

Detección directa de mutaciones malignas en pacientes con miocardiopatía hipertrófica

Mónica García-Castro^a, Julián R. Reguero^b, Alberto Batalla^c, Felicitas Catalán^d, Juan Mayordomo^b y Eliecer Coto^a

^aLaboratorio de Genética Molecular e Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. Hospital Central de Asturias. Oviedo. Asturias. ^bServicio de Cardiología. Hospital Central de Asturias. Oviedo. Asturias. ^cServicio de Cardiología. Hospital de Cabueñes. Gijón. Asturias. ^dServicio de Cardiología. Hospital San Agustín. Avilés. Asturias. España.

Hemos determinado la prevalencia de mutaciones consideradas malignas en los genes de la cadena pesada de la betamiosina (*MYH7*, 11 mutaciones) y la troponina T (*TNNT2*, 5 mutaciones) en 30 pacientes con miocardiopatía hipertrófica (MCH) menores de 60 años, de los que el 83% tenía antecedentes familiares de MCH y/o muerte súbita. Empleamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de digestión con una enzima de restricción y electroforesis en geles de agarosa.

El análisis directo nos permitió identificar alguna de las 16 mutaciones en 2 de los 30 pacientes (7%): una mujer diagnosticada a los 25 años era portadora de la mutación MYH7-453 cisteína, y otra mujer, de 60 años, era portadora de la mutación TNNT2-278 cisteína. Estos casos ilustran la gran heterogeneidad clínica que caracteriza a los portadores, que van desde la hipertrofia grave o la muerte súbita temprana hasta la ausencia de síntomas en edades avanzadas de la vida.

Palabras clave: *Miocardiopatía hipertrófica. Muerte súbita. Cadena pesada de la betamiosina. Troponina T cardíaca. Mutaciones.*

Direct Detection of Malignant Mutations in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy

We determined the prevalence of mutations considered malignant in the genes for beta-myosin heavy chain (*MYH7*, 11 mutations) and troponin T (*TNNT2*, 5 mutations) in 30 patients with hypertrophic cardiomyopathy aged 18 to 60 years, 83% of whom had familial antecedents of hypertrophic myocardiopathy or sudden death. Mutations were identified with polymerase chain reaction followed by restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis.

Direct analysis identified 16 mutations in 2 of the 30 patients (7%): one woman diagnosed at the age of 25 years as carrying the MYH7453cysteine mutation, and a 60-year-old woman with the TNNT2278 cysteine mutation. These cases illustrate the considerable clinical heterogeneity that characterizes carriers of these mutations. Clinical manifestations can range from severe hypertrophy or early sudden death to the absence of symptoms up to advanced age.

Key words: *Hypertrophic cardiomyopathy. Sudden cardiac death. Beta-myosin. Troponin T. Mutations.*

Full English text available at: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

La miocardiopatía hipertrófica (MCH) afecta a uno de cada 500-1.000 individuos¹. A pesar de que el espectro clínico de la enfermedad es muy variable, la es-

timación del riesgo se basa actualmente en criterios clínicos²⁻⁴.

Aproximadamente la mitad de los casos presenta antecedentes familiares, y tendría mutada una de las 2 copias de alguno de los genes que codifican proteínas del sarcómero⁵. Las mutaciones en los genes de la cadena pesada de la betamiosina (*MYH7*) y de la troponina T cardíaca (*TNNT2*) darían formas graves, con un riesgo elevado de muerte súbita (MS)⁵⁻⁷. Sin embargo, algunos portadores manifiestan hipertrofia ligera, y algunas mutaciones en el gen *TNNT2* no provocan hipertrofia visible mediante ecocardiografía, pero elevan el riesgo de MS. En general, no se puede establecer una relación total entre una mutación y un pronóstico determinado^{8,9}.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Sociedad Asturiana de Cardiología y por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Red Temática de Centros; Genética).

Correspondencia: Dr. E. Coto García.
Hospital Central de Asturias (Maternidad). Laboratorio de Genética Molecular.
Celestino Villamil, s/n. 33006 Oviedo. Asturias. España.
Correo electrónico: ecoto@hcas.sespa.es

Recibido el 7 de enero de 2003.

