en todos los paneles de pruebas genéticas para MCH.

DELECCIONES DE EXONES ESPECÍFICOS DE *FHOD3* SE ASOCIAN A MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

5.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1.1 *Hipótesis:*

Variaciones en el número de copias (CNVs) a nivel del gen *FHOD3* se asocian con el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica

5.1.2 *Objetivos*

- *Principal:* Demostrar la asociación entre las alteraciones en el número de copias (CNVs) en el gen *FHOD3* y el desarrollo de MCH
- *Secundarios:*
 - Determinar si las CNVs en el gen *FHOD3* asociadas a MCH, al igual que las variantes puntuales, se localizan en regiones específicas del gen
 - Determinar si las características fenotípicas y pronósticas de los portadores de CNVs es similar a las variantes puntuales causales de enfermedad

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Pacientes

Desde febrero de 2014 hasta diciembre del 2019, el gen *FHOD3* fue evaluado por NGS en nuestro centro en 15,225 probandos no relacionados consecutivos remitidos para diagnóstico genético. Los fenotipos clínicos fueron establecidos por cada centro antes de la derivación de la muestra. Del total, 6,539 probandos (43 %) tuvieron un diagnóstico o sospecha clínica de MCH. Otros 3,688 casos índice sin evidencia de enfermedad cardíaca estructural (principalmente canalopatías y enfermedades aórticas) se utilizaron como población-control interna.

La etnia predominante era europea (más del 90 % de los probandos). Se recibieron muestras principalmente de centros en España, Reino Unido, Dinamarca, Estados Unidos, Alemania y Argentina. Las frecuencias de las variantes en la población general se extrajeron de la base de datos gnomAD versión r2.0 (<http://gnomad.broadinstitute.org>). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de A Coruña-Ferrol (código de registro 2015/576).

5.2.2 Secuenciación y análisis de variaciones en el número de copias (CNVs)

Los exones codificantes y las regiones intrónicas flanqueantes (± 50 pares de bases) de 213 genes relacionados con enfermedades cardiovasculares hereditarias y muerte súbita cardíaca se capturaron usando una librería de sondas personalizada (SureSelect Target Enrichment Kit para el método de secuenciación multiplexada de extremo emparejado Illumina) y se secuenciaron usando la plataforma HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, California, EE. UU.) siguiendo los protocolos de Illumina. La lista completa de genes de la librería se puede observar en la tabla 4.2 y en el apéndice D.

La profundidad de lecturas (número de veces que una base fue secuenciada por lecturas independientes) para cada nucleótido de los genes de interés (incluido *FHOD3*) fue mayor que 30x, con una media de 250-400x en cada gen. Los exones que no cumplieron con este estándar se secuenciaron complementariamente utilizando el método Sanger.

El análisis de los datos de secuencia se realizó utilizando un pipeline de bioinformático patentado que incluía la demultiplexación de muestras, así como todos los pasos necesarios para obtener la anotación de las variantes identificadas junto con su cobertura y los parámetros de calidad correspondientes.

El análisis de CNVs se realizó utilizando una estrategia comparativa de profundidad de coberturas [98] y se confirmaron mediante un método alternativo, que incluyó estrategias de NGS (análisis de secuenciación de amplicones) y métodos convencionales (amplificación por PCR y secuenciación Sanger con primers diseñados específicamente como se muestra en la siguiente tabla).

NGS (amplicones)				
Primer	Secuencia	Método	Uso	Caso
FHOD3-EX15DEL-F95418-2-FW-P-2	TCTGACTTCAATGCATCCTGTTT	NGS (amplicones)	PCR	Caso 1
FHOD3-EX15DEL-F95418-2-RV-P-2	ATTTCTTGGTGTACTGATAACTGGA	NGS (amplicones)	PCR	Caso 1
FHOD3-EX15DEL-F95418-3-FW-PSQ	TGTTGATTAGGTTTGGCTGGATA	Sanger	PCR/SQ	Caso 1
FHOD3-EX15DEL-F95418-3-RV-PSQ	TCTCTGAATTTTCCATGTATTTCAC	Sanger	PCR/SQ	Caso 1
FHOD3-EX15DEL-DECODE-RV-P	GAGAAGGCTCTGCCCC	NGS (metodo patentado)	PCR	Caso 2 y 3
FHOD3-EX15_16DEL-F98476-FW-PSQ	ACCCTTAAATGTATCTAATTGTCCA	Sanger	PCR/SQ	Caso 2
FHOD3-EX15_16DEL-F98476-RV-PSQ	CTGATAAAAGGTGTAGTGCATGTAT	Sanger	PCR/SQ	Caso 2
FHOD3-EX15_16DEL-F98593-FW-P	ACAGTAACTGTCTTAATATTCAGC ATT	Sanger	PCR	Caso 3
FHOD3-EX15_16DEL-F98593-RV-P	CAGCCTGGCTCATTCCTACT	Sanger	PCR/SQ	Caso 3
FHOD3-EX15_16DEL-F98593-FW-SQ	GCAGAGGTAGCCATGGTTTT	Sanger	SQ	Caso 3

Para la secuenciación Sanger, los fragmentos amplificados se secuenciaron con un kit de secuenciación para el termociclador BigDye Terminator v3.1 y el analizador de ADN 3730 de Applied Biosystems (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los cromatogramas se analizaron utilizando el programa Chromas Lite y la herramienta de exploración del genoma (genome browser) de la Universidad de California, Santa Cruz. Las variantes identificadas se informaron de acuerdo con la nomenclatura de la HGVS (Human Genome Variant Society). La patogenicidad de las variantes identificadas se estableció de acuerdo con las recomendaciones del Colegio Americano de Genética y Genómica Médica (ACMG).

5.3 RESULTADOS

De los 15,225 probandos consecutivos, se lograron analizar las CNV en 12,781 (84 %) de las muestras. Las otras 2,444 muestras no fueron adecuadas para el análisis de CNV porque no pasaron el filtrado mínimo de calidad bioinformática requerido; en la mayoría de los casos se trataba de bloques de tejido embebidos en parafina o muestras de saliva en las que la calidad del ADN no era óptima.

Se detectaron CNVs en *FHOD3* en tres pacientes con diagnóstico de miocardiopatía hipertrófica (3 de 5,493 probandos con MCH en los que los CNV eran adecuados para el análisis; 0,05 %) y ninguno de los 2,973 controles.

Todas las CNVs consistieron en deleciones de *FHOD3* en la banda cromosómica 18q12.2 que incluían uno o dos exones y parte de las secuencias intrónicas flanqueantes de los mismos (Tabla 5.1).

Caso	NC_000018.9	NM_001281740.2
1	g.34,260,087_34,262,764delins27	c.1,836-1,312_1,970+1,231delins27
2	g.34,259,872_34,271,130del	c.1,836-1,527_2,022-2,042del
3	g.34,258,856_34,269,358delins100	c.1,836-2,543_2,021+2,217delins100

Cuadro 5.1: Nomenclatura de las deleciones detectadas en el presente estudio, tanto a nivel de las coordenadas genómicas (NC_000018.9) y a nivel del ADN complementario (NM_001281740.2).

Los exones 15 y 16 afectados comprenden los residuos p.Arg612-Phe657 y p.Ser657-Arg674, respectivamente.

Dado que estas deleciones implican exones simétricos, la pérdida de material genético daría como resultado variantes que no cambian el marco de lectura de la proteína. Ninguno de los probandos era portador de variantes genéticas adicionales que pudieran explicar el fenotipo.

Todas las deleciones fueron confirmadas, y se determinaron los puntos de corte preliminares utilizando estrategias NGS adicionales (análisis de secuenciación de amplicones). Los puntos de corte precisos de estas grandes deleciones se definieron mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, del inglés «polimerase chain reaction») y secuenciación por método Sanger.

No se reportan deleciones que involucren exclusivamente al exón 15 o 16 en sujetos considerados controles en la base de datos gnomAD.

5.3.1 Descripción detallada de las familias y características de las deleciones

Familia A

El probando era un hombre español de 51 años con antecedentes de hipertensión y fibrilación auricular paroxística a quien se le había diagnosticado MCH a los 36 años. No presentaba antecedentes familiares de MCH o muerte súbita cardíaca.

Su último ecocardiograma mostraba hipertrofia septal asimétrica (grosor máximo de la pared ventricular izquierda de 21 mm), dilatación moderada de la aurícula izquierda (50 mm en el plano paraesternal del eje largo) sin presentar obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Su fracción de eyección (FEVI) fue normal (71 %).

Su hijo de 26 años, portador de la deleción de *FHOD3*, y su hija de 20 años, no portadora, fueron evaluados y considerados clínicamente no afectados con un ecocardiograma y ECG normales (Figura 5.1).

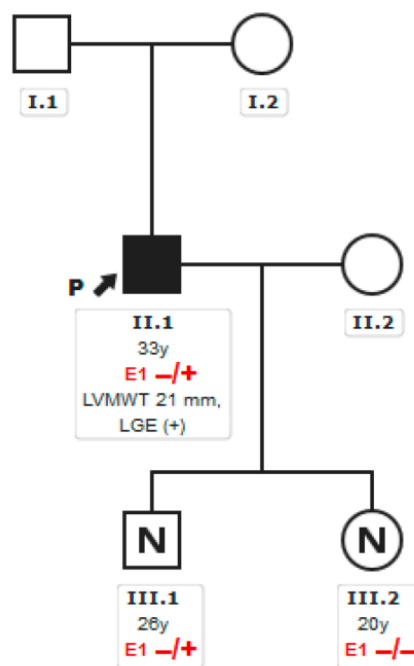


Figura 5.1

La CNV identificada en el paciente consistió en una deleción de 2,678 pares de bases que abarca la secuencia de nucleótidos de c.1,836-1,312 del intrón 14 a c.1,970 + 1,231 del intrón 15 del gen *FHOD3*, con una inserción de 27 pb en la unión (Figura 5.2).

El punto de ruptura proximal se localizó adyacente a una LINE de 1.374 pb denominada L1ME₃C, y el punto de ruptura distal se incrustó en un SINE de 304 pb denominado AluSz (Figura 5.3).

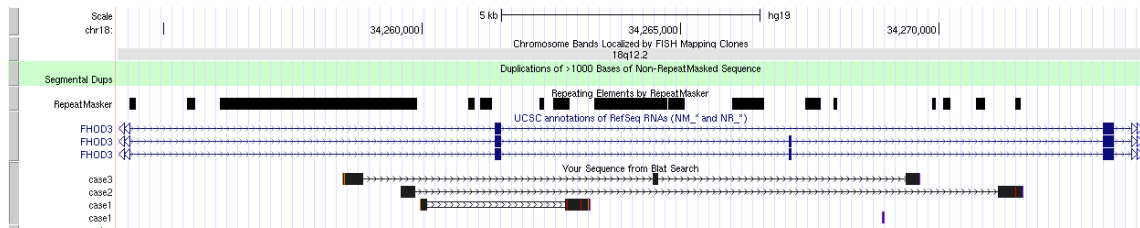


Figura 5.3: Localización de la secuencia de ADN de los tres casos. La imagen muestra una región altamente enriquecida en los elementos LINE y SINE con ausencia de duplicaciones segmentarias en la banda cromosómica 18q12.2. La captura de pantalla fue realizada desde el UCSC Genome Browser. Las cajas azules son exones y las líneas finas son intrones. Los cuadros negros representan regiones de alineamiento y las líneas simples que conectan cuadros negros representan espacios que se deben a deleciones.

En la alineación manual, el fragmento insertado de 27 pb fue idéntico a la secuencia de referencia en posición chr18:g.34,268,898-34,268,924 , que se encuentra a 6,134 pb aguas abajo del punto de corte de la inserción. La unión de extremos de ADN no homólogos (NHEJ del inglés «non-homology extreme join»), el mecanismo predominante de reparación de ADN en mamíferos, no requiere ninguna microhomología entre los dos extremos de ADN. Como no encontramos microhomología extensa en las uniones, propusimos a la unión de extremos de ADN no homólogos como responsable en este caso.

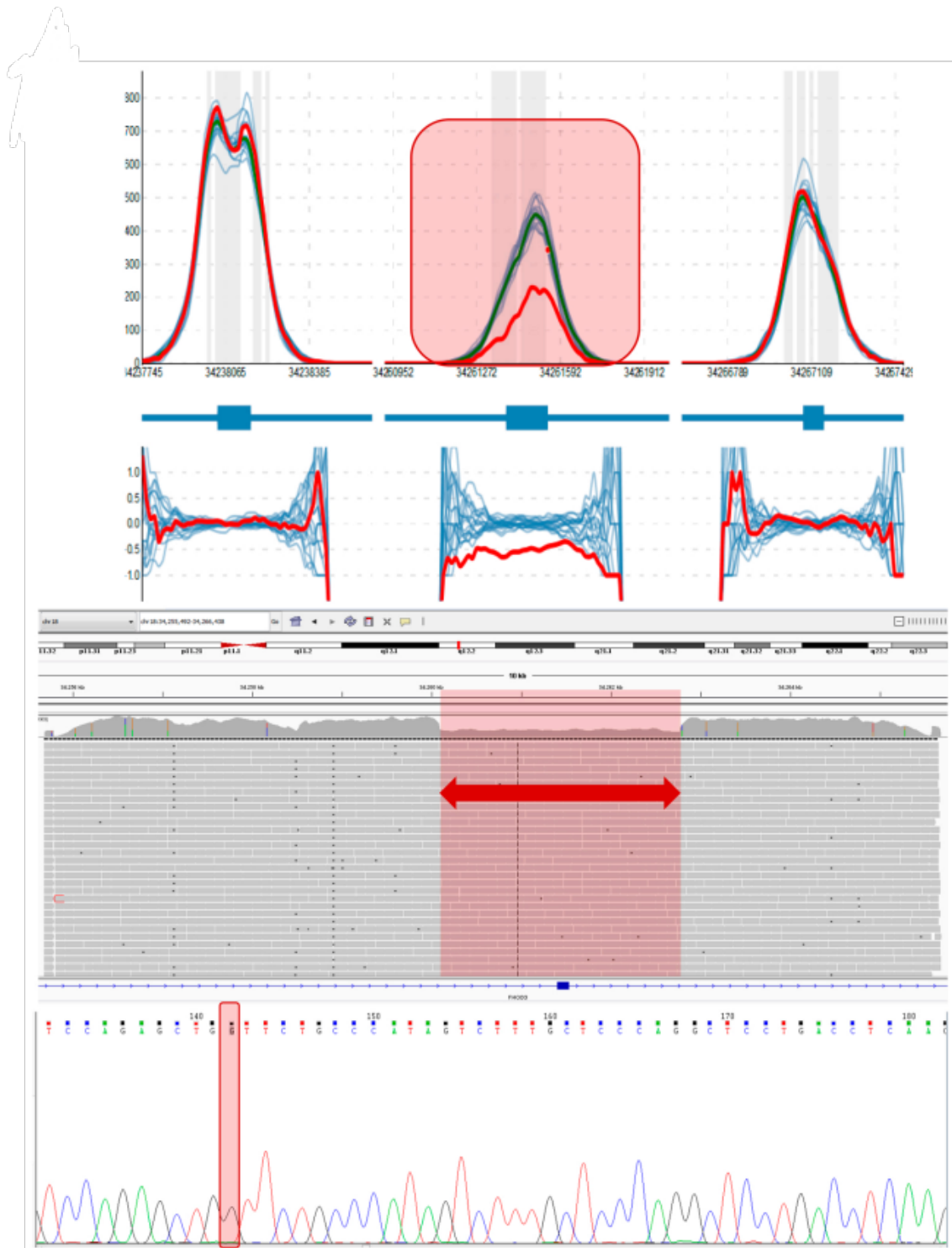


Figura 5.2: Detalle de la deleción identificada en la familia A. Deleción heterocigota de 2.678 pb en *FHOD3* (c.1,836-1,312_1,970 + 1,231delins27) identificada por NGS.

(A) Estrategia comparativa de profundidad de coberturas utilizando un pipeline bioinformático propio patentado. Se observa en el el eje de abscisas a la región genómica evaluada; las ordenadas muestran la cobertura (número de lecturas). Cada línea azul muestra la cobertura de un paciente, la verde es la mediana y la roja es el caso evaluado. Los paneles superiores muestran cobertura y los inferiores la cobertura normalizada. Se aprecia en el fragmento del medio, correspondiente al exón 15, una disminución del 50 % en la cobertura de la muestra evaluada que indica la deleción de la región explorada.

(B) Alineación de la variante confirmada por datos de NGS basada en amplicones usando el gráfico Integrative Genomics Viewer (IGV);

(C) Alineación de la variante confirmada por Sanger con los puntos de corte precisos utilizando el programa Chromas Lite.

Familia B

El probando era un hombre del Reino Unido de 61 años con antecedentes familiares de MCH. Había sido diagnosticado a los 51 años.

Mostró una distribución apical de la hipertrofia del VI, con un máximo espesor de 13 mm, y anomalías en la repolarización en su ECG. Se le implantó un cardio-desfibrilador implantable (DAI) a los 53 años como prevención primaria de muerte súbita.

Sus principales factores de riesgo fueron la taquicardia ventricular no sostenida (TVNS) en la monitorización Holter y los antecedentes familiares de MS.

Su hijo de 18 años también estaba clínicamente afectado, pero no dio su consentimiento para las pruebas genéticas.

Dos de las hermanas del probando y un hermano tenían un diagnóstico de MCH; el hermano había muerto repentinamente a los cuarenta años, con un diagnóstico de MCH en la autopsia. Resultó ser portador obligado porque su hijo afectado fue genotipado y era portador de la misma delección que el caso índice (Figura 5.4).

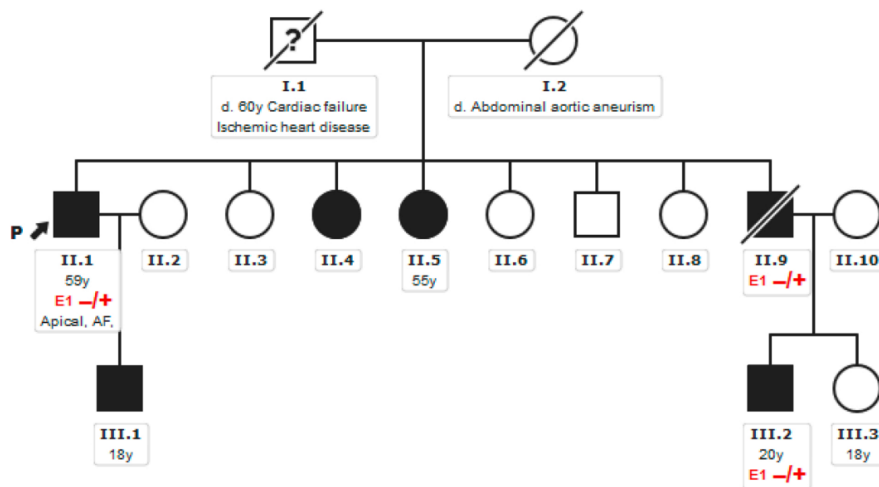


Figura 5.4

Se identificó una delección de 11 kb (11,259 pb) que abarca la secuencia de nucleótidos de c.1,836-1,527 del intrón 14 a c.2,022-2,042 del intrón 16 de *FHOD3* (Figura 5.5). El punto de ruptura proximal está incrustado en una LINE de 1.374 bp denominada L1ME3C, y la secuencia flanqueante de la unión distal no contiene elementos repetitivos intercalados dentro de > 1Kb rodeando al punto de ruptura. No se observó homología ni secuencia insertada en la unión del punto de ruptura, lo que sugiere nuevamente a la unión de extremos de ADN no homólogos como el mecanismo causal.

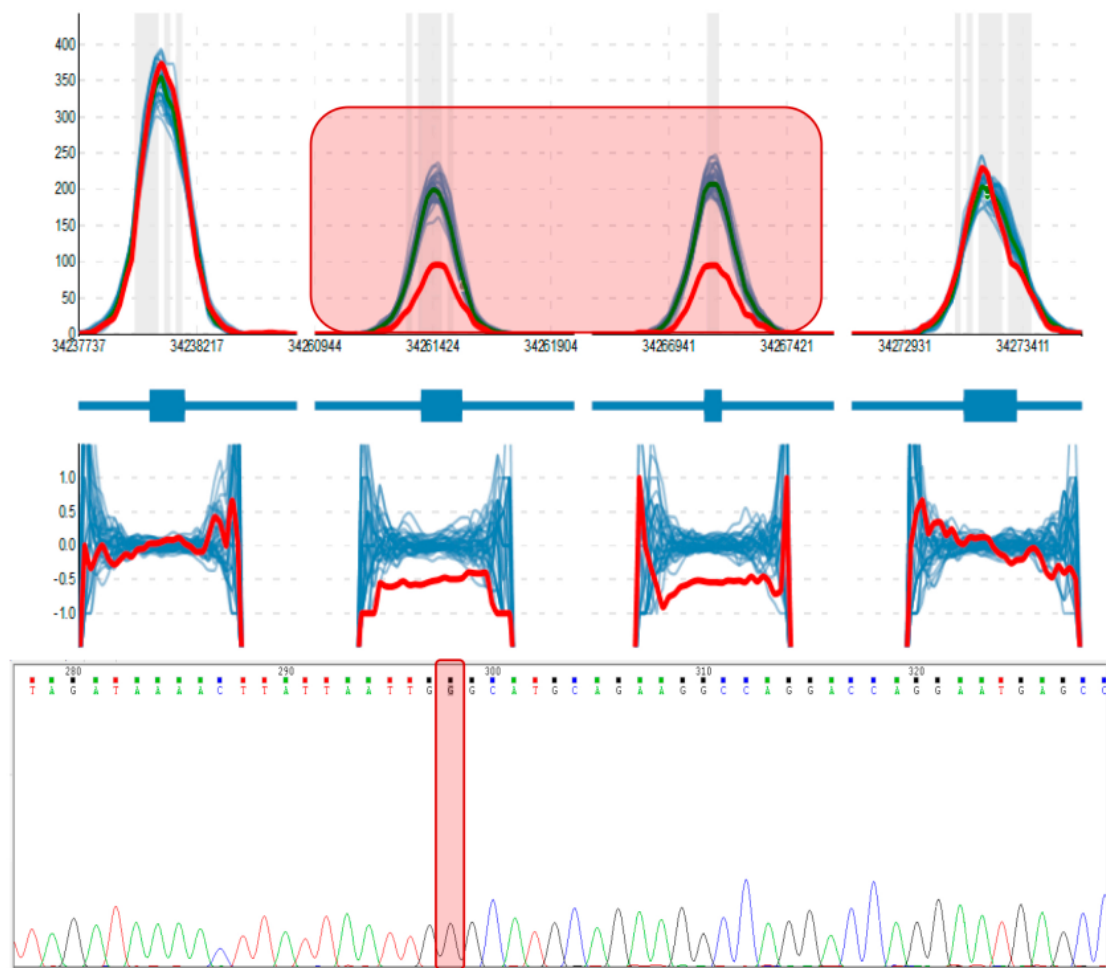


Figura 5.5: Detalle de la deleción identificada en la familia B. Deleción heterocigóa de 11,259 pb en *FHOD3* (c.1,836-1,527_2,022-2,042del) identificada en el caso B por NGS.

(A) Estrategia comparativa de profundidad de coberturas utilizando un pipeline bioinformático propio patentado. Se aprecia en los dos fragmentos del medio, correspondientes al exón 15 y 16, una disminución del 50% en la cobertura de la muestra evaluada que indica la deleción de la región explorada.

(B) Alineación de la variante confirmada por Sanger con los puntos de corte precisos utilizando el programa Chromas Lite.

Familia C

El probando de esta familia rusa era un hombre de 58 años, diagnosticado a los 35 años con una hipertrofia septal asimétrica no obstructiva (31 mm de máximo espesor septal).

Se consideró que su hijo probablemente estaba afectado ya que, a los 16 años, tenía un septum de 12 mm e hipertrabeculación del ápice del VI, la pared lateral y el septum interventricular.

Tanto el padre como el hijo eran portadores de la misma delección; una hija clínicamente no afectada no era portadora de la misma (Figura 5.6).

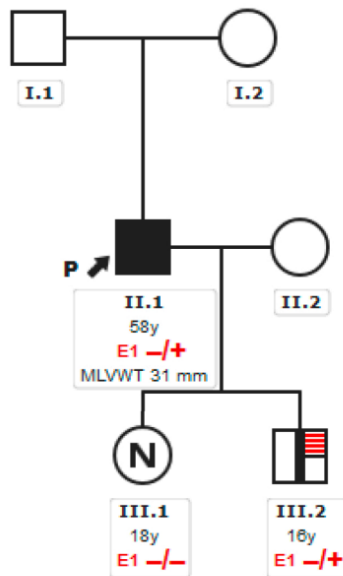


Figura 5.6: Pedigree de la familia C

Se identificó una delección de 11 kb (10,503 pb) que abarca la secuencia de nucleótidos de c.1,836-2,543 del intrón 14 a c.2,021 + 2,217 del intrón 16 de FHOD3 (Figura 5.7).

El punto de ruptura proximal está insertado en una LINE de 1,374 pb denominada L1ME3C; la secuencia flanqueante distal no contiene elementos repetitivos intercalados dentro de > 1Kb rodeando al punto de ruptura. También se observó una inserción de 105 pb en la unión derivada de una LINE frecuente en el genoma humano denominada L1MEf.

La retrotransposición de L1MEf era poco probable. La complejidad de la CNV descartaba a la unión de extremos de ADN no homólogos como responsable, haciendo que un mecanismo basado en la replicación sea la explicación más plausible. Para superar el error de la bifurcación de replicación, la maquinaria de replicación habría reiniciado la síntesis de ADN a través de una bifurcación de replicación diferente ubicada en L1ME3C antes de volver a la bifurcación de replicación original que da como resultado la eliminación de dos exones (de 15 a 16) y la inserción parcial de L1MEf. Observamos regiones de microhomología en las uniones, lo que permite que ocurra este cambio.

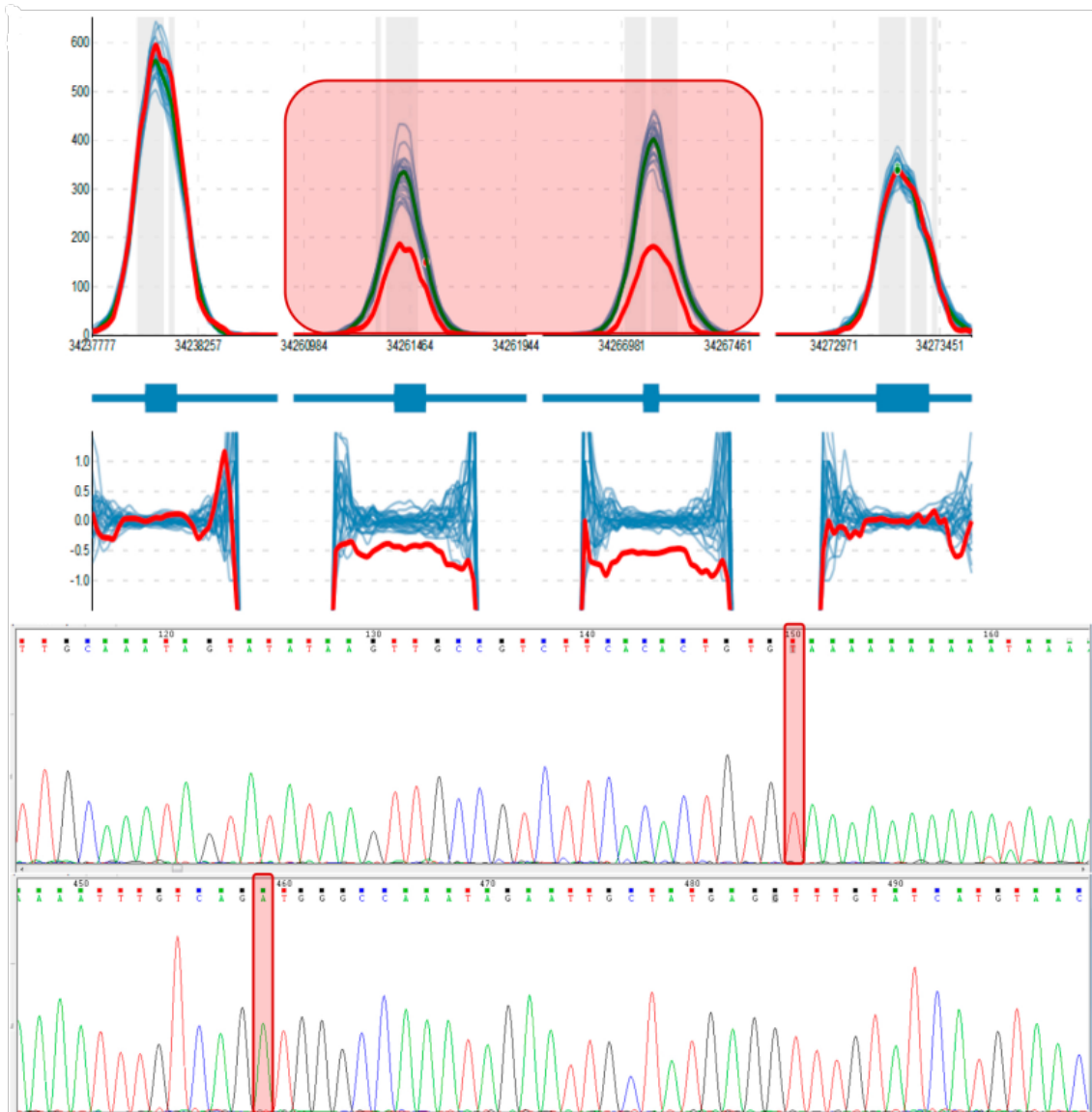


Figura 5.7: Detalle de la deleción identificada en la familia C. Deleción heterocigota de 10,503 pb en *FHOD3* (c.1,836-2,543_2,021 + 2,217delins100) identificada en el caso C por ensayo de NGS.

(A) Estrategia comparativa de profundidad de coberturas utilizando un pipeline bioinformático propio patentado. Se aprecia en los dos fragmentos del medio, correspondientes al exón 15 y 16, una disminución del 50% en la cobertura de la muestra evaluada que indica la deleción de la región explorada.

(B) Alineación de la variante confirmada por Sanger con los puntos de corte precisos utilizando el programa Chromas Lite.

5.4 DISCUSIÓN

En la sección anterior demostramos como *FHOD3* es un nuevo gen asociado a MCH, y que las mutaciones puntuales pueden explicar alrededor del 2 % de los casos de esta enfermedad. En esta sección describimos las tres primeras familias con alteraciones en el número de copias (CNVs) en *FHOD3* asociadas con un fenotipo MCH, lo que representaría un nuevo mecanismo de enfermedad para las variantes genéticas observadas.

Las tres deleciones afectaban exones simétricos, prediciendo la pérdida de 45 y 62 aminoácidos de un dominio relevante del gen (Figura 5.8).

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que no realizamos la secuenciación directa de ARN del paciente *in vivo* para confirmar este mecanismo a nivel de la transcripción. En cualquier caso, dado que implican los exones simétricos 15 y 16, sin cambios en el marco de lectura de la secuencia proteica, no deberían considerarse variantes de pérdida de función o truncadoras *per se*.

Las características clínicas de las familias descritas son consistentes con las reportadas en la sección anterior, en el que las variantes patogénicas eran no sinónimas con cambio de un aminoácido por otro, o pequeñas deleciones en pauta (sin desplazar el marco de lectura) con la pérdida de un solo aminoácido.

La patogenicidad de las variantes de pérdida de función (que generan haploinsuficiencia) en *FHOD3* aún no está clara. Las mismas se reportan con bajas frecuencias alélicas en las bases de datos públicas de controles como gnomAD, pero con una relación observada/esperada de 0.25.

En diversos estudios, las las variantes de tipo truncamiento clásicas que generan la aparición de un codón de parada prematura (sin sentido y frame-shift) no se encuentran enriquecidas en cohortes de pacientes con miocardiopatía [99] y tampoco pudimos demostrar cosegregación con la enfermedad en nuestro estudio anterior. Se necesita más información para determinar la importancia clínica de estas variantes.

Solo unos pocos estudios en la literatura han evaluado sistemáticamente las CNVs en estudios genéticos de MCH. Se han reportado algunas deleciones en genes sarcoméricos (*MYBPC3*, *TNNC1*, *ACTC1*, *MYL2* y *MYL3*) que podrían explicar el fenotipo en algunos probandos y familias [100, 101]. No tenemos constancia de deleciones similares descritas anteriormente en *FHOD3*. Se informaron algunas CNVs en DECIPHER y ClinVar, pero las deleciones fueron mucho mayores y afectaron al gen *FHOD3* completo y otros genes adyacentes, relacionandose con fenotipos más complejos.

En nuestros casos, las tres deleciones afectan a una parte del dominio inhibidor diáfano -DID- de *FHOD3* y más específicamente al dominio en espiral que involucra los aminoácidos 623-655. Esta hélice alfa superenrollada se considera actualmente luego del trabajo presentado por nuestro grupo en la sección previa un cluster de mutaciones patogénicas asociadas a MCH. Una hipótesis atractiva es que la pérdida de los residuos incluidos en nuestras deleciones podría conducir a un predominio de la proteína *FHOD3* en un estado activado, como se describió para las mutaciones en el parálogo *FHOD1* [102].

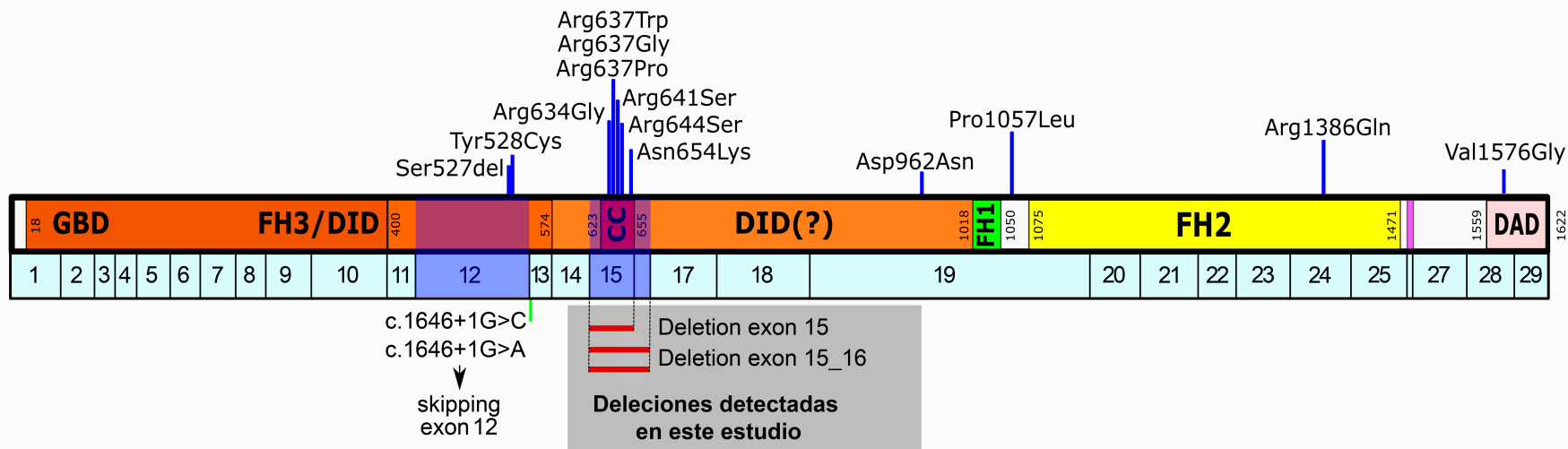


Figura 5.8: Diagrama de la proteína FHOD₃, sus dominios relevantes y su concordancia con los exones del gen. En azul, todas las variantes causales de enfermedad informadas hasta la fecha en la literatura. En la parte inferior de la figura, se puede observar la ubicación de las deleciones descritas en este estudio y las variantes que afectaban el proceso de corte y empalme generando un «skipping» del exón 12 descritas por Semsarian y colaboradores.

Un mecanismo similar podría ocurrir con las variantes que afectaban el corte y empalme descritas previamente por Semsarian et al. [103], que afectan el mismo nucleótido donador de corte y empalme del exón 12 y predicen la exclusión de este exón simétrico del transcrito final (Figura 5.8).

Estas variantes conducirían a una pérdida de 120 aminoácidos en pauta (sin perder el marco de lectura), desde p.Ser429 hasta p.Ser549. Este exón, como fue mencionado previamente, es muy importante ya que sería necesario para localizar FHOD3 junto a MYBPC3 a nivel de también considerado parte del dominio DID de FHOD3 y donde se informaron las variantes patogénicas p.Ser527del y p.Tyr528Cys.

Estas dos variantes juntas representan el 0.5% de los casos de HCM en nuestra cohorte (19 y 15 probandos respectivamente, de 6,788 pacientes consecutivos con MCH secuenciados por NGS mediante librerías que incluyeron el gen), lo que refuerza la relevancia de este exón.

Usando los criterios actuales de ACMG, las variantes de splicing que predicen el skipping del exón 12 y 15-16, o las deleciones que involucran exclusivamente estos exones deben considerarse posiblemente patogénicas.

No podemos extrapolar esta información a deleciones más grandes, o deleciones de otros exones, especialmente cuando predicen un cambio en el marco de lectura: estas variantes deben considerarse de significado clínico incierto y se debe obtener más información (evidencia de cosegregación en familias o estudios funcionales) para una correcta categorización.

5.5 CONCLUSIONES

En este estudio hemos demostrado como deleciones de algunos exones específicos del gen *FHOD3* se asocian con el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica.

Los exones delecionados se localizaban en regiones muy relevantes del gen, que abarcaban los exones 12 y 15, en donde se han identificado la mayoría de las mutaciones puntuales patogénicas reportadas hasta la fecha. A partir de este estudio las variantes que cumplan con estas características deberán ser consideradas posiblemente patogénicas.

El estudio también pone de manifiesto la importancia de realizar el análisis de CNV sistemáticamente en todos los paneles de pruebas genéticas de NGS para MCH, y refuerza la relevancia del gen *FHOD3* en esta enfermedad.

Parte III

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES FINALES

1. *FHOD3* es un nuevo gen causal de miocardiopatía hipertrófica
2. Las mutaciones causales en *FHOD3* representarían al menos un 1%, aunque probablemente más del 2%, de los casos de miocardiopatía hipertrófica, con una prevalencia que es similar o mayor a la descrita en otros genes sarcoméricos secundarios
3. Aunque se han identificado mutaciones causales de tipo puntual (variantes no sinónimas o pequeñas deleciones sin cambio de la pauta de lectura) a lo largo de todo el gen, las mismas tienden a concentrarse en regiones específicas del mismo:
 - los aminoácidos p.Ser527 y p.Tyr528, localizados a nivel del exón 12, presente solo en la isoforma mas larga de *FHOD3* (cardíaca)
 - la hélice superenrollada (coiled-coil) que abarca los aminoácidos 623 al 655, localizada a nivel del dominio inhibidor (DID domain) en el exón 15 de *FHOD3*
4. Las deleciones de algunos exones específicos del gen *FHOD3* detectadas mediante el análisis del número de copias también se asocian con el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica
5. Las deleciones también se localizan en regiones relevantes del gen, a nivel de los exones 12 y 15 de la isoforma larga de *FHOD3*
6. El fenotipo asociado y la tasa de eventos cardiovasculares en portadores de mutaciones patogénicas en *FHOD3* clínicamente afectados son similares a los descritos para cohortes no seleccionadas de pacientes con miocardiopatía hipertrófica
7. Se recomienda un adecuado seguimiento clínico y una correcta estratificación de riesgo de muerte súbita en todos los portadores de variantes causales asociadas a MCH en *FHOD3*
8. El gen *FHOD3* debería incluirse rutinariamente en todos los paneles de pruebas genéticas para miocardiopatía hipertrófica
9. El análisis de CNVs (variación en el número de copias) debería realizarse sistemáticamente en todos los estudios de NGS para miocardiopatía hipertrófica

6.2 FINAL CONCLUSIONS

1. *FHOD3* is a new disease-causing gene for hypertrophic cardiomyopathy
2. Disease-causing variants in *FHOD3* would explain at least 1 %, but probably more than 2 %, of hypertrophic cardiomyopathy cases; the prevalence would be similar to or greater than in other secondary sarcomeric genes
3. Disease-causing point mutations (non-synonymous variants or small deletions without change in the reading frame) have been identified all throughout the gene, but they tend to be clustered in specific regions:
 - a) amino acids p.Ser527 and p.Tyr528, located in exon 12 and present only in the longest isoform of *FHOD3* (main cardiac isoform)
 - b) a coiled-coil domain that includes amino acids 623 to 655, located at the level of the inhibitor domain (DID domain) in exon 15 of *FHOD3*
4. Deletions of specific exons of *FHOD3* are also associated with the development of hypertrophic cardiomyopathy
5. These deletions are also located in relevant regions of the gene, that includes exons 12 and 15 of the longest isoform of *FHOD3*
6. The associated phenotype and the rate of cardiovascular events in clinically affected carriers of pathogenic mutations in *FHOD3* are similar to those described for unselected cohorts of patients with hypertrophic cardiomyopathy
7. Adequate clinical follow-up and correct risk stratification of sudden cardiac death is recommended in all carriers of disease-causing variants in *FHOD3*
8. The *FHOD3* gene should be routinely included in all genetic testing panels for hypertrophic cardiomyopathy
9. Analysis of CNVs (copy number variation) should be performed routinely in all NGS studies for hypertrophic cardiomyopathy

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M, Zorio E, Salgado-Aranda R, Climent V, et al. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2016 dec;68(22):2440–2451. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27908349>.
- [2] Salazar-Mendiguchía J, Ochoa JP, Palomino-Doza J, Domínguez F, Díez-López C, Akhtar M, et al. Mutations in TRIM63 cause an autosomal-recessive form of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 2020;(January 2019):1342–1348.
- [3] Elliott PM, Anastasakis a, Borger Ma, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014;35(39):2733–2779. Available from: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/eurheartj/ehu284>.
- [4] Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2007 dec;29(2):270–276. Available from: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/eurheartj/ehm342><https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehm342>.
- [5] Barriales-Villa R, Gimeno-Blanes JR, Zorio-Grima E, Ripoll-Vera T, Evangelista-Masip A, Moya-Mitjans À, et al. Protocolo de actuación en las cardiopatías familiares: síntesis de recomendaciones y algoritmos de actuación. *Rev Española Cardiol*. 2016 mar;69(3):300–309. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300893215006752>.
- [6] Fernández A, Quiroga A, Ochoa JP, Mysuta M, Casabé JH, Biagetti M, et al. Validation of the 2014 European Society of Cardiology Sudden Cardiac Death Risk Prediction Model in Hypertrophic Cardiomyopathy in a Reference Center in South America. *Am J Cardiol*. 2016 jul;118(1):121–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914916305021><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189816>.
- [7] O'Mahony C, Jichi F, Pavlou M, Monserrat L, Anastasakis A, Rapezzi C, et al. A novel clinical risk prediction model for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy (HCM risk-SCD). *Eur Heart J*. 2014 aug;35(30):2010–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126876>.
- [8] Ho CY. Genetic considerations in hypertrophic cardiomyopathy. *Prog Cardiovasc Dis*. 2012;54(6):456–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22687586><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3604192>.