Aceptado para su publicación el 12 de junio de 2003.

TABLA 1. Principales características de los 30 pacientes con miocardiopatía hipertrófica

Total	30
Varones/mujeres	16/14
Edad media al diagnóstico	46 años (intervalo, 18-60)
Grosor de la pared ventricular izquierda	
13-16 mm	5 (16%)
17-19 mm	7 (23%)
> 19 mm	18 (61%)
Hipertrofia concéntrica	11
Con asimetría septal	19
Con gradiente (intervalo, 16-130 mmHg)	16
Con antecedentes familiares	16 (54%)
Edad media	44 años (intervalo, 24-60)
Sin antecedentes familiares	14 (46%)
Edad media	37 años (intervalo, 20-56)
Antecedentes familiares de muerte súbita	9 (30%)

En este estudio nos hemos propuesto definir el valor del análisis directo de algunas mutaciones consideradas malignas con el fin de determinar su utilidad en la posible toma de decisiones clínicas en personas con antecedentes de MCH.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

Los 30 pacientes tenían entre 18 y 60 años (edad en el momento del diagnóstico) y presentaban una hipertrofia ventricular esencial (no secundaria a otras causas) de al menos 13 mm. En 25 casos se pudo constatar antecedentes familiares de MCH o MS (tabla 1). El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital Central de Asturias, y todos los pacientes dieron su consentimiento para participar.

Análisis genético

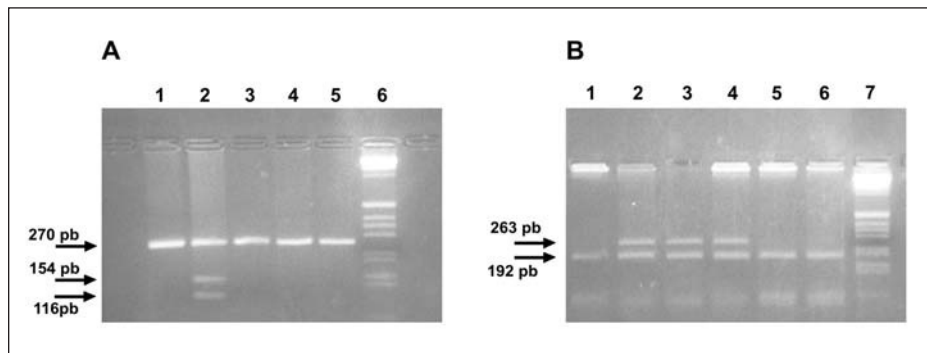
Se obtuvo el ADN de los pacientes a partir de los leucocitos de 10 ml de sangre empleando un método de precipitación salina¹⁰. Los exones de cada paciente se amplificaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con cebadores diseñados a partir de las secuencias de los 2 genes (tabla 2). Las reacciones fueron digeridas con una endonucleasa de restricción (New England Biolabs o Boehringer Mannheim). Los fragmentos de cada digestión se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% que,

TABLA 2. Mutaciones estudiadas en los genes *MYH7* y *TNNT2* y secuencias de los cebadores empleados para amplificar los exones

Mutaciones	Exón	Cebadores
	Gen <i>MYH7</i>	
R403Q*	13	S: 5'-CAGGCATGAACCACACACCTG-3'
R403L		A: 5'-TCTCATCCCACCATGCCAGT-3'
R403W		
R453C*	14	S: 5'-TCACTCTTCCCAACAACCCTG-3'
		A: 5'-AGAAATAGCTGTTGAATGTGGG-3'
V606M*	16	S: 5'-GCAGAATCCATGTGCACCTGTGTGA-3'
		A: 5'-AATTGACCTGGCTCAGAACCTTG-3'
G716R*	19	S: 5'-CAGAACCCAGAACTTCAGTCCAGT-3'
		A: 5'-CCCACCTCTGCCGGAAGTCCG-3'
R719Q		
R719P		S: 5'-CAGAACCCAGAACTTCAGTCCAGT-3'
R719W*		A: 5'-CCCATTCCCATCAGGGCA-3'
R723G*	20	S: 5'-ACTCTGGAGACTTCCCTCCTCAGGA-3'
R723C		A: 5'-AGCATCAGAGGAGTCAATGGAA-3'
	Gen <i>TNNT2</i>	
I79N*	8	S: 5'-GCCCTGCCTGTCTGGACAC-3'
		A: 5'-CCCACCTATGCTCTACCCAG-3'
R92W*	9	S: 5'-GTCTAGCCCACCCATCTCTCCT-3'
R92Q		A: 5'-GAGGTGGGGCCTCACAAAAG-3'
R92L		
R278C*	16	S: 5'-CATGGTGACCTACTACCCTGC-3'
		A: 5'-GTGTGGGGGCAGGCAGGA-3'