- [9] Trujillo-Quintero JP, Palomino-Doza J, Cárdenas-Reyes I, Ochoa JP, Monserrat L. Abordaje de las cardiopatías familiares desde la Medicina genómica. *Rev Colomb Cardiol*. 2018 jun;25(4):264–276. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0120563318300391?via=ihub>.
- [10] Teekakirikul P, Kelly MA, Rehm HL, Lakdawala NK, Funke BH. Inherited Cardiomyopathies. *J Mol Diagnostics*. 2013 mar;15(2):158–170. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525157812003042>.
- [11] Anderson RH, Jensen B, Mohun TJ, Petersen SE, Aung N, Zemrak F, et al. Key Questions Relating to Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy: Is the Emperor Still Wearing Any Clothes? *Can J Cardiol*. 2017;33(6):747–757. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2017.01.017>.
- [12] Olivotto I, D'Amati G, Basso C, Van Rossum A, Patten M, Em-din M, et al. Defining phenotypes and disease progression in sar-comeric cardiomyopathies: contemporary role of clinical investiga-tions. *Cardiovasc Res*. 2015 apr;105(4):409–423. Available from: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/cvr/cvv024https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvv024>.
- [13] Marcus FI, Edson S, Towbin JA. Genetics of arrhythmogenic right ventricular car-diomyopathy: A practical guide for physicians. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(19):1945–1948. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.01.073>.
- [14] Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, Dearani Ja, Fifer Ma, Link MS, et al. 2011 ACC-F/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Asso-ciation Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2011 dec;124(24):e783–831. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068434>.
- [15] Michels M, Soliman OII, Phefferkorn J, Hoedemaekers YM, Kofflard MJ, Dooijes D, et al. Disease penetrance and risk stratification for sudden cardiac death in asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers. *Eur Heart J*. 2009 nov;30(21):2593–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666645>.
- [16] Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2010;31(22):2715–2728.
- [17] Ingles J, McGaughan J, Scuffham Pa, Atherton J, Semsarian C. A cost-effectiveness model of genetic testing for the evaluation of families with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 2012;98(8):625–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22128210>.
- [18] Alejandra Restrepo-Cordoba M, Campuzano O, Ripoll-Vera T, Cobo-Marcos M, Mademont-Soler I, Gámez JM, et al. Usefulness of Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy: an Analysis Using Real-World Data. *J Cardiovasc Transl Res*. 2017 feb;10(1):35–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28138913>.

- [19] Carrier L, Mearini G, Stathopoulou K, Cuello F. Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC₃) in cardiac pathophysiology. *Gene*. 2015 dec;573(2):188–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358504><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6660134>.
- [20] García-Giustiniani D, Arad M, Ortíz-Genga M, Barriales-Villa R, Fernández X, Rodríguez-García I, et al. Phenotype and prognostic correlations of the converter region mutations affecting the β myosin heavy chain. *Heart*. 2015 jul;101(13):1047–53. Available from: <http://heart.bmj.com/content/early/2015/05/02/heartjnl-2014-307205.long><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25935763><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4484257>.
- [21] Monserrat L, Ochoa JP, Ortiz-Genga M, Garcia-Giustiniani D. Genética de la Miocardiopatía Hipertrófica. In: Lopez-Farre J, editor. *Cardio Genética*. 1st ed. CTO Editorial; 2016. p. 41–54.
- [22] Monserrat L. Perspectives on current recommendations for genetic testing in HCM. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2018 aug;2018(3):23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30393635><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6209450>.
- [23] Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, Elliott PM, Merlini G, Waddington-Cruz M, et al. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2018 sep;379(11):1007–1016. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30145929><http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1805689>.
- [24] Kristoffersson U, Macek M. From Mendel to Medical Genetics. *Eur J Hum Genet*. 2017;25(s2):S53–S59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29297875><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5763265>.
- [25] WATSON JD, CRICK FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953 apr;171(4356):737–738. Available from: <http://www.nature.com/articles/171737a0>.
- [26] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977 dec;74(12):5463–5467. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- [27] Geisterfer-Lowrance AAT, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990 sep;62(5):999–1006. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749090274I>.
- [28] Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15(9):733–47. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4098820&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [29] Monserrat L, Ortiz-Genga M, Lesende I, Garcia-Giustiniani D, Barriales-Villa R, de Una-Iglesias D, et al. Genetics of cardiomyopathies: novel perspectives with next generation sequencing. *Curr Pharm Des.* 2015;21(4):418–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483943>.
- [30] Ackerman MJ, Marcou CA, Tester DJ. Personalized medicine: genetic diagnosis for inherited cardiomyopathies/channelopathies. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2013 apr;66(4):298–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24775620>.
- [31] Lopes LR, Rahman MS, Elliott PM. A systematic review and meta-analysis of genotype–phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. *Heart.* 2013 dec;99(24):1800–1811. Available from: <http://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heartjnl-2013-303939>.
- [32] Vermeer AMC, van Engelen K, Postma AV, 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 aug;163(3):178–184. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.c.31365>.
- [33] Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, Van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: State of the art. *Cardiovasc Res.* 2015;105(4):397–408.
- [34] Christiaans I, Elliott PM. Hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiogenetics* Second Ed. 2016;p. 61–74.
- [35] Tajsharghi H, Oldfors A. Myosinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013 jan;125(1):3–18. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-012-1024-2>.
- [36] Sheikh F, Lyon RC, Chen J. Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease. *Gene.* 2015 sep;569(1):14–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26074085><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4496279>.
- [37] Pasquale F, Syrris P, Kaski JP, Mogensen J, McKenna WJ, Elliott P. Long-term outcomes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012;5(1):10–17. Available from: <http://circgenetics.ahajournals.org/content/5/1/10.abstract>.
- [38] Monserrat L. Diagnóstico genético en la miocardiopatía hipertrófica. In: Navarro Lopez F, editor. *Miocardiopatía Hipertrófica.* Soc. Española Cardiol.; 2014. p. 49–62.
- [39] Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernandez X, Rodríguez I, Dumont C, Cazón L, et al. Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *Eur Heart J.* 2007 aug;28(16):1953–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611253>.

- [40] Redwood C, Robinson P. Alpha-tropomyosin mutations in inherited cardiomyopathies. *J Muscle Res Cell Motil.* 2013 aug;34(3-4):285–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24005378>.
- [41] Mazzarotto F, Olivotto I, Boschi B, Girolami F, Poggesi C, Barton PJR, et al. Contemporary Insights Into the Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy: Toward a New Era in Clinical Testing? *J Am Heart Assoc.* 2020 apr;9(8). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.119.015473>.
- [42] Bos JM, Poley RN, Ny M, Tester DJ, Xu X, Vatta M, et al. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Genet Metab.* 2006 may;88(1):78–85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2756511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [43] Geier C, Gehmlich K, Ehler E, Hassfeld S, Perrot A, Hayess K, et al. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 2008 sep;17(18):2753–2765. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddn160>.
- [44] Hof IE, van der Heijden JF, Kranias EG, Sanoudou D, de Boer RA, van Tintelen JP, et al. Prevalence and cardiac phenotype of patients with a phospholamban mutation. *Neth Heart J.* 2019 feb;27(2):64–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30547415><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6352623>.
- [45] Landstrom AP, Weisleder N, Bataalden KB, Martijn Bos J, Tester DJ, Ommen SR, et al. Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 jun;42(6):1026–1035. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282807009807>.
- [46] Vanninen SUM, Leivo K, Seppälä EH, Aalto-Setälä K, Pitkänen O, Suursalmi P, et al. Heterozygous junctophilin-2 (JPH2) p.(Thr161Lys) is a monogenic cause for HCM with heart failure. *PLoS One.* 2018 sep;13(9):e0203422. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0203422><https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0203422>.
- [47] Brodehl A, Gaertner-Rommel A, Milting H. Molecular insights into cardiomyopathies associated with desmin (DES) mutations. *Biophys Rev.* 2018 aug;10(4):983–1006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926427><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6082305>.
- [48] Roldán-Sevilla A, Palomino-Doza J, de Juan J, Sánchez V, Domínguez-González C, Salguero-Bodes R, et al. Missense Mutations in the FLNC Gene Causing Familial Restrictive Cardiomyopathy. *Circ Genomic Precis Med.* 2019;12(3):e002388. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30919686>.
- [49] Brodehl A, Ferrier RA, Hamilton SJ, Greenway SC, Brundler MA, Yu W, et al. Mutations in FLNC are Associated with Familial Restrictive Cardiomyopathy. *Hum Mutat.* 2016 mar;37(3):269–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26666891>.

- [50] Valdés-Mas R, Gutiérrez-Fernández A, Gómez J, Coto E, Astudillo A, Puente DA, et al. Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Commun*. 2014 oct;5:5326. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms6326><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351925>.
- [51] Germain DP, Elliott PM, Falissard B, Fomin VV, Hilz MJ, Jovanovic A, et al. The effect of enzyme replacement therapy on clinical outcomes in male patients with Fabry disease: A systematic literature review by a European panel of experts. *Mol Genet Metab reports*. 2019 jun;19:100454. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30775256><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6365982>.
- [52] Kindel SJ, Miller EM, Gupta R, Cripe LH, Hinton RB, Spicer RL, et al. Pediatric cardiomyopathy: importance of genetic and metabolic evaluation. *J Card Fail*. 2012 may;18(5):396–403. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3345128&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [53] Liao J, Mehta L. Molecular Genetics of Noonan Syndrome and RASopathies. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2019 may;16(Suppl 2):435–446. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31115195>.
- [54] Prendiville TW, Gauvreau K, Tworog-Dube E, Patkin L, Kucherlapati RS, Roberts AE, et al. Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Arch Dis Child*. 2014 jul;99(7):629–634. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24534818><http://adc.bmj.com/cgi/doi/10.1136/archdischild-2013-305047>.
- [55] Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 feb;25(1):161–79. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3058199&tool=pmcentrez&rendertype=abstract><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396583><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3058199>.
- [56] Ho CY, Day SM, Ashley EA, Michels M, Pereira AC, Jacoby D, et al. Genotype and lifetime burden of disease in hypertrophic cardiomyopathy insights from the sarcomeric human cardiomyopathy registry (SHaRe). *Circulation*. 2018;138(14):1387–1398.
- [57] Rapezzi C, Arbustini E, Caforio ALP, Charron P, Gimeno-Blanes J, Heliö T, et al. Diagnostic work-up in cardiomyopathies: Bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2013;34(19):1448–1458.
- [58] Bos JM, Will ML, Gersh BJ, Kruisselbrink TM, Ommen SR, Ackerman MJ. Characterization of a phenotype-based genetic test prediction score for unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc*. 2014 jun;89(6):727–737. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619614001487><http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.01.025>.

- [59] Ruiz-Guerrero L, Barriales-Villa R. Storage diseases with hypertrophic cardiomyopathy phenotype. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2018 aug;2018(3):28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30393640><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6209457>.
- [60] Lopes LR, Syrris P, Guttman OP, O'Mahony C, Tang HC, Dalageorgou C, et al. Novel genotype-phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 2015 feb;101(4):294–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351510><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4345808>.
- [61] Ko C, Arscott P, Concannon M, Saberi S, Day SM, Yashar BM, et al. Genetic testing impacts the utility of prospective familial screening in hypertrophic cardiomyopathy through identification of a nonfamilial subgroup. *Genet Med*. 2018 jan;20(1):69–75. Available from: <http://www.nature.com/articles/gim201779>.
- [62] Ingles J, Burns C, Bagnall RD, Lam L, Yeates L, Sarina T, et al. Nonfamilial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017 apr;10(2). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGENETICS.116.001620>.
- [63] Thomson KL, Ormondroyd E, Harper AR, Dent T, McGuire K, Baksi J, et al. Analysis of 51 proposed hypertrophic cardiomyopathy genes from genome sequencing data in sarcomere negative cases has negligible diagnostic yield. *Genet Med*. 2018;0(0). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41436-018-0375-z>.
- [64] Ingles J, Goldstein J, Thaxton C, Caleshu C, Corty EW, Crowley SB, et al. Evaluating the Clinical Validity of Hypertrophic Cardiomyopathy Genes. *Circ Genomic Precis Med*. 2019 feb;12(2). Available from: <http://ahajournals.org><https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGEN.119.002460>.
- [65] Bagnall RD, Ingles J, Dinger ME, Cowley MJ, Ross SB, Minoche AE, et al. Whole Genome Sequencing Improves Outcomes of Genetic Testing in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(4):419–429.
- [66] Singer ES, Ingles J, Semsarian C, Bagnall RD. Key Value of RNA Analysis of MYBPC3 Splice-Site Variants in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Genomic Precis Med*. 2019;12(1):e002368.
- [67] Lopes LR, Barbosa P, Torrado M, Quinn E, Merino A, Ochoa JP, et al. Cryptic Splice-altering Variants in MYBPC3 Are a Prevalent Cause of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Genomic Precis Med*. 2020 may;p. CIRCGEN.120.002905. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGEN.120.002905>.
- [68] Tuffery-Giraud S, Bérout C, Leturcq F, Yaou RB, Hamroun D, Michel-Calemard L, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: A model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat*. 2009;30(6):934–945.
- [69] Lopes LR, Murphy C, Syrris P, Dalageorgou C, McKenna WJ, Elliott PM, et al. Use of high-throughput targeted exome-sequencing to screen for copy number variation in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Med Genet*. 2015;58(11):611–616. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.10.001>.

- [70] Mademont-Soler I, Mates J, Yotti R, Espinosa MA, Pérez-Serra A, Fernandez-Avila AI, et al. Additional value of screening for minor genes and copy number variants in hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181465. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28771489><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5542623>.
- [71] Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci*. 2005 jun;30(6):342–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15950879>.
- [72] Ehler E. Actin-associated proteins and cardiomyopathy—the ‘unknown’ beyond troponin and tropomyosin. *Biophys Rev*. 2018 aug;10(4):1121–1128. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-018-0428-1>.
- [73] Pruyne D. Revisiting the Phylogeny of the Animal Formins: Two New Subtypes, Relationships with Multiple Wing Hairs Proteins, and a Lost Human Formin. *PLoS One*. 2016 oct;11(10):e0164067. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0164067>.
- [74] Courtemanche N. Mechanisms of formin-mediated actin assembly and dynamics. *Biophys Rev*. 2018;10(6):1553–1569.
- [75] Paul AS, Pollard TD. Energetic requirements for processive elongation of actin filaments by FH1FH2-formins. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12533–12540.
- [76] Schönichen A, Geyer M. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta*. 2010 feb;1803(2):152–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20102729>.
- [77] Taniguchi K, Takeya R, Suetsugu S, Kan-O M, Narusawa M, Shiose A, et al. Mammalian formin fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. *J Biol Chem*. 2009 oct;284(43):29873–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706596><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2785617>.
- [78] Iskratsch T, Lange S, Dwyer J, Kho AL, Dos Remedios C, Ehler E. Formin follows function: A muscle-specific isoform of FHOD3 is regulated by CK2 phosphorylation and promotes myofibril maintenance. *J Cell Biol*. 2010;191(6):1159–1172.
- [79] Kanaya H, Takeya R, Takeuchi K, Watanabe N, Jing N, Sumimoto H. Fhos2, a novel formin-related actin-organizing protein, probably associates with the nestin intermediate filament. *Genes to Cells*. 2005 may;10(7):665–678. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2443.2005.00867.x>.
- [80] Iskratsch T, Reijntjes S, Dwyer J, Toselli P, Dégano IR, Dominguez I, et al. Two distinct phosphorylation events govern the function of muscle FHOD3. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(5):893–908.
- [81] Kan-o M, Takeya R, Taniguchi K, Tanoue Y, Tominaga R, Sumimoto H. Expression and Subcellular Localization of Mammalian Formin Fhod3 in the Embryonic and Adult Heart. *PLoS One*. 2012 apr;7(4):e34765. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034765>.

- [82] Matsuyama S, Kage Y, Fujimoto N, Ushijima T, Tsuruda T, Kitamura K, et al. Interaction between cardiac myosin-binding protein C and formin Fhod3. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(19):E4386–E4395.
- [83] Wooten EC, Hebl VB, Wolf MJ, Greytak SR, Orr NM, Draper I, et al. Formin homology 2 domain containing 3 variants associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013 feb;6(1):10–18. Available from: <http://circgenetics.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCGENETICS.112.965277>.
- [84] Watkins H. Assigning a causal role to genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6(1):2–4.
- [85] Arimura T, Takeya R, Ishikawa T, Yamano T, Matsuo A, Tatsumi T, et al. Dilated Cardiomyopathy-Associated FHOD3 Variant Impairs the Ability to Induce Activation of Transcription Factor Serum Response Factor. *Circ J*. 2013;77(12):2990–2996. Available from: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/circj/CJ-13-0255?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>.
- [86] Esslinger U, Garnier S, Korniat A, Proust C, Kararigas G, Müller-Nurasyid M, et al. Exome-wide association study reveals novel susceptibility genes to sporadic dilated cardiomyopathy. *PLoS One*. 2017;12(3).
- [87] Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285–291. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature19057>.
- [88] Walsh R, Thomson KL, Ware JS, Funke BH, Woodley J, McGuire KJ, et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet Med*. 2017 feb;19(2):192–203. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/gim.2016.90>.
- [89] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 may;17(5):405–423. Available from: <http://www.nature.com/articles/gim201530>.
- [90] Egeland T, Pinto N, Vigeland MD. A general approach to power calculation for relationship testing. *Forensic Sci Int Genet*. 2014 mar;9:186–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23810238>.
- [91] Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*. 2015 mar;31(5):761–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338716><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4341060>.
- [92] Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GLA, Edwards KJ, et al. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat*. 2013 jan;34(1):57–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033316><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3558800>.

- [93] Sabater-Molina M, Pérez-Sánchez I, Hernández del Rincón JP, Gimeno JR. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A review of current state. *Clin Genet*. 2018 jan;93(1):3–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cge.13027>.
- [94] Kan-O M, Takeya R, Abe T, Kitajima N, Nishida M, Tominaga R, et al. Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biol Open*. 2012 sep;1(9):889–896. Available from: <http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.20121370><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23213483><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3507241><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23213483><http://www.pubmedcentral.nih.gov/arti>.
- [95] Zhou Q, Wei SS, Wang H, Wang Q, Li W, Li G, et al. Crucial Role of ROCK2-Mediated Phosphorylation and Upregulation of FHOD3 in the Pathogenesis of Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy Novelty and Significance. *Hypertension*. 2017 jun;69(6):1070–1083. Available from: <http://hyper.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08662>.
- [96] Nezami AG, Poy F, Eck MJ. Structure of the Autoinhibitory Switch in Formin mDia1. *Structure*. 2006 feb;14(2):257–263. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212606000451>.
- [97] Schulte A, Stolp B, Schönichen A, Pylypenko O, Rak A, Fackler OT, et al. The Human Formin FHOD1 Contains a Bipartite Structure of FH3 and GTPase-Binding Domains Required for Activation. *Structure*. 2008;16(9):1313–1323.
- [98] De Uña-Iglesias D. System and method to detect structural genetic variants; 2019.
- [99] Walsh R, Mazzarotto F, Whiffin N, Buchan R, Midwinter W, Wilk A, et al. Quantitative approaches to variant classification increase the yield and precision of genetic testing in Mendelian diseases: the case of hypertrophic cardiomyopathy. *Genome Med*. 2019 dec;11(1):5. Available from: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-019-0616-z>.
- [100] Lopes LR, Murphy C, Syrris P, Dalageorgou C, McKenna WJ, Elliott PM, et al. Use of high-throughput targeted exome-sequencing to screen for copy number variation in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Med Genet*. 2015 nov;58(11):611–616. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1769721215300252>.
- [101] Mademont-Soler I, Mates J, Yotti R, Espinosa MA, Pérez-Serra A, Fernandez-Avila AI, et al. Additional value of screening for minor genes and copy number variants in hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2017 aug;12(8):e0181465. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0181465>.
- [102] Schulte A, Stolp B, Schönichen A, Pylypenko O, Rak A, Fackler OT, et al. The Human Formin FHOD1 Contains a Bipartite Structure of FH3 and GTPase-Binding Domains Required for Activation. *Structure*. 2008 sep;16(9):1313–1323. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212608002578>.
- [103] Semsarian C, Ingles J, Bagnall RD. Revisiting Genome Sequencing Data in Light of Novel Disease Gene Associations. *J Am Coll Cardiol*.

2019 mar;73(11):1365-1366. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109719302840>.

APÉNDICE

APÉNDICE A: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO

- **Ochoa JP**, Sabater-Molina M, García-Pinilla JM, Mogensen J, Restrepo-Córdoba A, Palomino-Doza J, Villacorta E, Martínez-Moreno M, Ramos-Maqueda J, Zorio E, Peña-Peña ML, García-Granja PE, Rodríguez-Palomares JF, Cárdenas-Reyes IJ, de la Torre-Carpente MM, Bautista-Pavés A, Akhtar MM, Cicerchia MN, Bilbao-Quesada R, Mogollón-Jimenez MV, Salazar-Mendiguchía J, Mesa Latorre JM, Arnaez B, Olavarri-Miguel I, Fuentes-Cañamero ME, Lamounier A Jr, Pérez Ruiz JM, Climent-Payá V, Pérez-Sánchez I, Trujillo-Quintero JP, Lopes LR, Repáraz-Andrade A, Marín-Iglesias R, Rodríguez-Vilela A, Sandín-Fuentes M, Garrote JA, Cortel-Fuster A, Lopez-Garrido M, Fontalba-Romero A, Ripoll-Vera T, Llano-Rivas I, Fernandez-Fernandez X, Isidoro-García M, Garcia-Giustiniani D, Barriales-Villa R, Ortiz-Genga M, García-Pavía P, Elliott PM, Gimeno JR, Monserrat L. Formin Homology 2 Domain Containing 3 (FHOD3) Is a Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Nov 13;72(20):2457-2467. doi: 10.1016/j.jacc.2018.10.001.
- **Ochoa JP**, Lopes LR, Perez-Barbeito M, Cazón-Varela L, de la Torre-Carpente MM, Sonicheva-Paterson N, De Uña-Iglesias D, Quinn E, Kuzmina-Krutetskaya S, Garrote JA, Elliott PM, Monserrat L. Deletions of specific exons of FHOD3 detected by next-generation sequencing are associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet*. 2020 Jul;98(1):86-90. doi: 10.1111/cge.13759. Epub 2020 May 11.
- **Ochoa JP**, Elliott PM, Gimeno JR, Monserrat L. Reply: Revisiting Genome Sequencing Data in Light of Novel Disease Gene Associations. *J Am Coll Cardiol [Internet]*. 2019 Mar 26;73(11):1366-7. doi: 10.1016/j.jacc.2019.01.022.