*Mutaciones relacionadas con formas malignas de miocardiopatía hipertrófica.

Fig. 1. Patrones electroforéticos correspondientes a los exones 14 del gen *MYH7* (A) y 16 del gen *TNNT2* (B). A: en el caso del gen *MYH7*, la digestión del fragmento amplificado con la enzima de restricción *Nla*III permite visualizar el alelo normal, que no digiere (banda de 270 bases) de la mutación (bandas de 154 y 156 bases), que cambia el aminoácido en la posición 453 (arginina a cisteína). El carril 2 corresponde al paciente portador de la mutación y los carriles 1, 3, 4, y 5, a pacientes sin la mutación. El carril 6 contiene el marcador de tamaño de los fragmentos de ADN. B: tras digestión del fragmento amplificado con la enzima *Bst*UI, se puede distinguir el fragmento con la mutación que cambia el aminoácido en la posición 278 del gen *TNNT2* (arginina a cisteína, banda de 263 bases) del alelo normal (bandas de 192 y 71 bases). Las líneas 1, 5 y 6 corresponden a pacientes sin la mutación, y las líneas 2, 3 y 4, a una paciente con la mutación, su hermana y su hija. El carril 7 contiene el marcador de tamaños.



una vez teñidos con bromuro de etidio, permitieron visualizar la presencia de bandas correspondientes a las secuencias normales o mutadas. Las mutaciones así identificadas fueron confirmadas mediante secuenciación automática, empleando un sistema ABI310 (Applied Biosystems).

RESULTADOS

Hallamos alguna de las 16 mutaciones en 2 de los 30 pacientes: *MYH7*-R453C y *TNNT2*-R278C (figs. 1 y 2).

Caso 1

La mutación R453C en el exón 14 del gen *MYH7* fue hallada en una mujer de 44 años diagnosticada de MCH a la edad de 25 años. Posteriormente, manifestó sintomatología que coincidió con la aparición de fibrilación auricular, que no pudo ser revertida a ritmo sinusal después de cardioversión eléctrica. Actualmente presenta un grado funcional III/IV de la NYHA (New York Heart Association) para disnea y una presión arterial (PA) de 110/85 mmHg sin soplos y con signos de fallo cardíaco derecho. El electrocardiograma (ECG) mostró una arritmia completa por fibrilación auricular, y el ecocardiograma una hipertrofia septal asimétrica del ventrículo izquierdo (VI; 17 mm de septo y 12 mm de pared posterior), sin gradiente ni movimiento sistólico anterior subvalvular. El Holter repetido no detectó arritmias ventriculares. Su hijo había fallecido de MS a la edad de 17 años, sin que existieran otros antecedentes familiares conocidos de la enfermedad.