Formin Homology 2 Domain Containing 3 (*FHOD3*) Is a Genetic Basis for Hypertrophic Cardiomyopathy



Juan Pablo Ochoa, MD,^{a,b} María Sabater-Molina, MD, PhD,^c José Manuel García-Pinilla, MD, PhD,^d Jens Mogensen, MD, PhD,^e Alejandra Restrepo-Córdoba, MD,^{f,g} Julián Palomino-Doza, MD, PhD,^h Eduardo Villacorta, MD,ⁱ Marina Martínez-Moreno, MD,^j Javier Ramos-Maqueda, MD,^k Esther Zorio, MD, PhD,^l María L. Peña-Peña, MD,^{b,m} Pablo E. García-Granja, MD,ⁿ José F. Rodríguez-Palomares, MD, PhD,^o Ivonne J. Cárdenas-Reyes, MD,^a María M. de la Torre-Carpente, MD, PhD,^p Alicia Bautista-Pavés, MD,^q Mohammed M. Akhtar, MD,^{r,s} Marcos N. Cicerchia, MD,^a Raquel Bilbao-Quesada, MD,^s María Victoria Mogollón-Jimenez, MD,^t Joel Salazar-Mendiguchía, MD,^{a,u} José M. Mesa Latorre, MD,^v Blanca Arnaez, MD,^w Ivan Olavarri-Miguel, MD,^x María E. Fuentes-Cañamero, MD,^y Arsonval Lamounier Jr, MD,^{a,b} José María Pérez Ruiz, MD,^z Vicente Climent-Payá, MD,^{aa,bb} Inmaculada Pérez-Sanchez, MD, PhD,^c Juan P. Trujillo-Quintero, MD, PhD,^a Luis R. Lopes, MD PhD,^{r,g,cc} Alfredo Repáraz-Andrade, MD,^{dd} Rosario Marín-Iglesias, MD,^{ee} Alejandro Rodríguez-Vilela, MD,^{ff} María Sandín-Fuentes, MD,ⁿ Jose A. Garrote, MD, PhD,^{gg} Alejandro Cortel-Fuster, MD,^{hh} Miguel Lopez-Garrido, MD,^c Ana Fontalba-Romero, MD,ⁱⁱ Tomás Ripoll-Vera, MD, PhD,^{jj} Isabel Llano-Rivas, MD,^{kk} Xusto Fernandez-Fernandez, MD,^a María Isidoro-García, MD, PhD,^{ll,mmm} Diego Garcia-Giustiniani, MD,^a Roberto Barriaes-Villa, MD, PhD,^{nn,oo} Martín Ortiz-Genga, MD,^{a,b} Pablo García-Pavía, MD, PhD,^{f,g} Perry M. Elliott, MD, PhD,^{g,r,cc} Juan R. Gimeno, MD, PhD,^{c,g} Lorenzo Monserrat, MD, PhD^a

ABSTRACT

BACKGROUND The genetic cause of hypertrophic cardiomyopathy remains unexplained in a substantial proportion of cases. Formin homology 2 domain containing 3 (*FHOD3*) may have a role in the pathogenesis of cardiac hypertrophy but has not been implicated in hypertrophic cardiomyopathy.

OBJECTIVES This study sought to investigate the relation between *FHOD3* mutations and the development of hypertrophic cardiomyopathy.

METHODS *FHOD3* was sequenced by massive parallel sequencing in 3,189 hypertrophic cardiomyopathy unrelated probands and 2,777 patients with no evidence of cardiomyopathy (disease control subjects). The authors evaluated protein-altering candidate variants in *FHOD3* for cosegregation, clinical characteristics, and outcomes.

RESULTS The authors identified 94 candidate variants in 132 probands. The variants' frequencies were significantly higher in patients with hypertrophic cardiomyopathy (74 of 3,189 [2.32%]) than in disease control subjects (18 of 2,777 [0.65%]; $p < 0.001$) or in the gnomAD database (1,049 of 138,606 [0.76%]; $p < 0.001$). *FHOD3* mutations cosegregated with hypertrophic cardiomyopathy in 17 families, with a combined logarithm of the odds score of 7.92, indicative of very strong segregation. One-half of the disease-causing variants were clustered in a small conserved coiled-coil domain (amino acids 622 to 655); odds ratio for hypertrophic cardiomyopathy was 21.8 versus disease control subjects (95% confidence interval: 1.3 to 37.9; $p < 0.001$) and 14.1 against gnomAD (95% confidence interval: 6.9 to 28.7; $p < 0.001$). Hypertrophic cardiomyopathy patients carrying (likely) pathogenic mutations in *FHOD3* ($n = 70$) were diagnosed after age 30 years (mean 46.1 ± 18.7 years), and two-thirds (66%) were males. Of the patients, 82% had asymmetric septal hypertrophy (mean 18.8 ± 5 mm); left ventricular ejection fraction $< 50\%$ was present in 14% and hypertrabeculation in 16%. Events were rare before age 30 years, with an annual cardiovascular death incidence of 1% during follow-up.

CONCLUSIONS *FHOD3* is a novel disease gene in hypertrophic cardiomyopathy, accounting for approximately 1% to 2% of cases. The phenotype and the rate of cardiovascular events are similar to those reported in unselected cohorts. The *FHOD3* gene should be routinely included in hypertrophic cardiomyopathy genetic testing panels. (J Am Coll Cardiol 2018;72:2457-67) © 2018 The Authors. Published by Elsevier on behalf of the American College of Cardiology Foundation. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Listen to this manuscript's audio summary by JACC Editor-in-Chief Dr. Valentin Fuster.



ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

DCM = dilated cardiomyopathy

FHOD3 = formin homology 2 domain containing 3 gene

GWAS = genome-wide association studies

HCM = hypertrophic cardiomyopathy

LOD = logarithm of the odds

MAF = minor allele frequency

SCD = sudden cardiac death

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common inherited cardiomyopathy and is characterized by clinical variability and genetic heterogeneity (1). The introduction of massive parallel sequencing has improved the understanding of the disease, but >40% of genetic studies reveal no pathogenic mutation, suggesting that new disease-associated genes remain to be discovered. One potential candidate is formin homology 2 domain containing 3 (*FHOD3*) gene.

pathogenesis of cardiac hypertrophy (5), but no pathogenic variants clearly associated with HCM have been reported.

At the beginning of 2014, we included *FHOD3* in genetic panels used to screen patients with inherited cardiomyopathies. After detecting an *FHOD3* variant that segregated with HCM in a large Spanish family, we performed a systematic evaluation of *FHOD3* mutations in a larger cohort of patients and in a control population.

METHODS

From February 2014 to August 2017, *FHOD3* was sequenced using next-generation sequencing in 7,881 consecutive unrelated probands with a diagnosis of different inherited cardiac conditions referred to our center for molecular genetic diagnosis. The phenotypes were established by each center prior to the genetic studies. Patients' samples were referred mainly from centers from Spain, followed by centers from the United Kingdom, Denmark, United States, Germany, and Argentina.

SEE PAGE 2468

Formins are a family of proteins containing a series of conserved domains and functional motifs that regulate actin dynamics (2). *FHOD3* protein is expressed exclusively in the heart and plays an important role in sarcomere organization, myofibrillogenesis, and maintenance of the contractile apparatus in cardiomyocytes (3,4). Functional and genome-wide association studies (GWAS) have suggested a potential role of *FHOD3* in the

From the ^aHealth in Code S.L., Scientific Department, A Coruña, Spain; ^bUniversidade da Coruña, GRINCAR (Cardiovascular Research Group), A Coruña, Spain; ^cHospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Inherited Cardiac Diseases Unit, Department of Cardiology, Murcia, Spain; ^dHospital Universitario Virgen de la Victoria, Cardiology, Heart Failure and Inherited Cardiac Diseases Unit, Málaga, Spain; ^eOdense Universitetshospital, Cardiology, Odense, Denmark; ^fHospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Cardiology, Heart Failure and Inherited Cardiac Diseases Unit, Madrid, Spain; ^gEuropean Reference Network on Rare and Complex Diseases of the Heart; ^hHospital Universitario 12 de Octubre, Cardiology, Madrid, Spain; ⁱHospital Universitario de Salamanca, Cardiology, Salamanca, Spain; ^jHospital General Universitario de Elche, Cardiology, Elche, Spain; ^kHospital Universitario Virgen de Valme, Cardiology, Sevilla, Spain; ^lHospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ^mHospital Universitario Virgen del Rocío, Cardiology, Sevilla, Spain; ⁿHospital Clínico Universitario de Valladolid, Cardiology, Valladolid, Spain; ^oHospital Vall d'Hebron, Cardiology, Barcelona, Spain; ^pHospital Universitario Rio Hortega, Cardiology, Valladolid, Spain; ^qHospital Universitario San Cecilio, Cardiology, Granada, Spain; ^rSaint Bartholomew's Hospital, Barts Heart Centre, London, United Kingdom; ^sComplejo Hospitalario Universitario de Vigo, Cardiology, Vigo, Spain; ^tHospital San Pedro de Alcántara, Cardiology, Cáceres, Spain; ^uUniversitat Autònoma de Barcelona, Departament de Genètica i de Microbiologia, Barcelona, Spain; ^vHospital Universitario Príncipe de Asturias, Clinical Genetics, Alcalá de Henares, Spain; ^wHospital Sierrallana, Cardiology, Torrelavega, Spain; ^xHospital Universitario Marqués de Valdecilla, Cardiology, Santander, Spain; ^yHospital Universitario Infanta Cristina, Cardiology, Badajoz, Spain; ^zHospital Regional Universitario "Carlos Haya," Cardiology, Málaga, Spain; ^{aa}Hospital General Universitario de Alicante, Cardiology, Alicante, Spain; ^{bb}Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL-FIDABIO Foundation), Alicante, Spain; ^{cc}University College London Institute for Cardiovascular Science, London, United Kingdom; ^{dd}Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Genetics and Molecular Pathology, Vigo, Spain; ^{ee}Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain; ^{ff}Complejo Hospitalario Arquitecto Marcede, Cardiology, El Ferrol, Spain; ^{gg}Hospital Universitario Rio Hortega, Molecular Genetics Laboratory, Valladolid, Spain; ^{hh}Hospital Provincial Castellón, Cardiology, Castellon, Spain; ⁱⁱHospital Universitario Marqués de Valdecilla, Genetics, Santander, Spain; ^{jj}Hospital Son Llatzer, Cardiology, Inherited Cardiomyopathies Unit, Palma de Mallorca, Spain; ^{kk}Hospital Universitario Cruces, Clinical Genetics, Barakaldo, Spain; ^{ll}Universidad de Salamanca, Medicine, Salamanca, Spain; ^{mm}Hospital Universitario de Salamanca, Molecular Genetics and Pharmacogenetics, Salamanca, Spain; ⁿⁿInstituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), A Coruña, Spain; and the ^{oo}Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Cardiology, A Coruña, Spain. This study was supported by grants from the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centre (to Drs. Elliot, Akhtar, and Lopes); Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERCV), "Instituto de Salud Carlos III," CB16/11/00425 (to Dr. Barriales-Villa) and CB16/11/00432 (to Dr. Garcia-Pavia); "Instituto de Salud Carlos III," FEDER "Union Europea, Una forma de hacer Europa" (PI14/01477 and La Fe Biobank PT17/0015/0043) (to Dr. Molina) and PI17/01941 (to Dr. Garcia-Pavia). Drs. Ochoa, Cárdenas-Reyes, Salazar-Mendiguchía, Cicerchia, García-Giustinianni, Trujillo, and Ortiz-Genga are employees of Health in Code SL. Dr. Barriales-Villa has received personal fees from Health in Code SL. Dr. Fernandez-Fernandez is an employee of and stakeholder of Health in Code SL. Dr. Monserrat is a stakeholder and CEO of Health in Code SL. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

Manuscript received February 25, 2018; revised manuscript received August 6, 2018, accepted August 14, 2018.

Of the probands, 3,189 had a diagnosis of HCM. An additional 2,777 index cases with no evidence of structural cardiac disease (mainly channelopathies and aortic diseases) were used as control subjects. The predominant ethnicity was European (>90% of the probands), and there were no differences between HCM probands and control subjects. The variants' frequencies in the general population were extracted from the gnomAD database version r2.0, August 2017 (6).

In the initial screening phase, candidate variants in *FHOD3* were identified and their frequencies compared in HCM versus control subgroups. We applied an MAF (minor allele frequency) threshold of 5×10^{-5} to consider a variant a candidate, following the same arguments used by Walsh et al. (7) to reassess gene pathogenicity in cardiomyopathies; we also excluded variants with an $MAF \geq 1 \times 10^{-4}$ in any subpopulation of gnomAD to avoid variants detected in cases could be enriched in 1 specific population. Only unrelated index cases were included in the screening phase of the study. Patients with cardiomyopathies other than HCM and sudden cardiac death (SCD) victims were excluded from the analysis.

In the second phase, HCM probands carrying candidate variants in *FHOD3* were invited to participate in segregation studies. Clinical and genetic familial cascade screening was performed following written informed consent in those who agreed to participate. Carriers of variants in other sarcomeric genes that could be related to the phenotype (pathogenic, likely pathogenic, or of uncertain significance in a priority gene) were excluded. The clinical characteristics and outcomes in carriers of pathogenic or likely pathogenic variants in *FHOD3* with HCM (including probands and relatives) were assessed. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of A Coruña-Ferrol (registry code 2015/576).

GENETIC STUDIES, VARIANT FILTERING, AND VARIANT CLASSIFICATION. Coding exons and intronic boundaries of 213 genes related to inherited cardiovascular diseases and SCD (Online Table 1) were captured using a custom probe library (SureSelect Target Enrichment Kit for Illumina paired-end multiplexed sequencing method, Agilent Technologies, Santa Clara, California) and sequenced using the HiSeq 1500 platform (Illumina, San Diego, California) following Illumina protocols. The read depth (number of times that a base was sequenced by independent reads) of every nucleotide of genes related to the referring phenotype (including *FHOD3*) was $>30\times$ (mean $250\times$ to $400\times$). Exons that did

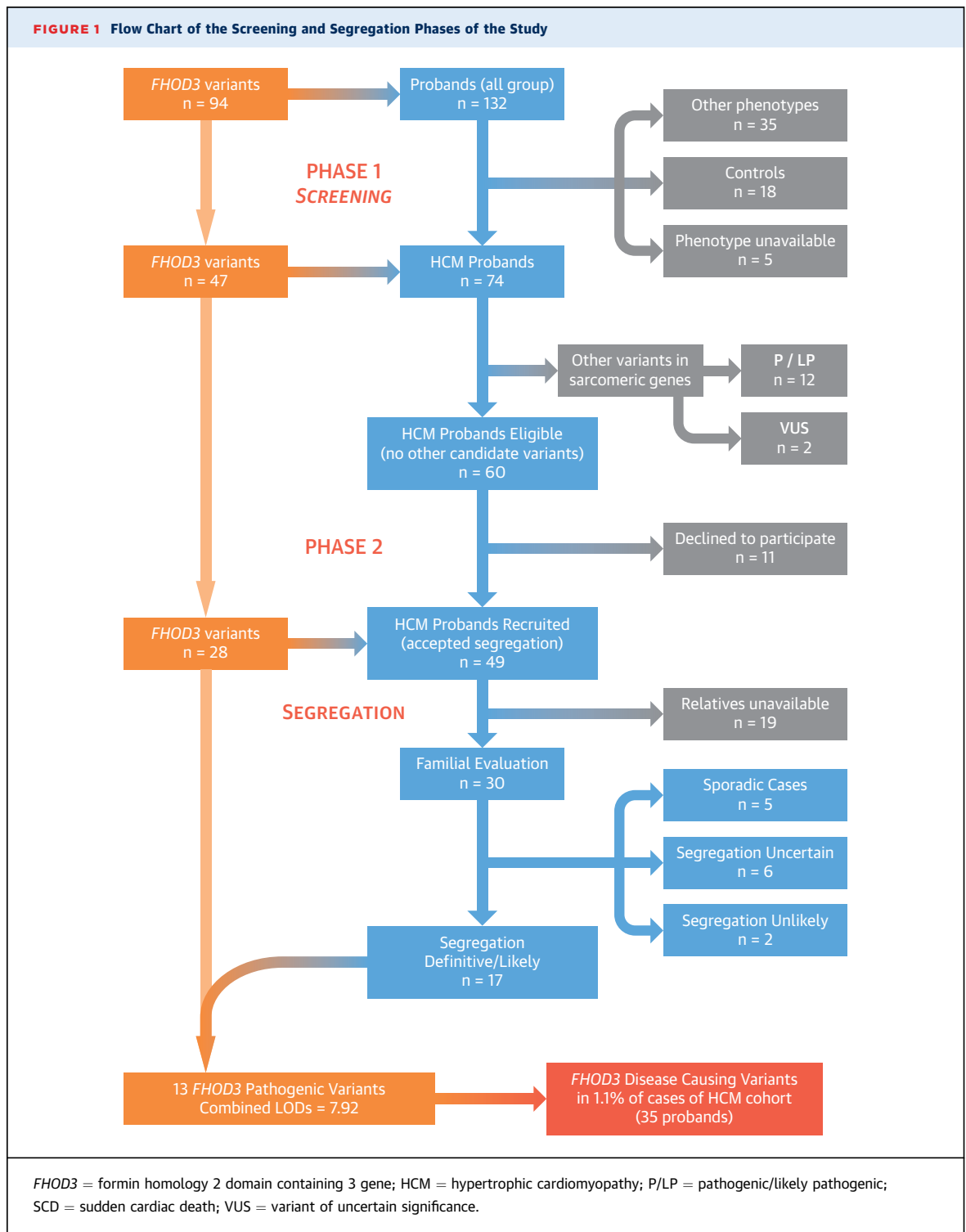
not fulfill this standard were complementary sequenced using the Sanger method. Only likely protein-altering variants (missense, in-frame insertions/deletions, frameshift, nonsense, and consensus splice site mutations) in the most relevant, longest transcript of the *FHOD3* gene (NM_001281740.1; 1,644 amino acids) were analyzed. Bioinformatics analysis was performed by means of a custom pipeline including software for variant calling, genotyping, and annotation.

To establish the pathogenicity of identified variants, we developed a customized classification scheme based on the recommendations of the American College of Medical Genetics and Genomics (Online Table 2) (8); the final classification of each variant was agreed by consensus between 2 cardiologists with experience in interpretation of genetic variants.

STATISTICAL ANALYSIS. Continuous variables were expressed as mean \pm SD, and comparison between groups was performed using the Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U* test according to values distribution. Noncontinuous variables were expressed as an integer number (percent of total) and compared using the chi-square test or Fisher exact test, as appropriate. A 2-sided *p* value <0.05 was considered to indicate statistical significance. Analysis was performed using R version 3.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

LOGARITHMS OF ODDS SCORE CALCULATION. We calculated 2-point logarithm of the odds (LOD) score for informative families by using the PARMLINK package for R software (9). The model was set with $\theta = 0$, phenocopy rate = 0.005, and 2 different penetrance values: 0.80 and 0.95. An indeterminate status was assigned to family members with a confounding cardiac diagnosis, as well as to men younger than age 45 years and women younger than age 50 years who did not meet clinical criteria for HCM and could develop the disease afterwards.

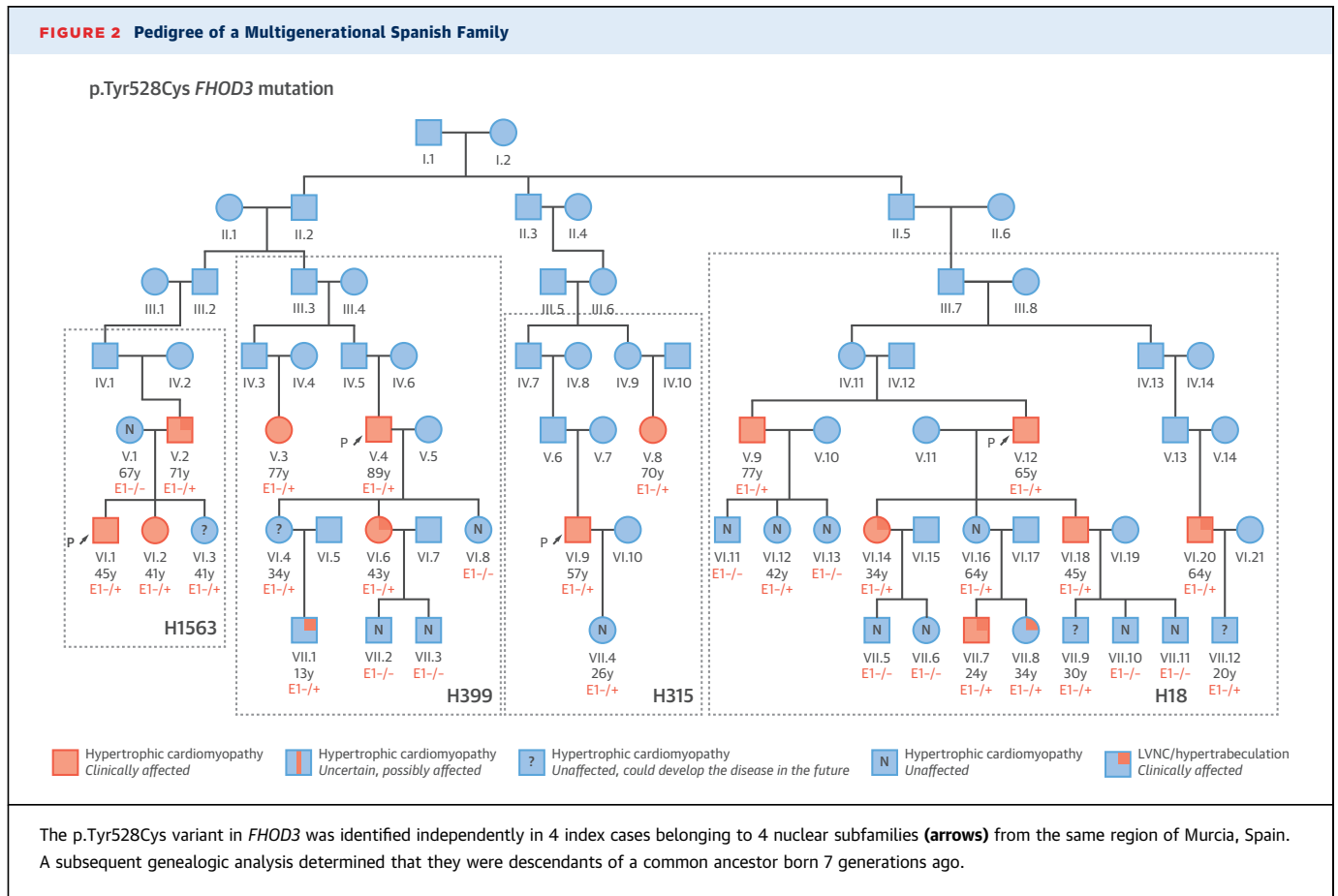
SURVIVAL ANALYSIS. The cumulative probability of cardiovascular death in carriers of disease-causing mutations in *FHOD3* after a diagnosis of HCM (follow-up) was estimated using the Kaplan-Meier method. Cardiovascular death was defined as the presence of sudden cardiac death, appropriate defibrillator shock, heart failure death, or heart transplantation. The beginning of the follow-up was established as the first clinical visit when the patient had a diagnosis of the disease (unaffected carriers and SCD cases in which HCM was diagnosed postmortem were excluded from this analysis).



RESULTS

STUDY POPULATION. A total of 94 candidate variants in *FHOD3* distributed in 132 probands were identified, representing 1.67% of the 7,881 consecutive unrelated probands who were sequenced. Of these variants, 90 were nontruncating (88 missense,

2 in-frame deletion/insertion) and 4 were truncating (3 nonsense, 1 frameshift). HCM was the diagnosis in 74 of the 132 probands (56.1%) who carried a candidate variant in *FHOD3*. In 5 probands the phenotype was unavailable, and 18 individuals were control subjects without evidence of structural cardiac disease. A total of 35 patients were excluded from the



analysis: 27 patients had a diagnosis of a cardiomyopathy other than HCM (18 dilated cardiomyopathy [DCM], 5 arrhythmogenic cardiomyopathy, 3 left ventricular noncompaction, and 1 restrictive cardiomyopathy), while 8 patients were SCD victims. A detailed description of the variants, population frequencies, bioinformatics predictors, initial estimation of pathogenicity, and the phenotype in carriers are shown in [Online Table 3](#) and [Online Figure 1](#).

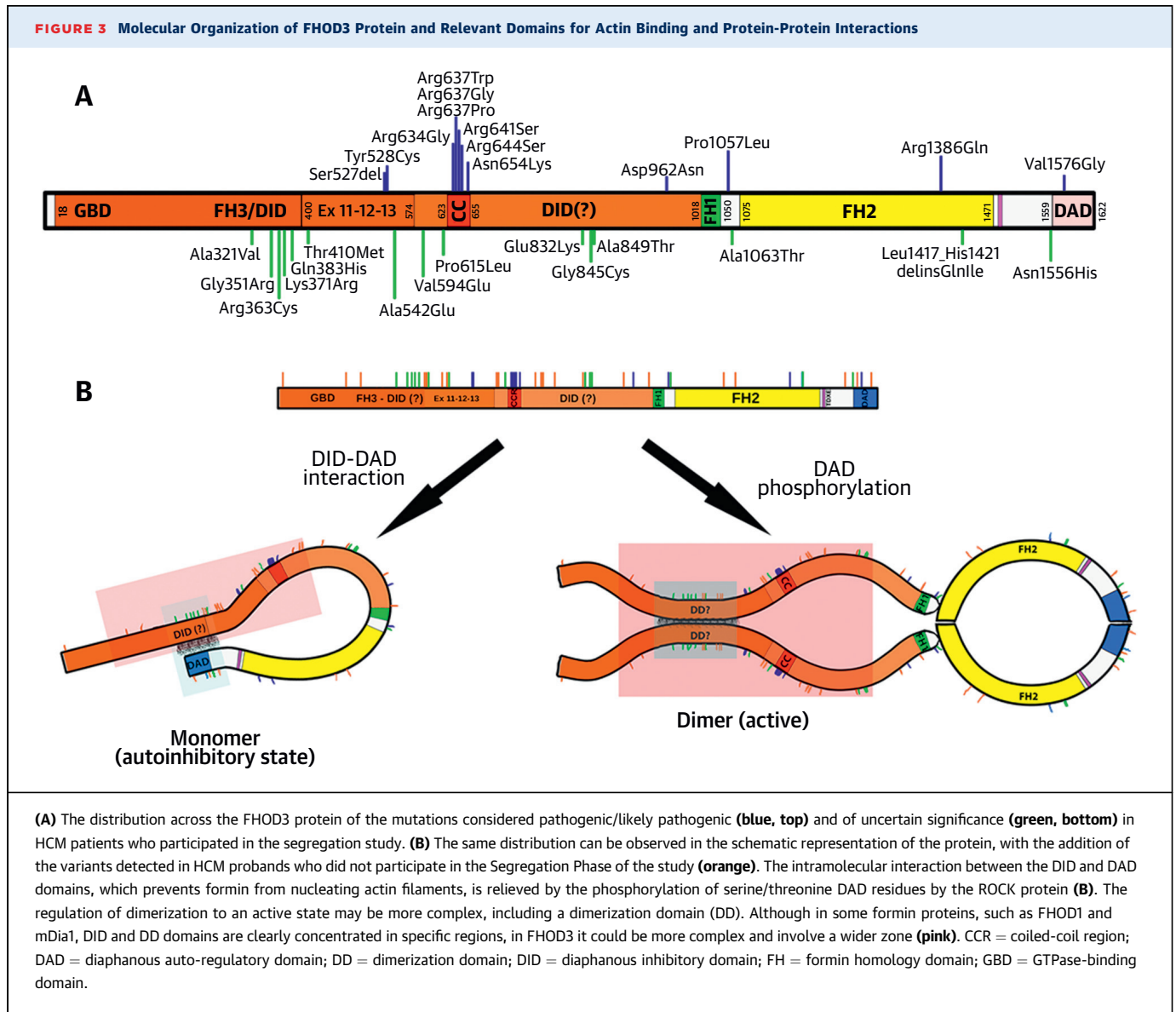
The prevalence of candidate variants in *FHOD3* was higher in the HCM cohort (2.32%; 47 variants in 74 of 3,189 probands) than in disease control subjects (0.65%; 17 variants in 18 of 2,777) or in the gnomAD database (0.76%; 587 variants in 1,049 of 138,606 individuals), with an odds ratio (OR) of 3.64 (95% confidence interval [CI]: 2.17 to 6.11; $p < 0.001$) and 3.02 (95% confidence interval: 2.45 to 3.95; $p < 0.001$), respectively.

SEGREGATION STUDY. Of the 74 probands with a diagnosis of HCM, 14 were excluded because they were carriers of additional variants in a sarcomeric gene that could be related to the phenotype: 12 of 74 (16.2%) a pathogenic or likely pathogenic variant (9 in

MYBPC3 and 3 in *MYH7*) and 2 of 74 (2.7%) a variant of unknown clinical significance (1 in *MYBPC3* and 1 in *MYL2*) ([Online Table 4](#)).

Finally, 49 HCM probands carrying 27 candidate variants in *FHOD3* recruited from 27 different centers accepted to participate in the segregation phase of the study, as shown in the study flow chart ([Figure 1](#)). Clinical assessment was possible in the relatives of 30 probands ([Online Figure 2](#), [Online Table 5](#)). The presentation was familial (at least 1 affected family member) in 25 families (83%), and 5 cases (17%) were sporadic (there was no family history, and none of the evaluated relatives were affected).

After clinical evaluation and genotyping of 129 members from 25 families, a final combined LOD score of 7.92 was obtained, equivalent to a p value $< 3 \times 10^{-7}$, indicative of very strong cosegregation ([Online Table 6](#)) (9). A total of 13 variants were considered pathogenic or very likely pathogenic; in all of them, there was evidence of cosegregation with HCM in at least 1 family ([Online Table 7](#)). Disease-causing variants were distributed in 35 HCM probands without additional variants that could explain the disease in sarcomeric genes,



representing 1.1% (35 of 3,189) of the entire HCM cohort.

In 6 families, segregation analysis was uncertain, and was unlikely in 2 (the probands were carriers of the variants p.Lys371Arg and p.Glu832Lys) (Online Figure 2, panel 1B). It was not possible to determine the pathogenicity of 14 variants that were finally classified as of unknown clinical significance.

The most commonly identified variants affected consecutive amino acids. The variant p.Tyr528Cys was identified in 6 probands, 4 of whom came from the same region of Spain and were proved to be descendants of a common ancestor born 7 generations ago (Figure 2). In this multigenerational family, the variant cosegregated with the disease with the highest LOD score (3.82) for an individual family. The

other 2 probands came from centers from the United Kingdom and Denmark. The variant p.Ser527del, affecting the previous residue, was detected in 12 HCM probands from different geographical areas in Spain, Denmark, and the United Kingdom as well. None of these probands had additional variants in sarcomeric genes that could explain the disease, and cosegregation with the phenotype was confirmed in the 5 families with relatives available for evaluation. Among the remaining variants, 7 were clustered in a conserved small coiled-coil domain (amino acids 622 to 655) (Figure 3A, Online Figure 3). The OR of the presence of a candidate variant in *FHOD3* in this coiled-coil domain in HCM was 21.8 against control subjects (95% confidence interval [CI]: 1.3 to 37.9; $p < 0.001$) and 14.1 against gnomAD individuals

(95% CI: 6.9 to 28.7; $p < 0.001$). The complete list of the pathogenic or likely pathogenic variants and the distribution along the FHOD3 protein is summarized in **Figure 3A**. The variants identified in control subjects or in phenotypes other than HCM were randomly distributed throughout the gene, but none of them was identified in the coiled-coil domain or affecting residues 527 to 528 (**Online Figure 1**).

Only 2 truncating variants in FHOD3 were identified in HCM cases: p.Lys1433Serfs*10 and p.Arg1597*. Both were present at very low frequencies in control subjects (MAF% 0.002 and 0.0004, respectively). The p.Lys1433Serfs*10 variant was identified in a patient who carried an additional variant, p.Arg17Gln, in MYBPC3; although it was excluded from the analysis, segregation was evaluated in the family, but the results were inconclusive (**Online Figure 2**). The nonsense variant p.Arg1597* was identified in 2 probands: 1 was a sporadic case with a nonsevere phenotype diagnosed after age 75 years and the second was a patient with restrictive cardiomyopathy (the variant did not segregate with the disease in this family). Both variants were considered of uncertain significance.

CLINICAL CHARACTERISTICS OF HCM PATIENTS CARRYING DISEASE-CAUSING VARIANTS IN FHOD3. Demographic, clinical, echocardiographic, and electrocardiographic characteristics of HCM carriers of disease-causing variants in FHOD3 are shown in **Table 1**. Two-thirds (66.7%) of the probands were males; this predominance was also observed in affected relatives (56.8% vs. 43.2%). There was no difference in the age at diagnosis between index cases and relatives. Most of the patients were diagnosed after age 30 years (median 58 years in women and 48 years in men). Incomplete penetrance was observed: at age 70 years, 15% of men and 32% of women were clinically unaffected (**Figure 4A**).

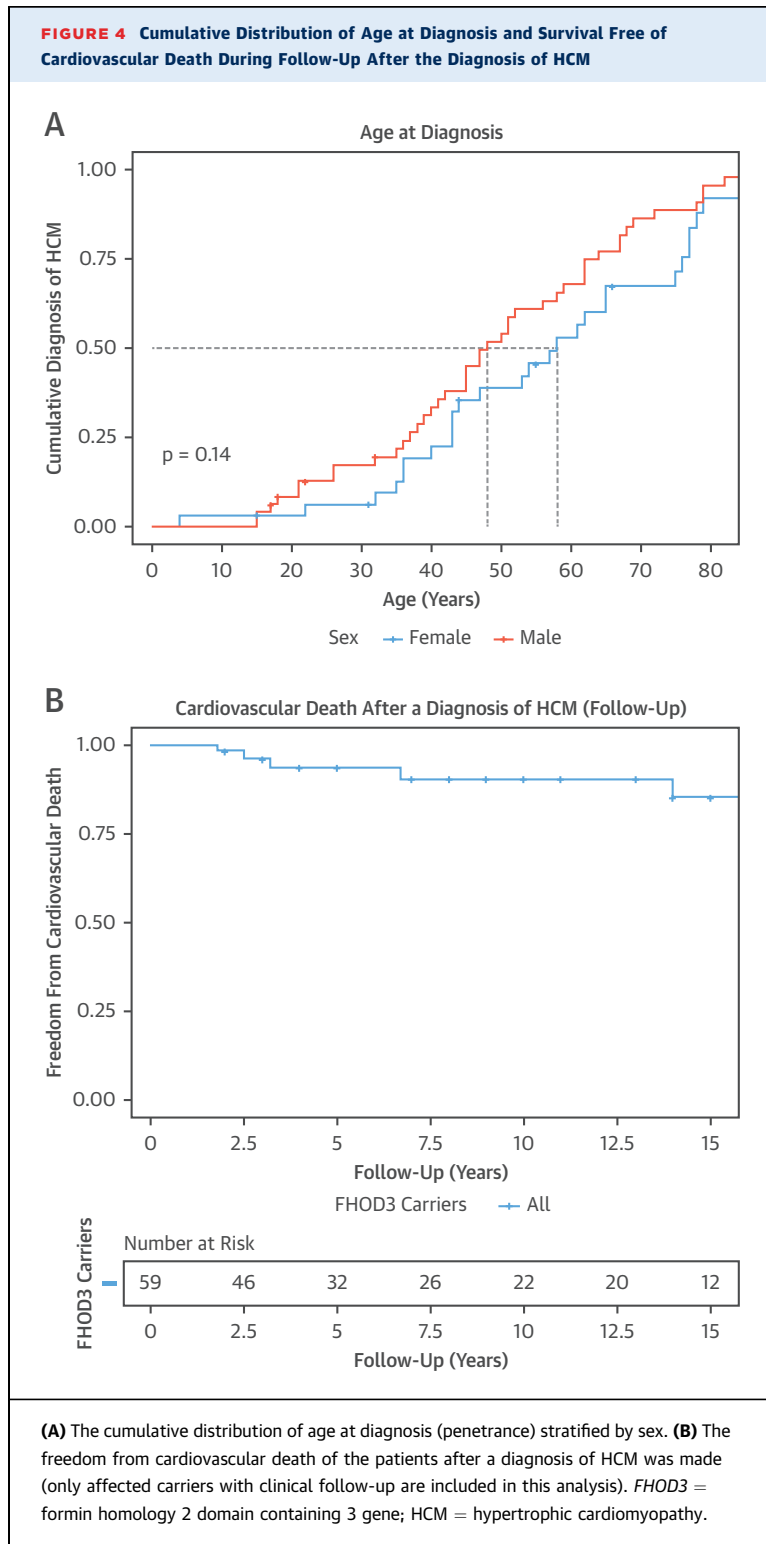
Approximately 40% of the patients were symptomatic, with dyspnea as the most common symptom. The predominant HCM subtype was asymmetric septal hypertrophy (82%). The degree of hypertrophy was mild to moderate (mean 18.8 ± 5 mm), and the presence of massive hypertrophy (≥ 30 mm) was exceptional. Left ventricular outflow tract obstruction and systolic anterior movement of the mitral valve were present in 21% and 12.5% of the patients, respectively. Left ventricular systolic dysfunction (ejection fraction $< 50\%$) was described in 14% of the patients. Hypertrabeculation of the left ventricle was present in 16% (8 of 49) of the patients, one-half of

TABLE 1 Clinical Characteristics of HCM Patients Carrying Pathogenic or Likely Pathogenic Variants in FHOD3 Stratified by Sex

	Overall (N = 70)	Male (n = 43)	Female (n = 27)	p Value
Cardiac structural affection				
HCM subtype				
Septal asymmetric	35/41 (85.4)	22/25 (88)	13/16 (81.3)	NS
Concentric	4/41 (9.8)	2/25 (8.0)	2/16 (12.5)	NS
Apical	2/41 (6.3)	1/25 (4.0)	1/25 (4.0)	NS
LVMWT, mm	18.8 ± 5.4	18.9 ± 5.4	18.6 ± 5.6	NS
LVMWT > 30 mm	3/64 (4.7)	1/39 (2.6)	2/25 (8.0)	NS
LVMWT > 25 mm	7/64 (10.9)	4/39 (10.3)	3/25 (12.0)	NS
LV dilatation	2/55 (3.6)	0/31 (0.0)	2/24 (8.3)	NS
LVEDD, mm	45.7 ± 5.9	46.8 ± 5.2	43.8 ± 6.7	NS
LV dysfunction (EF $< 50\%$)	6/46 (13.0)	1/25 (4.0)	5/21 (23.8)	0.079
EF, %	61.5 ± 11.9	64.8 ± 8.5	57.5 ± 14.2	0.046
Hypertrabeculation				
Positive LVNC criteria	4/49 (8.2)	1/27 (3.7)	3/22 (13.6)	NS
Negative LVNC criteria	4/49 (8.2)	4/27 (14.8)	0/22 (0.0)	NS
LA dilatation				
LA, mm	41.7 ± 8	44.4 ± 8.2	38.2 ± 7.9	0.026
LVOTO	9/42 (21.4)	4/24 (16.7)	5/18 (27.8)	NS
SAM (MV)	5/40 (12.5)	4/22 (18.2)	1/18 (5.6)	NS
CMR LGE	11/17 (64.7)	6/10 (60.0)	5/7 (71.4)	NS
ECG and arrhythmias				
ECG rhythm				
Sinus rhythm	48/55 (87.3)	26/30 (86.7)	22/25 (88.0)	NS
Atrial fibrillation	6/55 (10.9)	4/30 (13.3)	2/25 (8.0)	NS
Pacemaker	1/55 (1.8)	0/30 (0.0)	1/25 (4.0)	NS
ECG LVH	39/49 (79.6)	19/27 (70.4)	20/22 (90.9)	0.076
Atrial fibrillation history				
Permanent	8/58 (13.8)	5/33 (15.2)	3/25 (12.0)	NS
Paroxysmal	3/58 (5.2)	0/33 (0.0)	3/25 (12.0)	NS
NSVT	11/41 (26.8)	4/23 (17.4)	7/18 (38.9)	NS
Frequent PVC	6/40 (15.0)	3/23 (13.0)	3/17 (17.6)	NS
ICD implanted	10/58 (17.2)	5/33 (15.2)	5/25 (20.0)	NS
History and symptoms				
Age at diagnosis	46.1 ± 18.7	43.6 ± 18.2	50.9 ± 19.2	0.047
Hypertension	8/43 (18.6)	3/26 (11.5)	5/17 (29.4)	NS
Dyspnea				
NYHA functional class II	19/59 (32.2)	9/34 (26.4)	10/25 (40.0)	NS
NYHA functional class III-IV	6/59 (10.1)	1/34 (2.9)	5/25 (20.0)	0.069
Syncope	5/56 (8.9)	4/31 (12.9)	1/25 (4.0)	NS
Events				
Cardiovascular death (overall)	13/68 (19.1)	10/41 (24.4)	3/27 (11.1)	NS
Sudden cardiac death	11/68 (16.2)	9/41 (22.0)	2/27 (7.4)	NS
Heart failure death/heart transplantation	2/68 (2.9)	1/41 (2.4)	1/27 (3.7)	NS
Stroke	5/64 (7.8)	2/38 (5.3)	3/26 (11.5)	NS

Values are n/N (%) or mean \pm SD.

CMR LGE = late-gadolinium enhancement in magnetic resonance images; ECG = electrocardiogram; EF = ejection fraction; ICD = implantable cardioverter-defibrillator; LA = left atrium; LV = left ventricle; LVEDD = left ventricular end-diastolic diameter; LVH = left ventricular hypertrophy; LVMWT = maximal left ventricular wall thickness; LVNC = left ventricular noncompaction; LVOTO = left ventricular outflow tract obstruction; NSVT = nonsustained ventricular tachycardia; NYHA = New York Heart Association; PVC = premature ventricular contractions; SAM (MV) = systolic anterior movement of the mitral valve.



whom (4 of 49; 8%) fulfilled the criteria for left ventricular noncompaction.

EVENTS. A total of 13 of the 81 carriers/affected relatives (16%) experienced a cardiovascular death. The incidence was higher in men (10 of 48; 20.1%) than in

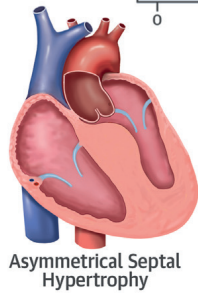
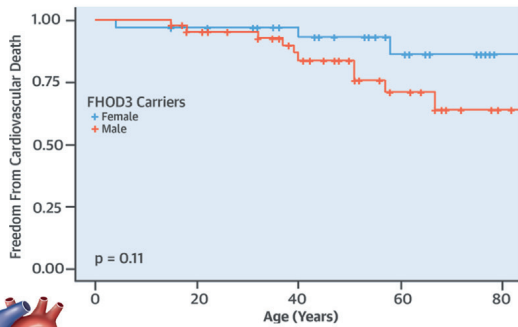
women (3 of 33; 7.3%), but did not reach statistical significance ($p = 0.16$). Events were rare before the age of 30 years. The annual cardiovascular death incidence after the diagnosis of HCM was approximately 1% per year (Figure 4B) with a median of follow-up of 5 years in the group (range 1.8 to 18 years). SCD was the most frequent cause (11 of 13; 85%), being the first manifestation of the disease in 4 probands; the diagnosis was made after successful resuscitation from cardiac arrest in 2 and on autopsy in 2 other cases, 1 of whom was a compound heterozygous carrier of p.Arg1386Gln and p.Pro615Leu in *FHOD3* (Online Figure 2). The other 7 were relatives in whom genetic testing was unavailable. Two patients (2 of 13; 15%) experienced heart failure death: a 58-year-old woman who had a concomitant diagnosis of rheumatic severe mitral stenosis and a 37-year-old man with a restrictive filling pattern.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated a clear relationship between *FHOD3* mutations and the development of HCM (Central Illustration). Almost 7,800 probands were screened for the presence of very rare candidate variants in *FHOD3*, and an excess of these variants in the HCM cohort with respect to control subjects was observed (OR: 3). This ratio is lower than those obtained by other groups using the same approach for nontruncating variants in *MYBPC3* (OR: 5.7) or *MYH7* (OR: 12) (7), reflecting that not all of the very rare candidate variants in *FHOD3* are necessarily associated with disease. As in other sarcomeric genes, it is difficult to predict if a novel nontruncating variant is pathogenic or not; in these cases, segregation analysis in the family is mandatory. In our study, cosegregation of several variants in *FHOD3* was confirmed, yielding a combined LOD score of 7.95, which is indicative of very strong cosegregation (highly significant linkage) (10). Disease-causing variants in *FHOD3* accounted for at least 1% of HCM cases. Taking into account that in this study we used a very strict strategy to consider a variant disease-causing (only variants with evidence of segregation), that segregation was evaluable in only one-half of the candidate variants, and that cases with additional potentially pathogenic variants in other sarcomeric genes were excluded, it is likely that *FHOD3* mutations account for approximately 2% of HCM cases and 4% of positive genetic studies. This prevalence would be similar to or greater than the reported prevalence of mutations in established sarcomeric protein genes, such as *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, and *TNNC1* (11,12).

CENTRAL ILLUSTRATION FHOD3 is a Novel Disease-Causing Gene in HCM

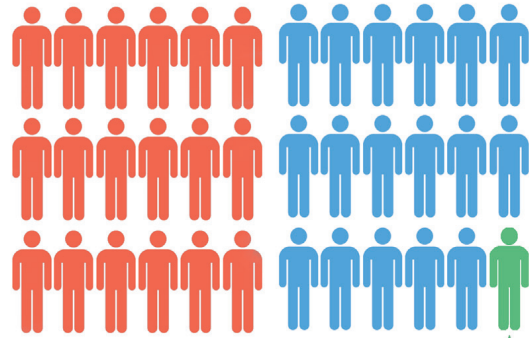
**13 Variants in 17 Families
Cosegregation (LOD Score 7.9)**



Asymmetrical Septal Hypertrophy

**Phenotype Similar to HCM
Unselected Cohorts**

**FHOD3 Disease-Causing Gene in
Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM)**



1%-2% HCM Cases

Include in HCM Genetic Panels

Ochoa, J.P. et al. J Am Coll Cardiol. 2018;72(20):2457-67.

Diagram illustrating the results and main messages of the study. Around 50% of the genetic tests performed in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) are negative; *FHOD3* plays a role in sarcomere organization, but was considered only a candidate gene. After evaluating >7,800 probands, we identified disease-causing variants in *FHOD3* cosegregating with HCM in several families and accounting for approximately 1% to 2% of HCM cases. *FHOD3* should be routinely included in HCM genetic testing panels. *FHOD3* = formin homology 2 domain containing 3 gene; LOD = logarithm of the odds.

The phenotype associated with *FHOD3* mutations in our study was relatively mild, with a low rate of adverse events in young individuals and an overall rate of cardiovascular endpoints similar to that described in unselected HCM patient cohorts (12,13). Two-thirds of the index cases were men, and the diagnosis in female carriers was made 10 years later than in males. Late onset of the disease and incomplete penetrance were observed in both sexes.

The association between *FHOD3* and HCM has been postulated in a GWAS study (5). The authors identified 2 frequent polymorphisms in *FHOD3* (1 deep intronic variant and the missense variant p.Val1326Ile, both with MAFs $\geq 30\%$) that were more frequent in HCM cases than in control subjects, but failed to demonstrate a difference in phenotype expression between homozygous and heterozygous carriers of the p.Val1326Ile variant. These findings can be considered an association (a signal in the

GWAS study) between the gene and the phenotype, but no description of any variant in *FHOD3* causing HCM has been published to date. The explanation for this might be that most diagnostic laboratories do not include *FHOD3* in their sequencing panels; thus, very rare protein-altering candidate variants are not being identified. Alternatively, it can be difficult to detect an association in a GWAS when mild phenotypes with incomplete penetrance are present, and this type of study focuses on detecting frequent polymorphisms but is not designed to detect very rare variants.

A possible association of *FHOD3* mutations with DCM has also been suggested; there is a report of a small Japanese family (only 2 members were genotyped) in whom an in vivo functional study showed that the identified variant impaired actin filament assembly (14), and previous functional studies in animal models have demonstrated that *FHOD3* plays

a role in heart development (15). Similarly, an exome-wide association study identified *FHOD3* as 1 of 8 loci independently associated with sporadic DCM (16). Our study was not designed to determine the possible causal relationship between *FHOD3* and DCM. Of the 130 probands carrying candidate variants in *FHOD3*, 18 had this phenotype (they were excluded in the screening phase of the study). These variants were not clustered in any particular region of the gene, and most of them were classified as of uncertain significance at initial evaluation. Further studies are needed to establish the clinical relevance of *FHOD3* mutations and their relationship to DCM.

The relationship between *FHOD3* and ventricular hypertrophy has been recently explored in a study of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy (17). Under basal conditions, the *FHOD3* protein exists in an auto-inhibited state due to the interaction between its diaphanous autoregulatory domain and the diaphanous inhibitory domain (Figure 3B). The phosphorylation of specific phospho-acceptor residues located in the autoregulatory domain (Ser1590, Ser1596, and Thr1600) by the RhoA/ROCK pathway seems to inhibit the interaction with the inhibitory domain, allowing the *FHOD3* protein to form active dimers that enable actin nucleation and assembly of myofibrils in cardiomyocytes, thereby causing cellular hypertrophy (18). Several *FHOD3* candidate variants in this study were located in the autoregulatory and inhibitory domains or their surrounding residues (Figure 3A, Online Figure 1); 1 hypothesis is that these mutations alter the normal interaction, leading to a predominance of *FHOD3* protein in an activated state, a mechanism that has been described for mutations in the paralogue *FHOD1* (19,20).

FHOD3 protein dimerization to an activated state may be more complex, including a dimerization domain and a helical region (coiled-coil domain) that forms a cross-bridge between the opposing chains and provides the conformational flexibility required for the stair-stepping actin polymerization mechanism (21). One-half of the disease-causing variants found in our study were located in the coiled-coiled domain that seems to be specific for a HCM phenotype (no disease controls or patients with cardiomyopathies other than HCM where identified in it). The exact location and functional characterization of the inhibitory and dimerization domains in *FHOD3* are still not well understood; 2 clearly pathogenic variants that cosegregated with HCM in several families (p.Ser527del and p.Tyr528Cys) were found near these domains. They also affect an exon that is only present in the longest transcript of *FHOD3*, which is currently

considered the most important isoform in the adult ventricular myocardium, because it contains an additional exon that is required for targeting the *FHOD3* protein to the myofibrils in cardiomyocytes (22). Our findings support the relevance of this isoform in the pathogenesis of HCM, although functional studies are needed to determine the exact mechanisms underlying the development of HCM in *FHOD3* mutation carriers.

STUDY LIMITATIONS. One of the limitations of our study is that segregation was limited in some families because of the small number of relatives available for screening, and clinical assessment was incomplete in some carriers. Another possible limitation is that patients were screened only for genes previously associated with inherited cardiac conditions; therefore, the presence of mutations in other genes contributing to the phenotype cannot be ruled out.

CONCLUSIONS

In this study, we have demonstrated that *FHOD3* is a novel disease-causing gene in HCM. Pathogenic mutations would account for approximately 1% to 2% of HCM cases, a prevalence that is similar or greater to that described in other secondary sarcomeric protein genes. The associated phenotype and the rate of cardiovascular events are similar to that described for unselected cohorts of patients with HCM; thus, a clinical follow-up is recommended in affected carriers. The *FHOD3* gene should be routinely included in genetic testing panels for HCM.

ACKNOWLEDGMENTS The authors thank Pilar Molina (Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain), Petros Syrris (UCL Institute of Cardiovascular Science, London, United Kingdom), Carmen Benito-Lopez y Sara Franco-Freire (Hospital Regional Universitario “Carlos Haya”), Juan de D. García-Díaz (Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain), Cristina Gomez-Ramirez, (Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Vizcaya, Spain), Iria C. Duro (Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain), and Javier Limeres-Freire (Hospital Val d’Hebron, Barcelona, Spain), as well as Alicia Pallas Lozano and Radek Suchac for their help with English editing.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Dr. Juan Pablo Ochoa, Health in Code SL, As Xubias s/n, Edificio O Fortín, Hospital Marítimo de Oza (15006), A Coruña, Spain. E-mail: juanpablo.ochoa@healthincode.com. Twitter: @OchoaJP, @_healthincode.

PERSPECTIVES

COMPETENCY IN MEDICAL KNOWLEDGE: *FHOD3* accounts for approximately 1% to 2% of cases of HCM, and its prevalence is similar to or greater than that of mutations in established sarcomeric protein genes.

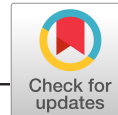
TRANSLATIONAL OUTLOOK: Collaborative studies of a larger number of patients are necessary to identify an association with other phenotypes and expose mechanisms underlying the development of HCM in carriers of *FHOD3* disease-causing variants.

REFERENCES

1. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. *Circ Res* 2017;121:749-70.
2. Schönichen A, Geyer M. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:152-63.
3. Taniguchi K, Takeya R, Suetsugu S, et al. Mammalian formin fhod3 regulates actin assembly and sarcomere organization in striated muscles. *J Biol Chem* 2009;284:29873-81.
4. Ushijima T, Fujimoto N, Matsuyama S, et al. The actin-organizing formin protein Fhod3 is required for postnatal development and functional maintenance of the adult heart in mice. *J Biol Chem* 2018;293:148-62.
5. Wooten EC, Hebl VB, Wolf MJ, et al. Formin homology 2 domain containing 3 variants associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;6:10-8.
6. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016;536:285-91.
7. Walsh R, Thomson KL, Ware JS, et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet Med* 2017;19:192-203.
8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24.
9. Egeland T, Pinto N, Vigeland MD. A general approach to power calculation for relationship testing. *Forensic Sci Int Genet* 2014;9:186-90.
10. Nyholt DR. All LODs are not created equal. *Am J Hum Genet* 2000;67:282-8.
11. Sabater-Molina M, Pérez-Sánchez I, Hernández del Rincón JP, Gimeno JR. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: a review of current state. *Clin Genet* 2018;93:3-14.
12. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, et al. 2014 ESC guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2014;35:2733-79.
13. Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, Van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovasc Res* 2015;105:397-408.
14. Arimura T, Takeya R, Ishikawa T, et al. Dilated cardiomyopathy-associated FHOD3 variant impairs the ability to induce activation of transcription factor serum response factor. *Circ J* 2013;77:2990-6.
15. Kan-O M, Takeya R, Abe T, et al. Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biol Open [Internet]* 2012;1:889-96.
16. Esslinger U, Garnier S, Korniat A, et al. Exome-wide association study reveals novel susceptibility genes to sporadic dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2017;12:e0172995.
17. Zhou Q, Wei S-S, Wang H, et al. Crucial role of ROCK2-mediated phosphorylation and upregulation of FHOD3 in the pathogenesis of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertens* 2017;69:1070-83.
18. Iskratsch T, Reijntjes S, Dwyer J, et al. Two distinct phosphorylation events govern the function of muscle FHOD3. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:893-908.
19. Schulte A, Stolp B, Schönichen A, et al. The human formin FHOD1 contains a bipartite structure of FH3 and GTPase-binding domains required for activation. *Structure* 2008;16:1313-23.
20. Nezami AG, Poy F, Eck MJ. Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. *Structure* 2006;14:257-63.
21. Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci* 2005;30:342-53.
22. Iskratsch T, Lange S, Dwyer J, Kho AL, Dos Remedios C, Ehler E. Formin follows function: a muscle-specific isoform of FHOD3 is regulated by CK2 phosphorylation and promotes myofibril maintenance. *J Cell Biol* 2010;191:1159-72.

KEY WORDS cardiomyopathies, *FHOD3*, formins, genetics, hypertrophic cardiomyopathy, sudden death

APPENDIX For a list of the recruiting hospitals of the GENESCOPIC research group and research centers (genetics, molecular biology, and data-analysis) of the GENESCOPIC research group as well as supplemental tables and figures, please see the online version of this paper.

**SHORT REPORT**

CLINICAL GENETICS WILEY

Deletions of specific exons of *FHOD3* detected by next-generation sequencing are associated with hypertrophic cardiomyopathy

Juan P. Ochoa^{1,2} | Luis R. Lopes^{3,4,5} | Marlene Perez-Barbeito² |
Laura Cazón-Varela² | Maria M. de la Torre-Carpente⁶ |
Natalia Sonicheva-Paterson² | David De Uña-Iglesias^{1,2} | Ellen Quinn⁴ |
Svetlana Kuzmina-Krutetskaya⁷ | José A. Garrote⁸ | Perry M. Elliott^{3,4,5} |
Lorenzo Monserrat²

¹Cardiovascular Research Group, Biomedical Research Institute (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, A Coruña University (UDC), A Coruña, Spain

²Scientific Department, Health in Code SL, A Coruña, Spain

³Institute of Cardiovascular Science, University College London, London, UK

⁴Barts Heart Centre, St. Bartholomew's Hospital, Barts Health NHS Trust, London, UK

⁵European Reference Network for Rare and Low Prevalence Complex Diseases of the Heart (ERN GUARD-HEART)

⁶Cardiology, Hospital Universitario Rio Hortega, Valladolid, Spain

⁷Cardiovascular Teaching Department, North-Western State Medical University Named After I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

⁸Molecular Genetics Laboratory, Service of Laboratory Medicine, Hospital Universitario Rio Hortega, Valladolid, Spain

Correspondence

Dr Juan P. Ochoa, Health in Code SL, As Xubias s/n, Edificio O Fortín, Hospital Marítimo de Oza (15006), A Coruña, Spain.
Email: juanpablo.ochoa@healthincode.com

Funding information

LRL is funded by a Medical Research Council (MRC)

Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/cge.13759>.

Abstract

Despite new strategies, such as evaluating deep intronic variants and new genes in whole-genome-sequencing studies, the diagnostic yield of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is still around 50%. *FHOD3* has emerged as a novel disease-causing gene for this phenotype, but the relevance and clinical implication of copy-number variations (CNVs) have not been determined. In this study, CNVs were evaluated using a comparative depth-of-coverage strategy by next-generation sequencing (NGS) in 5493 HCM probands and 2973 disease-controls. We detected three symmetrical deletions in *FHOD3* that involved exons 15 and 16 in three HCM families (no CNVs were detected in the control group). These exons are part of the diaphanous inhibitory domain of *FHOD3* protein, considered a cluster of mutations for HCM. The clinical characteristics of the affected carriers were consistent with those reported in *FHOD3* in previous studies. This study highlights the importance of performing CNV analysis systematically in NGS genetic testing panels for HCM, and reinforces the relevance of the *FHOD3* gene in the disease.

KEYWORDS

cardiomyopathies, cardiomyopathy, DNA copy-number variations, *FHOD3* protein, formins, human, hypertrophic, genetic testing, next-generation sequencing

1 | INTRODUCTION

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most frequent inherited genetic heart disease, affecting one in 250 to 500 individuals of the general population. Massive parallel sequencing has contributed to the understanding of the disease, allowing the sequencing of a large number of genes in a short time at a sustainable cost. However, the diagnostic yield of genetic studies in HCM is around 50%.¹ New strategies to increase the yield of genetic testing include the sequencing of deep intronic variants, screening for copy-number variations (CNVs) in disease-causing genes, and sequencing of a broader range of candidate genes. In any case, a high proportion of these currently genotype-negative patients might have a non-Mendelian form of the disease as it is suggested by the lower family history and a more benign disease course in such cases.

Mutations in the Formin Homology 2 Domain Containing 3 gene (*FHOD3*) have been recently identified as a possible cause for HCM.² Formins are proteins that are present in almost all cells and tissues due to their role in the polymerization of actin. *FHOD3*—the protein encoded by *FHOD3* gene—is expressed almost exclusively in the heart muscle, participating in the development and maintenance of the thin filament of the sarcomere.³ Most disease-causing variants reported to date are non-truncating (nonsynonymous variants and small in-frame deletions). More recently, some variants affecting splicing were identified cosegregating with the phenotype in a few families.⁴ However, the relevance and clinical implication of CNVs in this gene have not been evaluated.

2 | METHODS

2.1 | Patients

From February 2014, *FHOD3* was evaluated by next-generation sequencing (NGS) in 15 225 consecutive unrelated probands referred to our center for genetic diagnosis. Samples were received mainly from centers in Spain, the United Kingdom, Denmark, the United States, Germany, and Argentina. The clinical phenotypes were established by each center prior to the genetic studies. A total of 6539 probands had a diagnosis or clinical suspicion of HCM. An additional 3688 index cases with no evidence of structural cardiac disease (mainly channelopathies and aortic diseases) were used as an internal control population. The predominant ethnicity was European (more than 90% of the probands). Variant frequencies in the general population were extracted from the gnomAD database version r2.0 (<http://gnomad.broadinstitute.org>). The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of A Coruña-Ferrol (registry code 2015/576).

2.2 | DNA sequencing and CNV analysis

Coding exons and intronic boundaries of 213 genes related to inherited cardiovascular diseases and sudden cardiac death (SCD) were captured using a custom probe library (SureSelect Target

Enrichment Kit for Illumina paired-end multiplexed sequencing method) and sequenced using the HiSeq 1500 platform (Illumina, San Diego, California) following Illumina protocols. The complete list of genes is included in Table S1. The read depth (number of times that a base was sequenced by independent reads) for every nucleotide of genes of interest (including *FHOD3*) was greater than 30× (mean 250–400×). Exons that did not fulfill this standard were complementarily sequenced using the Sanger method. Sequence data analysis was performed using a proprietary bioinformatics pipeline that includes sample demultiplexing as well as all the steps necessary to obtain a report of annotated variants together with their coverage and corresponding quality parameters. CNVs were analyzed using a comparative depth-of-coverage strategy⁵ and were confirmed by an alternative method, including NGS strategies (amplicon sequencing analysis) and conventional methods (polymerase chain reaction [PCR] amplification and Sanger sequencing with specifically designed primers; Table S2). For Sanger sequencing, after cleanup, the amplified fragments were sequenced with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Chromatograms were analyzed using Chromas Lite and the UCSC (University of California, Santa Cruz) Genome Browser tool. The identified variants were reported according to the HGVS (Human Genome Variant Society) nomenclature. The pathogenicity of identified variants was established according to the recommendations of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).

3 | RESULTS

From the 15 225 consecutive probands, CNVs were analyzed in 12 781 (84%). The other 2444 samples were not suitable for CNV analysis because they did not pass the minimal bioinformatics quality filtering; most of these samples were derived from paraffin-embedded tissue blocks or saliva samples in which the quality of the DNA was not optimal.

CNVs were detected in *FHOD3* in three patients with a diagnosis of HCM (three out of 5493 HCM probands in which CNVs were suitable for analysis; 0.05%) and none of the 2973 controls. They consisted of *FHOD3* deletions (at chromosome band 18q12.2) including one or two exons and part of flanking intronic sequences (Table S3). The affected exons 15 and 16 comprise residues p.Arg612-Phe657 and p.Ser657-Arg674, respectively. Since these deletions involve symmetric exons, the loss of genetic material would result in inframe variants that do not change the reading frame of the protein. None of the probands carried additional genetic variants that could explain the phenotype. All the deletions were confirmed and the preliminary breakpoints determined using additional NGS strategies (amplicon sequencing analysis); the precise breakpoints of these large deletions were defined at base-pair resolution by PCR amplification and Sanger sequencing as well (Figure 1). No deletions involving exclusively exon 15 or 16 are reported in subjects considered controls from the gnomAD database.

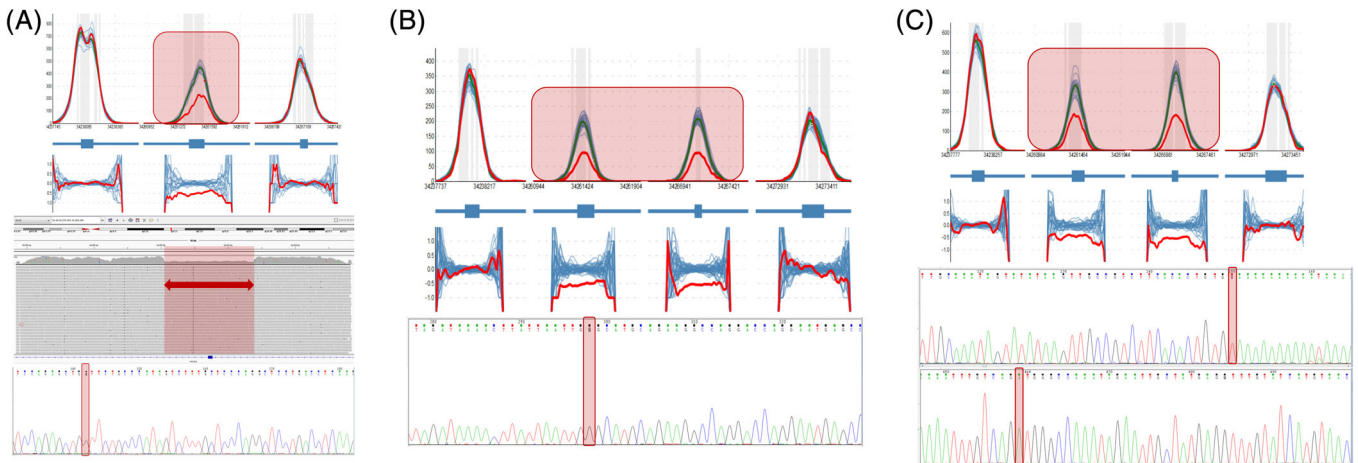


FIGURE 1 The three deletions detected in this study. In the top of the panels, a graph showing a comparative depth-of-coverage is shown: x-axis corresponds to the determined genomic region and the y-axis the depth-coverage (number of readings). The red line represents patient coverage, which is compared to the green line, representing the median coverage of control samples sequenced in the same run. In red it can be observed a 50% decrease in the coverage of the fragments corresponding to the affected exons, indicating the heterozygous deletion in the explored regions. In the bottom, Sanger sequencing confirmation of the deletions with their precise breakpoints is shown using the Chromas lite program. Panel A also shows the deletion confirmed by amplicon-based NGS using the Integrative Genomics Viewer (IGV) graphic [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.1 | Detailed description of the families and characteristics of the deletions

FAMILY A (Figure 2A): The proband was a 51-year-old Spanish male with hypertension and paroxysmal atrial fibrillation who has been diagnosed with HCM at age 36, with no family history of HCM or SCD. His last echocardiogram showed asymmetrical septal hypertrophy (maximum left ventricular wall thickness [MLVWT] 21 mm), moderate dilatation of the left atrium (50 mm in the parasternal long-axis plane), and no left ventricular (LV) outflow tract obstruction. His ejection fraction (EF) was normal (71%). His 26-year-old son, a carrier of the *FHOD3* deletion, and his 20-year-old daughter, a noncarrier, were evaluated and considered as clinically unaffected with normal echocardiogram and ECG.

The identified CNV in the patient consisted of a 2678-bp deletion encompassing the nucleotide sequence from c.1836-1312 of intron 14 to c.1970 + 1231 of intron 15 of the *FHOD3* gene, with a 27-bp insertion at the junction (Figure 1A). The proximal breakpoint was localized adjacent to a 1374 bp LINE termed L1ME3C, and the distal breakpoint was embedded in a 304 bp SINE termed AluSz (Figure S1). On manual alignment, the inserted 27-bp fragment was identical to the reference sequence at chr18:g.34268898-34 268 924 position, which lies 6134 bp downstream from the insertion breakpoint. Non-homologous DNA end-joining (NHEJ), the predominant DNA repair mechanism in mammals, does not require any microhomology between the two DNA ends. Since we did not find extensive microhomology at the junctions, we proposed NHEJ as responsible in this case.

FAMILY B (Figure 2B): The proband was a 61-year-old male from the United Kingdom with a family history of HCM who had been diagnosed with the disease at age 51 years. He showed an apical

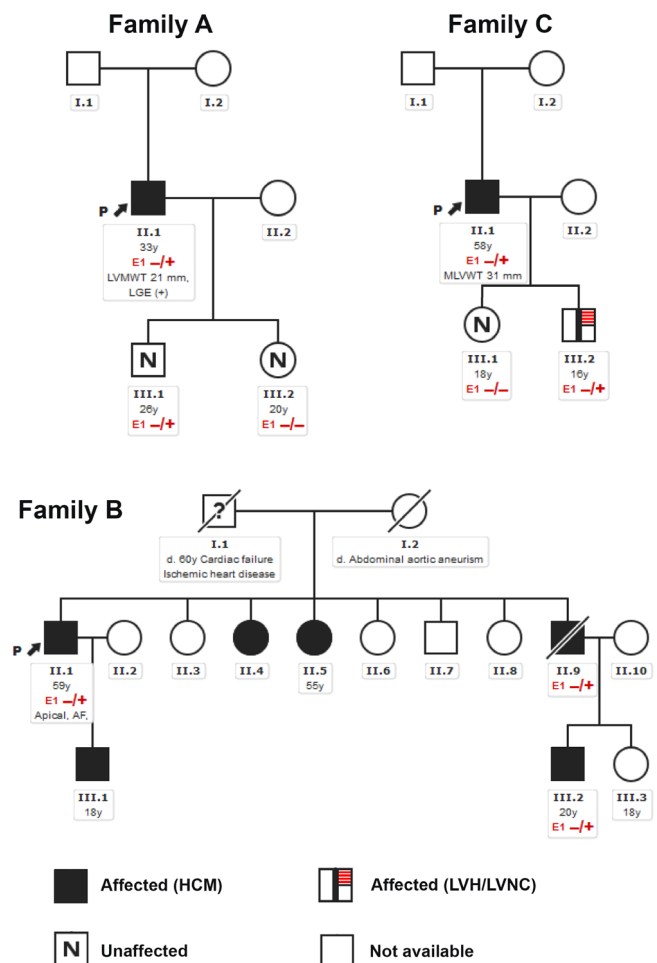


FIGURE 2 Pedigrees of the three hypertrophic cardiomyopathy families carrying copy-number variations in *FHOD3* identified in the present study [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

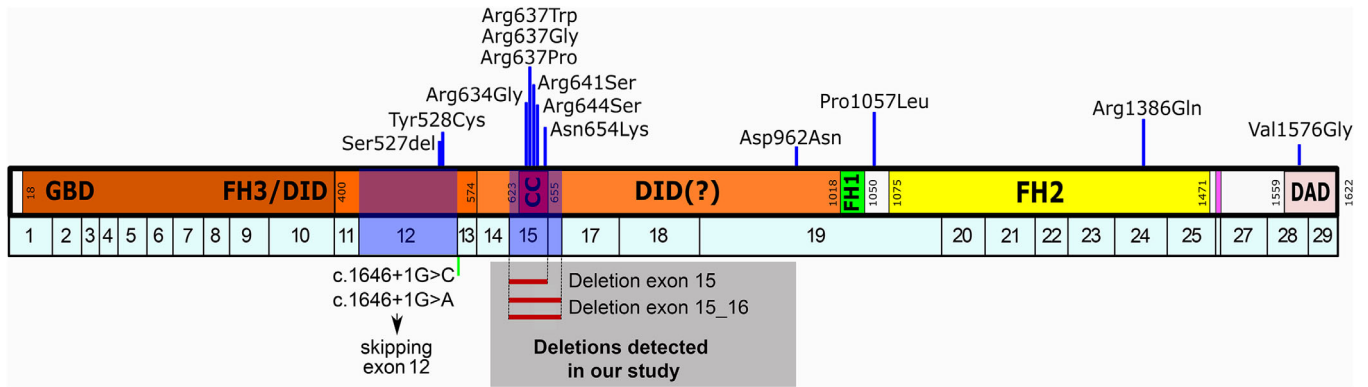


FIGURE 3 Diagram of the FHOD3 protein, its relevant domains, and their concordance with the exonic regions of the gene. In blue, all the nontruncating disease-causing variants reported to date in the literature. In the bottom of the figure, it can be observed the location of the deletions described in this paper, and the splicing variants described by Semsarian and colleagues [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

distribution of LV hypertrophy (MLVWT 13 mm) with repolarization abnormalities on his ECG. An implantable cardio-defibrillator was implanted at age 53 years for primary prevention (his major risk factors were nonsustained ventricular tachycardia on Holter monitoring and a family history of SCD). His 18-year-old son was also clinically affected, but he did not consent to genetic testing. Two of the proband's sisters and one brother had a diagnosis of HCM; the brother had died suddenly in his mid-40s and was found to have HCM at autopsy. He was an obligate carrier because his affected son was genotyped and harbored the same deletion as the family proband.

An 11 kb (11259-bp) deletion encompassing the nucleotide sequence from c.1836-1527 of intron 14 to c.2022-2042 of intron 16 of *FHOD3* was identified (Figure 1B). The proximal breakpoint is embedded in a 1374-bp LINE termed L1ME3C, and the distal junction-flanking sequence contains no interspersed repetitive elements within >1Kb surrounding the breakpoint. No homology or inserted sequence was observed at the breakpoint junction, suggesting again an NHEJ mechanism.

FAMILY C (Figure 2C): The proband of this Russian family was a 58-year-old male, diagnosed in his late 30s with an asymmetrical non-obstructive septal hypertrophy (MLVWT 31 mm). His son was considered to be probably affected as, at age 16, he had an MLVWT of 12 mm and hypertrabeculation of the LV apex, lateral wall, and septum. Both father and son harbored the same deletion; one clinically unaffected daughter was a noncarrier.

A deletion of 11 kb (10503-bp) encompassing the nucleotide sequence from c.1836-2543 of intron 14 to c.2021 + 2217 of intron 16 of *FHOD3* was identified (Figure 1C). The proximal breakpoint is embedded in a 1374 bp LINE termed L1ME3C; the distal junction-flanking sequence contains no interspersed repetitive elements within >1Kb surrounding the breakpoint and also had a 105-bp insertion at the junction derived from an L1MEf L1 family LINE within the human genome. L1MEf retrotransposition was unlikely. The complexity of the CNV also precluded an NHEJ, making a replication-based mechanism the most plausible explanation for disease expression. To overcome the replication fork error, the replication machinery would have

restarted DNA synthesis via a different replication fork located in L1ME3C before switching back to the original replication fork resulting in the deletion of two exons (from 15 to 16) and partial insertion of L1MEf. We observed regions of microhomology at the junctions, which allows this switching to occur.

4 | DISCUSSION

FHOD3 is a new HCM associated gene that may explain around 2% of cases. In this article, we report the first three families with CNVs in *FHOD3* associated with an HCM phenotype, and propose new disease mechanisms for the observed genetic variants.

The three deletions described affected symmetrical exons, predicting the loss of 45 and 62 AMino acids of a relevant domain of the gene (Figure 3). One of the limitations of our study is that RNA sequencing of these splice-variants was not performed to confirm this mechanism at the transcript level. In any case, since they involve symmetric exons 15 and 16 with no change in the reading frame of the protein sequence, they should not be considered loss-of-function variants per se.

The clinical characteristics of the families described in our study are consistent with those reported in the largest study of *FHOD3*, in which pathogenic variants were nonsynonymous or small in-frame deletions (loss of one single amino acid). On the other hand, the pathogenicity of loss-of-function variants in *FHOD3* is still unclear. They are reported with low frequencies in public databases of controls such as gnomAD but are constrained with an observed/expected ratio of 0.25. Truncating nonsense and frameshift variants were not enriched in cohorts of cardiomyopathy patients¹ and we were unable to prove cosegregation with the disease in our previous study.² More information is needed to determine the clinical significance of these variants.

Only a few studies in the literature have systematically evaluated CNVs in HCM genetic studies. A few deletions in sarcomeric genes (*MYBPC3*, *TNNC1*, *ACTC1*, *MYL2*, and *MYL3*) that might explain the phenotype have been reported.^{6,7} We have no evidence of similar

deletions described before in *FHOD3*. A few CNVs are reported in DECIPHER and ClinVar, but deletions were much larger involving the whole *FHOD3* gene and other adjacent genes and were related to more complex phenotypes.

In our cases, the three deletions affect a part of the diaphanous inhibitory domain—DID—of *FHOD3* and more specifically the coil-coiled domain involving amino acids 623 to 655. This supercoiled alpha helix is considered a clustering site of mutations associated with HCM. An attractive hypothesis is that the loss of the residues encompassed in our deletions could lead to a predominance of *FHOD3* protein in an activated state, as it was described for mutations in the paralogue *FHOD1*.⁸ A similar mechanism could occur with the splicing variants previously described by Semsarian et al,⁴ both affecting the same essential splice donor nucleotide of exon 12 and predicting the skipping of this symmetrical exon. They would lead to an in-frame loss of 120 amino acids, from p.Ser429 to p.Ser549, also considered part of the DID domain of *FHOD3* and where the pathogenic variants p.Ser527del and p.Tyr528Cys were reported (Figure 3). These two variants together represent 0.5% of HCM cases in our cohort (19 and 15 probands respectively, from 6788 consecutive HCM patients sequenced by NGS with panels that included the gene), reinforcing the relevance of this exon.

Using current ACMG criteria, splice-site variants that predict the skipping of exon 12 and 15 to 16, or deletions involving exclusively these exons should be considered likely pathogenic. We cannot extrapolate this information to larger deletions, or deletions of other exons, especially when they predict a change in the reading frame: these variants should be considered of uncertain significance and more information obtained (ie, evidence of segregation in families or functional studies) for correct categorization.

In conclusion, our study highlights the importance of performing CNV analysis systematically in NGS genetic testing panels for HCM, and reinforces the relevance of the *FHOD3* gene in the disease.

CONFLICT OF INTEREST

J.P.O., M.P.-B., N.S.-P., and L.C.-V. are employees of Health in Code SL. L.M. is a stakeholder and CEO of Health in Code SL. All of the remaining authors have no conflicts of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author, JPO. The data are not publicly

available due to information that could compromise the privacy of research participants.

ORCID

Juan P. Ochoa  <https://orcid.org/0000-0002-7966-0313>

REFERENCES

- Walsh R, Mazarrotto F, Whiffin N, et al. Quantitative approaches to variant classification increase the yield and precision of genetic testing in Mendelian diseases: the case of hypertrophic cardiomyopathy. *Genome Med.* 2019;11(1):5. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0616-z>.
- Ochoa JP, Sabater-Molina M, Garcia-Pinilla JM, et al. Formin homology 2 domain containing 3 (*FHOD3*) is a genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(20):2457-2467. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.10.001>.
- Ushijima T, Fujimoto N, Matsuyama S, et al. The actin-organizing formin protein *Fhod3* is required for postnatal development and functional maintenance of the adult heart in mice. *J Biol Chem.* 2018;293(1):148-162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813931>.
- Semsarian C, Ingles J, Bagnall RD. Revisiting genome sequencing data in light of novel disease gene associations. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(11):1365-1366. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.060>.
- de Uña D. *System and Method to Detect Structural Genetic Variants*. Madrid, Spain: OEPM (Oficina Española de Patentes y Marcas); 2019.
- Mademont-Soler I, Mates J, Yotti R, et al. Additional value of screening for minor genes and copy number variants in hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One.* 2017;12(8):e0181465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181465>.
- Lopes LR, Murphy C, Syrris P, et al. Use of high-throughput targeted exome-sequencing to screen for copy number variation in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Med Genet.* 2015;58(11):611-616. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.10.001>.
- Schulte A, Stolp B, Schönichen A, et al. The human formin *FHOD1* contains a bipartite structure of FH3 and GTPase-binding domains required for activation. *Structure.* 2008;16(9):1313-1323. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.06.008>.

SUPPORTING INFORMATION

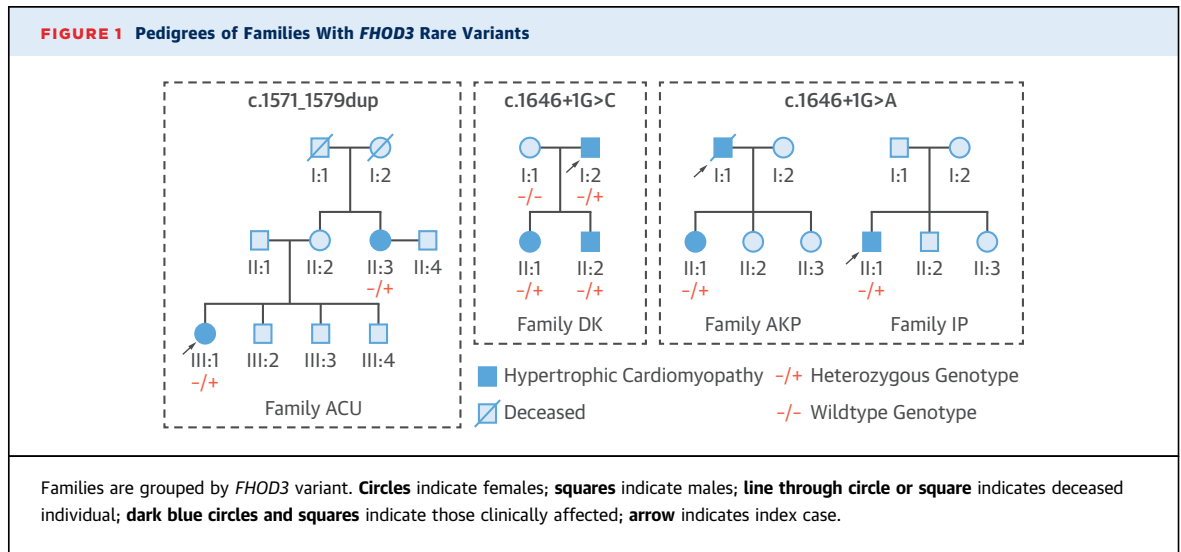
Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Ochoa JP, Lopes LR, Perez-Barbeito M, et al. Deletions of specific exons of *FHOD3* detected by next-generation sequencing are associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet.* 2020;98:86-90. <https://doi.org/10.1111/cge.13759>

Revisiting Genome Sequencing Data in Light of Novel Disease Gene Associations



Ochoa et al. (1) recently demonstrated a significantly higher frequency of rare protein-altering variants in the formin homology domain containing 3 gene



(*FHOD3*) in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) probands than in disease control subjects. The 2 most commonly identified variants, found in 18 probands, affect consecutive amino acids, Ser527del and Tyr528Cys, and cosegregate with HCM in multiple families.

In a recent issue of the *Journal*, we reported our experience with using genome sequencing to improve outcomes of genetic testing in patients with HCM (2). One benefit of having genome sequencing data available is to quickly assess new genes as they are reported, and here, we demonstrate this for *FHOD3*. We found a 9-nucleotide insertion (c.1571_1579dup), adding 3 amino acids after Phe526 in a proband and affected member of 1 family (Figure 1). We also found 2 different variants affecting the same essential splice donor nucleotide of exon 12: c.1646+1G>C segregated in 3 affected members of 1 family, and c.1646+1G>A was found in 2 unrelated probands (Figure 1). Both splice site variants predict skipping of exon 12, leading to an in-frame deletion of 120 amino acids after Ser429. Exon 12 is specific to the main *FHOD3* isoform found in the adult ventricular myocardium and is required for targeting the *FHOD3* protein to the myofibrils in cardiomyocytes.

The *FHOD3* variants in our cohort lead to an in-frame insertion or deletion in a nonrepetitive region, are reported in ≤ 1 individual of the gnomAD database of population controls, and cosegregate with disease, or are found in at least 2 unrelated individuals with the same phenotype; hence, they are likely pathogenic according to the classification criteria of Ochoa et al. (1). Revisiting our genome sequencing data for *FHOD3* variants has thus

increased the diagnostic yield from 20% to 28%. Collectively, we demonstrate how genome sequencing data provides an archive of variants to be reassessed as new disease genes are reported.

Christopher Semsarian, MBBS, PhD, MPH

Jodie Ingles, MPH, PhD

*Richard D. Bagnall, PhD

*Agnes Ginges Centre for Molecular Cardiology

Centenary Institute

Locked Bag 6

Newtown, NSW 2042

Australia

E-mail: r.bagnall@centenary.org.au

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.060>

© 2019 by the American College of Cardiology Foundation. Published by Elsevier.

Please note: Dr. Semsarian is the recipient of a National Health and Medical Research Council (NHMRC) Practitioner Fellowship (#1059156). Dr. Ingles is a recipient of a Heart Foundation of Australia Future Leader Fellowship (#100833). Dr. Bagnall reported that he has no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

REFERENCES

- Ochoa JP, Sabater-Molina M, Garcia-Pinilla JM, et al. Formin homology 2 domain containing 3 (*FHOD3*) is a genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2457-67.
- Bagnall RD, Ingles J, Dinger ME, et al. Whole genome sequencing improves outcomes of genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:419-29.

REPLY: Revisiting Genome Sequencing Data in Light of Novel Disease Gene Associations



We thank Dr. Semsarian and colleagues for their interest in our paper (1), in which we demonstrated, not only that rare protein-altering variants in the formin homology domain containing 3 gene (*FHOD3*) have a higher frequency in HCM probands than

in control subjects, but also that several of these variants segregated with the phenotype in families. These disease-causing variants represented around 1% to 2% of the hypertrophic cardiomyopathy (HCM) cases. After our original research was published, Dr. Semsarian and colleagues analyzed their own genome sequencing data from a HCM cohort (2) and identified 3 novel variants in *FHOD3* that were likely to explain the phenotype in patients whose original study was negative.

The first variant, c.1571_1579dup, is an insertion of 3 new amino acids after p.Phe526 (p.Phe526_Ser527insTyrLeuPhe). As clearly stated in the letter, the insertion affects positions where we detected the pathogenic variants p.Ser527del and p.Tyr528Cys, which together represent 0.5% of HCM cases in our cohort (15 and 13 index cases with HCM, respectively, among 5,183 probands with this phenotype in whom the gene was analyzed by next-generation sequencing). None of these variants has been identified in patients with phenotypes other than HCM, and cosegregation was consistently observed.

The other 2 variants described by Dr. Semsarian and colleagues, c.1446+1G>C and c.1646+1G>A, affect a consensus splice site. In our original paper (1), we were unable to determine the pathogenicity of loss-of-function variants (it is not clear whether haploinsufficiency is a disease mechanism in *FHOD3*); nevertheless, these 2 variants would lead to skipping of exon 12, resulting in a loss of 120 residues (from p.Ser429 to p.Ser549). Using copy number variation analysis, we have recently detected a deletion of exons 15-16 in 3 unrelated HCM probands with no additional genetic variants that could explain the disease. This in-frame deletion of 52 amino acids (from p.Arg612 to p.Arg674) includes the coiled-coil region, in which we identified one-half of the disease-causing variants in *FHOD3*. These findings support the hypothesis that loss of relevant regions of *FHOD3* protein is also associated with disease, although functional studies are needed to elucidate the final mechanism (i.e., whether aberrant mRNA is eliminated via nonsense-mediated mRNA decay, or whether a shorter protein is produced).

In conclusion, we agree with Dr. Semsarian and colleagues that these new variants are likely to be the cause of the disease in the described families. These findings also support the relevance of exon 12 of *FHOD3*, which is only present in the longest transcript of the gene (it should be considered the main isoform). Most important is the increased diagnostic yield obtained by adding *FHOD3* to the genetic

evaluation of HCM, supporting our contention that *FHOD3* should be included in diagnostic panels.

*Juan Pablo Ochoa, MD
Perry M. Elliott, MD
Juan R. Gimeno, MD, PhD
Lorenzo Monserrat, MD, PhD

*Health in Code SL
As Xubias s/n
Edificio O Fortín
Hospital Marítimo de Oza (15006)
A Coruña
Spain

E-mail: juanpablo.ochoa@healthincode.com

Twitter: @OchoaJP

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.022>

© 2019 by the American College of Cardiology Foundation. Published by Elsevier.

Please note: This work was supported by grants from the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centre (Dr. Elliott); St. Bartholomew's Hospital (Dr. Elliott) and Hospital Virgen de la Arrixaca (Dr. Gimeno-Blanes) are members of the European Reference Network on Rare and Complex Diseases of the Heart. Dr. Ochoa is an employee of Health in Code SL. Dr. Monserrat is a stakeholder and chief executive officer of Health in Code SL. All other authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

REFERENCES

1. Ochoa JP, Sabater-Molina M, Garcia-Pinilla JM, et al. Formin homology 2 domain containing 3 (*FHOD3*) is a genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:2457-67.
2. Bagnall RD, Ingles J, Dinger ME, et al. Whole genome sequencing improves outcomes of genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:419-29.

APÉNDICE B: OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS EN
COLABORACIÓN DURANTE ESTA TESIS

- Lorenzini M, Norrish G, Field E, **Ochoa JP**, Cicerchia M, Akhtar MM, Syrris P, Lopes LR, Kaski JP, Elliott PM. Penetrance of Hypertrophic Cardiomyopathy in Sarcomere Protein Mutation Carriers. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(5):550-559. doi:10.1016/j.jacc.2020.06.011
- Lopez-Sainz A, Dominguez F, Lopes LR, **Ochoa JP**, Barriales-Villa R, Climent V, Linschoten M, Tiron C, Chiriatti C, Marques N, Rasmussen TB, Espinosa MÁ, Beinart R, Quarta G, Cesar S, Field E, Garcia-Pinilla JM, Bilinska Z, Muir AR, Roberts AM, Santas E, Zorio E, Peña-Peña ML, Navarro M, Fernandez A, Palomino-Doza J, Azevedo O, Lorenzini M, García-Álvarez MI, Bento D, Jensen MK, Méndez I, Pezzoli L, Sarquella-Brugada G, Campuzano O, Gonzalez-Lopez E, Mogensen J, Kaski JP, Arad M, Brugada R, Asselbergs FW, Monserrat L, Olivotto I, Elliott PM, Garcia-Pavia P. Clinical Features and Natural History of PRKAG2 Variant Cardiac Glycogenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(2):186-197. doi:10.1016/j.jacc.2020.05.029
- Barriales-Villa R, **Ochoa JP**, Larrañaga-Moreira JM, et al. Risk predictors in a Spanish cohort with cardiac laminopathies. The REDLAMINA registry [published online ahead of print, 2020 Jun 29]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2020; S1885-5857(20)30257-7. doi:10.1016/j.rec.2020.03.026
- Salazar-Mendiguchía J, **Ochoa JP**, Palomino-Doza J, et al. Mutations in TRIM63 cause an autosomal-recessive form of hypertrophic cardiomyopathy [published online ahead of print, 2020 May 25]. *Heart*. 2020;heartjnl-2020-316913. doi:10.1136/heartjnl-2020-316913
- Lopes LR, Barbosa P, Torrado M, Quinn E, Merino A, **Ochoa JP**, Jager J, Futema M, Carmo-Fonseca M, Monserrat L, Syrris P, Elliott PM. Cryptic Splice-Altering Variants in MYBPC3 Are a Prevalent Cause of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Genom Precis Med*. 2020;13(3):e002905. doi:10.1161/CIRCGEN.120.002905
- Peña-Peña ML, **Ochoa JP**, Barriales-Villa R, et al. Prognostic implications of pathogenic truncating variants in the TTN gene [published online ahead of print, 2020 May 1]. *Int J Cardiol*. 2020;S0167-5273(20)31896-9. doi:10.1016/j.ijcard.2020.04.086
- Barriales-Villa R, Larrañaga-Moreira JM, **Ochoa JP**. Letter by Barriales-Villa et al Regarding Article, "Development and Validation of a New Risk Prediction Score for Life-Threatening Ventricular Tachyarrhythmias in Laminopathies". *Circulation*. 2019;140(23):e818-e819. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043823
- Domínguez F, Cuenca S, Bilińska Z, Toro R, Villard E, Barriales-Villa R, **JP Ochoa**, et al. Dilated Cardiomyopathy Due to BLC2-Associated Athanogene 3 (BAG3) Mutations. *J Am Coll Cardiol [Internet]*. 2018 Nov 13;72(20):2471-81.

- Norrish G, Jager J, Field E, Quinn E, Fell H, Lord E, **Ochoa JP**, et al. Yield of Clinical Screening for Hypertrophic Cardiomyopathy in Child First-Degree Relatives: Evidence for a Change in Paradigm. *Circulation* [Internet]. 2019 Apr 22. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038846
- Ortiz-Genga MF, **Ochoa JP**, Monserrat L. Aportes de la genética al estudio y manejo clínico de las miocardiopatías. *Rev Uruguaya Cardiol*. 2018;33(3):374–89. doi: 10.29277/cardio.33.3.21
- Méndez C, Soler R, Rodríguez E, Barriales R, **Ochoa JP**, Monserrat L. Differential diagnosis of thickened myocardium: an illustrative MRI review. *Insights Imaging* [Internet]. 2018 Oct 9 [cited 2018 Oct 25]. doi: 10.1007/s13244-018-0655-9.
- Soler R, Méndez C, Rodríguez E, Barriales R, **Ochoa JP**, Monserrat L. Phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy. An illustrative review of MRI findings. *Insights Imaging* [Internet]. 2018 Oct 22 [cited 2018 Oct 25] doi:10.1007/s13244-018-0656-8.
- Trujillo-Quintero JP, Palomino-Doza J, Cárdenas-Reyes I, **Ochoa JP**, Monserrat L. Abordaje de las cardiopatías familiares desde la Medicina genómica. *Rev Colomb Cardiol* [Internet]. 2018 Jun 20 [cited 2018 Aug 16];25(4):264–76. doi:10.1016/J.RCCAR.2018.01.004.
- Barriales-Villa R, **Ochoa JP**, Santomé-Collazo JL, Mosquera-Reboredo J, Cao-Vilariño M, Monserrat L. First Reported Case of Fabry Disease Caused by a Somatic Mosaicism in the GLA Gene. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* [Internet]. 2018 Jul 17 [cited 2018 Oct 25] (ISSN: 1885-5857). doi: 10.1016/j.rec.2018.06.013.
- Trujillo-Quintero JP, Gutiérrez-Agulló M, **Ochoa JP**, Martínez-Martínez JG, de Uña D, García-Fernández A. Familial Brugada Syndrome Associated With a Complete Deletion of the SCN5A and SCN10A Genes. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* [Internet]. 2018 Apr 9 [cited 2018 Oct 25] doi: 10.1016/j.rec.2017.12.021.
- Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M, Zorio E, Salgado-Aranda R, Climent V, **Ochoa JP**, et al. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Dec 6 [cited 2018 Oct 25]; 68(22):2440–51. doi:10.1016/j.jacc.2016.09.927.
- Fava AM, **Ochoa JP**, Ganum G, Nunzio HJDI, Quiroga A, Guevara E. Rol del eco estrés en el pronóstico de la miocardiopatía hipertrófica. *Rev Argent Cardiol* [Internet]. 2015;(83):529–35. doi:10.7775/rac.es.v83.i6.6102.
- Fernández A, Quiroga A, **Ochoa JP**, Mysuta M, Casabé JH, Biagetti M, et al. Validation of the 2014 European Society of Cardiology Sudden Cardiac Death Risk Prediction Model in Hypertrophic Cardiomyopathy in a Reference Center in South America. *Am J Cardiol*. 2016 Jul 1; 118(1):121–6. doi:10.1016/j.amjcard.2016.04.021

APÉNDICE C: CENTROS Y COLABORADORES QUE PARTICIPARON DE LOS ESTUDIOS

1. **Health in Code S.L.** A Coruña, Spain: L Monserrat, JPO, M Ortiz-Genga, IJ Cárdenas-Reyes, JZM, MN Cicerchia, JP Trujillo, X Fernandez-Fernandez, JP Trujillo, J Barraza-García, A Lamounier Jr., GV Alvarez, JL Santomé-Collazo, I Gomez-Díaz, N Sonicheva
2. **Universidade da Coruña, GRINCAR (Cardiovascular Research Group)**, A Coruña, Spain: JP Ochoa, E Santiago-Beloso, D de Uña Iglesias, R Noya Estévez, P Reboló Bardanca, M Pérez Barbeito, MM Neira Platas, MOG, LM, RBV, DGG, ALJ, MLPP
3. **Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)**, A Coruña, Spain: L Cazón-Varela, I Albariño-Ermida, RBV, M Torrado Oubiña
4. **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca**, Murcia, Spain: JR Gimeno, M Sabater-Molina, I Pérez-Cuesta
5. **Hospital Universitario Virgen de la Victoria**, Málaga, Spain: JM García-Pinilla, L Morcillo-Hidalgo, MA López-Garrido, A Robles-Mezcua
6. **Odense Universitetshospital**, Odense, Denmark: J Mogensen
7. **Complejo Hospitalario Universitario A Coruña**, Spain: R Barriales-Villa, J Rodríguez-Garrido, JM Larrañaga-Moreir
8. **Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda**, Madrid, Spain: P García-Pavía, A Restrepo-Córdoba
9. **Hospital Universitario 12 de Octubre**, Madrid, Spain: J Palomino-Doza
10. **Hospital Universitario de Salamanca**, Salamanca, Spain: E Villacorta, MIG
11. **Hospital General Universitario de Elche**, Elche, Spain: M Martínez-Moreno
12. **Hospital Universitario Virgen de Valme**, Sevilla, Spain: D García-Medina, J Ramos-Maqueda
13. **Hospital Universitario La Fe**, Valencia, Spain: E Zorio, P Molina
14. **Hospital Universitario Virgen del Rocío**, Sevilla, Spain: ML Peña-Peña
15. **Hospital Clínico Universitario de Valladolid**, Valladolid, Spain: IC Duro, PE García-Granja, M Sandín-Fuentes
16. **Hospital Vall d'Hebron, Barcelona**, Spain: JF Rodríguez-Palomares, J Limeres Freire, M Borregan Prats, A Evangelista Masip
17. **Hospital Universitario Rio Hortega**, Valladolid, Spain: JA Garrote, MM de la Torre-Carpente

18. **Hospital Universitario San Cecilio**, Granada, Spain: A Bautista-Pavés
19. **Saint Bartholomew's Hospital**, London, United Kingdom: PM Elliott, LR Lopes, MM Akhtar
20. **Complejo Hospitalario Universitario de Vigo**, Vigo, Spain: A Repáraz-Andrade, R Bilbao-Quesada
21. **Hospital San Pedro de Alcántara**, Cáceres, Spain: MV Mogollon-Gimenez, C Ortiz-Cortez.
22. **Hospital Universitario Príncipe de Asturias**, Alcalá de Henares, Spain: JD García-Díaz, JM Mesa-Latorre
23. **Hospital Sierrallana**, Torrelavega, Spain: B Arnaez.
24. **Hospital Universitario Marqués de Valdecilla**, Santander, Spain: I Olavarri-Miguel, Luis Ruiz-Guerrero, A Fontalba-Romero.
25. **Hospital Universitario Infanta Cristina**, Badajoz, Spain: ME Fuentes-Cañamero
26. **Hospital Regional Universitario "Carlos Haya"**, Málaga, Spain: C Benito-López, S Franco-Freire, JM Pérez Ruíz
27. **Hospital General Universitario de Alicante**, Alicante, Spain: V Climent-Payá
28. **Hospital Universitario Puerta del Mar**, Cádiz, Spain: R Marín-Iglesias
29. **Complejo Hospitalario Arquitecto Marcide**, El Ferrol, Spain: A Rodríguez-Vilela
30. **Hospital Provincial Castellon**, Castellon, Spain: A Cortel-Fuster
31. **Hospital Son Llatzer**, Palma de Mallorca, Spain: T Ripoll-Vera
32. **Hospital Universitario Cruces**, Barakaldo, Spain: I Llano-Rivas, C Gómez-Ramírez, JR Arriandiaga Bilbao, MA López-Arístegui
33. **Universitat Autònoma de Barcelona**, Departament de Genètica i de Microbiologia. Barcelona, Spain: J Salazar-Mendiguchía
34. **Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL-FIDABIO Foundation)**. Alicante, Spain: V Climent-Payá
35. **University College London Institute for Cardiovascular Science**. London, United Kingdom: P Syrris, LRL, PME
36. **Universidad de Salamanca**, Department of Medicine, Salamanca, Spain: M Isidoro-García.

APÉNDICE D: NOMENCLATURA DE LOS GENES INCLUIDOS EN LA LIBRERÍA

Gen	Descripción
<i>AARS2</i>	Alanine--tRNA ligase, mitochondrial
<i>ABCC9</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
<i>ACAD9</i>	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial
<i>ACADM</i>	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
<i>ACADVL</i>	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
<i>ACTA1</i>	Actin, alfa 1, skeletal muscle
<i>ACTA2</i>	Actin, aortic smooth muscle
<i>ACTC1</i>	Actin, alpha cardiac muscle 1
<i>ACTN2</i>	Alpha-actinin-2
<i>ACVRL1</i>	Serine/threonine-protein kinase receptor R3
<i>ADAMTSL4</i>	ADAMTS-like protein 4
<i>AGK</i>	Acylglycerol kinase, mitochondrial
<i>AGL</i>	Glycogen debranching enzyme
<i>AGPAT2</i>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta
<i>AKAP9</i>	A-kinase anchor protein 9
<i>ALMS1</i>	Alstrom syndrome protein 1
<i>ANK2</i>	Ankyrin 2
<i>ANK3</i>	Ankyrin-3
<i>ANKRD1</i>	Ankyrin repeat domain-containing protein 1
<i>APOA5</i>	Apolipoprotein A-V
<i>APOB</i>	Apolipoprotein B-100
<i>APOC3</i>	Apolipoprotein C-III
<i>ATPAF2</i>	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2
<i>BAG3</i>	BAG family molecular chaperone regulator 3
<i>BMPR1B</i>	Bone morphogenetic protein receptor type-1B
<i>BMPR2</i>	Bone morphogenetic protein receptor type II
<i>BRAF</i>	Serine/threonine-protein kinase B-raf
<i>BSCL2</i>	Seipin
<i>CACNA1C</i>	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C
<i>CACNA1D</i>	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D

Gen	Descripción
<i>CACNA2D1</i>	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1
<i>CACNB2</i>	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2
<i>CALM1</i>	Calmodulin
<i>CALM2</i>	Calmodulin
<i>CALR3</i>	Calreticulin 3
<i>CAPN3</i>	Calpain-3
<i>CASQ2</i>	Calsequestrin-2
<i>CAV1</i>	Caveolin-1
<i>CAV3</i>	Caveolin-3
<i>CBL</i>	E3 ubiquitin-protein ligase CBL
<i>CBS</i>	Cystathionine beta-synthase
<i>CETP</i>	Cholesteryl ester transfer protein
<i>COL1A1</i>	Collagen alpha-1(I) chain
<i>COL1A2</i>	Collagen alpha-2(I) chain
<i>COL3A1</i>	Collagen alpha-1(III) chain
<i>COL5A1</i>	Collagen alpha-1(V) chain
<i>COL5A2</i>	Collagen alpha-2(V) chain
<i>COQ2</i>	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase, mitochondrial
<i>COX15</i>	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog
<i>COX6B1</i>	Cytochrome c oxidase subunit 6B1
<i>CRELD1</i>	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 1
<i>CRYAB</i>	Alpha-crystallin B chain
<i>CSRP3</i>	Cysteine and glycine-rich protein 3
<i>CTF1</i>	Cardiotrophin 1
<i>CTNNA3</i>	Catenin alpha-3
<i>DES</i>	Desmin
<i>DLD</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial
<i>DMD</i>	Dystrophin
<i>DNAJC19</i>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14
<i>DOLK</i>	Dolichol kinase
<i>DSC2</i>	Desmocollin 2
<i>DSG2</i>	Desmoglein 2
<i>DSP</i>	Desmoplakin
<i>DTNA</i>	Dystrobrevin alpha
<i>ELN</i>	Elastin
<i>EMD</i>	Emerin
<i>ENG</i>	Endoglin

Gen	Descripción
<i>EYA4</i>	Eyes absent homolog 4
<i>FAH</i>	Fumarylacetoacetase
<i>FBN1</i>	Fibrillin 1
<i>FBN2</i>	Fibrillin 2
<i>FHL1</i>	Four and a half LIM domains protein 1
<i>FHL2</i>	Four and a half LIM domains 2
<i>FHOD3</i>	FH1/FH2 domain-containing protein 3
<i>FKRP</i>	Fukutin-related protein
<i>FKTN</i>	Fukutin
<i>FLNA</i>	Filamin-A
<i>FLNC</i>	Filamin-C
<i>FOXD4</i>	Forkhead box protein D4
<i>GAA</i>	Lysosomal alpha-glucosidase
<i>GATA4</i>	Transcription factor GATA-4
<i>GATA6</i>	Transcription factor GATA-6
<i>GATAD1</i>	GATA zinc finger domain-containing protein 1
<i>GDF2</i>	Growth/differentiation factor 2
<i>GFM1</i>	Elongation factor G, mitochondrial
<i>GJA1</i>	Gap junction alpha-1 protein
<i>GJA5</i>	Gap junction alpha-5 protein
<i>GLA</i>	Alpha-galactosidase A
<i>GLB1</i>	Beta-galactosidase
<i>GNPTAB</i>	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits alpha/beta
<i>GPD1L</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein
<i>GUSB</i>	Beta-glucuronidase
<i>HCN4</i>	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
<i>HFE</i>	Hereditary hemochromatosis protein
<i>HRAS</i>	GTPase HRas
<i>JAG1</i>	Jagged-1
<i>JPH2</i>	Junctophilin 2
<i>JUP</i>	Junction plakoglobin
<i>KCNA5</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 5
<i>KCND3</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3
<i>KCNE1</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 1
<i>KCNE1L</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 1-like protein
<i>KCNE2</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 2
<i>KCNE3</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 3

Gen	Descripción
<i>KCNH2</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2
<i>KCNJ2</i>	Inward rectifier potassium channel 2
<i>KCNJ5</i>	G protein-activated inward rectifier potassium channel 4
<i>KCNJ8</i>	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 8
<i>KCNK3</i>	Potassium channel subfamily K member 3
<i>KCNQ1</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1
<i>KLF10</i>	Krüppel-like factor 10
<i>KRAS</i>	GTPase KRas
<i>LAMA2</i>	Laminin subunit alpha-2
<i>LAMA4</i>	Laminin subunit alpha-4
<i>LAMP2</i>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
<i>LDB3</i>	LIM domain-binding protein 3
<i>LDLR</i>	Low density lipoprotein receptor
<i>LIAS</i>	Lipoyl synthase, mitochondrial
<i>LMNA</i>	Prelamin-A/C
<i>LRP6</i>	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
<i>MAP2K1</i>	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
<i>MAP2K2</i>	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2
<i>MIB1</i>	E3 ubiquitin-protein ligase MIB1
<i>MLYCD</i>	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial
<i>MRPL3</i>	39S ribosomal protein L3, mitochondrial
<i>MRPS22</i>	28S ribosomal protein S22, mitochondrial
<i>MTO1</i>	Protein MTO1 homolog, mitochondrial
<i>MURC</i>	Muscle-related coiled-coil protein
<i>MYBPC3</i>	Myosin-binding protein C, cardiac-type
<i>MYH11</i>	Myosin, heavy chain 11, smooth muscle
<i>MYH6</i>	Myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha
<i>MYH7</i>	Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta
<i>MYL2</i>	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform
<i>MYL3</i>	Myosin light chain 3
<i>MYLK</i>	Myosin light chain kinase, smooth muscle
<i>MYLK2</i>	Myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle
<i>MYOT</i>	Myotilin
<i>MYOZ2</i>	Myozenin 2
<i>MYPN</i>	Myopalladin
<i>NEBL</i>	Nebulette
<i>NEXN</i>	Nexilin

Gen	Descripción
<i>NKX2-5</i>	Homeobox protein Nkx-2.5
<i>NOTCH1</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 1
<i>NOTCH3</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 3
<i>NPPA</i>	Atrial natriuretic factor
<i>NRAS</i>	GTPase NRas
<i>OBSL1</i>	Obscurin-like protein 1
<i>PCSK9</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
<i>PDHA1</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial
<i>PDLIM3</i>	PDZ and LIM domain protein 3
<i>PHKA1</i>	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform
<i>PITX2</i>	Pituitary homeobox 2
<i>PKP2</i>	Plakophilin 2
<i>PLN</i>	Cardiac phospholamban
<i>PLOD1</i>	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
<i>PMM2</i>	Phosphomannomutase 2
<i>PRDM16</i>	PR domain zinc finger protein 16
<i>PRKAG2</i>	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2
<i>PRKG1</i>	cGMP-dependent protein kinase 1
<i>PSEN1</i>	Presenilin-1
<i>PSEN2</i>	Presenilin 2
<i>PTPN11</i>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
<i>RAF1</i>	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
<i>RANGRF</i>	Ran guanine nucleotide release factor
<i>RBM20</i>	Probable RNA-binding protein 20
<i>RYR2</i>	Ryanodine receptor 2
<i>SCN10A</i>	Sodium channel protein type 10 subunit alpha
<i>SCN1B</i>	Sodium channel subunit beta-1
<i>SCN2B</i>	Sodium channel subunit beta-2
<i>SCN3B</i>	Sodium channel subunit beta-3
<i>SCN4B</i>	Sodium channel subunit beta-4
<i>SCN5A</i>	Sodium channel protein type 5 subunit alpha
<i>SGCA</i>	Alpha-sarcoglycan
<i>SGCB</i>	Beta-sarcoglycan
<i>SGCD</i>	Delta-sarcoglycan
<i>SHOC2</i>	Leucine-rich repeat protein SHOC-2
<i>SKI</i>	Ski oncogene
<i>SLC22A5</i>	Solute carrier family 22 member 5

Gen	Descripción
<i>SLC25A4</i>	ADP/ATP translocase 1
<i>SLC2A10</i>	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 10
<i>SLMAP</i>	Sarcolemmal membrane-associated protein
<i>SMAD1</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 1
<i>SMAD3</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 3
<i>SMAD4</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 4
<i>SMAD9</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 9
<i>SNTA1</i>	Alpha-1-syntrophin
<i>SOS1</i>	Son of sevenless homolog 1
<i>SPRED1</i>	Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1
<i>SURF1</i>	Surfeit locus protein 1
<i>TAZ</i>	Tafazzin
<i>TBX1</i>	T-box transcription factor TBX1
<i>TBX20</i>	T-box transcription factor TBX20
<i>TBX5</i>	T-box transcription factor TBX5
<i>TCAP</i>	Telethonin
<i>TGFB2</i>	Transforming growth factor beta-2
<i>TGFB3</i>	Transforming growth factor, beta 3
<i>TGFBR1</i>	TGF-beta receptor type-1
<i>TGFBR2</i>	TGF-beta receptor type-2
<i>TMEM43</i>	Transmembrane protein 43
<i>TMEM70</i>	Transmembrane protein 70, mitochondrial
<i>TMPO</i>	Thymopoietin
<i>TNNC1</i>	Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles
<i>TNNI3</i>	Troponin I, cardiac muscle
<i>TNNT2</i>	Troponin T, cardiac muscle
<i>TPM1</i>	Tropomyosin alpha-1 chain
<i>TRDN</i>	Triadin
<i>TRIM63</i>	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM63
<i>TRPM4</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4
<i>TSFM</i>	Elongation factor Ts, mitochondria
<i>TTN</i>	Titin
<i>TTR</i>	Transthyretin
<i>TXNRD2</i>	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial
<i>VCL</i>	Vinculin