Caso 2

La mutación R278C en el gen *TNNT2* se halló en una mujer de 60 años, sin antecedentes familiares, que

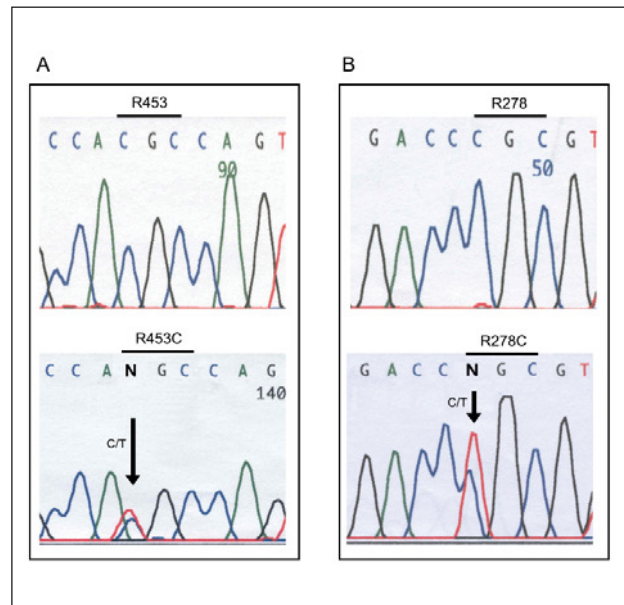


Fig. 2. Fragmento de las secuencias de los genes *MYH7* (A) y *TNNT2* (B), correspondientes a los codones que presentan las mutaciones. En los 2 casos se indica con una flecha el nucleótido mutado, que aparece como un pico de un solo color en la secuencia normal o de colores en la secuencia de los portadores de la mutación (que tendrán una copia normal y una copia mutada).

había sido diagnosticada a la edad de 49 años de una hipertrofia septal asimétrica. Había tenido episodios de síncope, disnea, mareos y palpitaciones, y la eco-Doppler puso de manifiesto una hipertrofia septal asimétrica no obstructiva con un septo de 22 mm y pared posterior de 12 mm, sin gradiente intraventricular, flujo diastólico mitral normal, patrón de relajación del VI retrasado y una aurícula izquierda dilatada de 47 mm. Pudimos estudiar a una hermana y a una hija de esta paciente, de 45 y 30 años, respectivamente, que eran portadoras de la mutación, pero tenían un VI no hipertrofico, con función Doppler normal.

DISCUSIÓN

La miocardiopatía hipertrófica es una enfermedad genéticamente compleja: se han identificado más de 150 mutaciones en al menos 11 genes que codifican proteínas sarcoméricas^{5,11}. Una primera aproximación al análisis genético sería determinar en los pacientes la presencia de alguna de las mutaciones conocidas, especialmente las que han sido relacionadas con un mal pronóstico. Así, Ackerman et al analizaron las mutaciones R403Q, R453C, G716R y R719W en el gen *MYH7*, y la mutación R92W del gen *TNNT2*, en 293 pacientes con MCH, y sólo hallaron alguna de ellas en 3 pacientes, todos menores de 25 años¹². El hecho de que sólo encontrasen mutaciones en el 1% de los pacientes llevó a estos autores a concluir que su determinación rutinaria sería poco útil. Este porcentaje es más bajo que el hallado por nosotros (7%), aunque Ackerman et al estudiaron a pacientes con un espectro fenotípico más amplio que los nuestros, incluyendo formas de aparición tardía (con pacientes de hasta 89 años), mientras que nosotros incluimos a pacientes menores de 60 años. En conjunto, estos resultados sugieren que el análisis directo de las mutaciones en estos genes sería más útil en las formas graves y/o precoces de MCH, aunque en la mayoría de los casos la única forma de identificar alguna mutación en estos genes sería la secuenciación de todos sus exones.

En la toma de decisiones clínicas sobre los portadores, debería valorarse el hecho de que no se ha podido establecer una correlación total entre esas mutaciones y el desarrollo de hipertrofia grave o MS. En nuestro estudio, una paciente de 44 años era portadora de la mutación R453C en el gen *MYH7* y su hijo había fallecido de MS a los 17 años. Aunque no se pudo determinar la presencia de la mutación en el hijo, cabe suponer que sería portador. Una paciente que había sido diagnosticada de MCH grave era portadora de la mutación R278C en el gen *TNNT2*, mientras que una hermana y una hija eran también portadoras, pero no presentaban signos de hipertrofia. Estos 2 casos ilustran la heterogeneidad fenotípica en los portadores de mutaciones tradicionalmente consideradas malignas, que van desde la hipertrofia grave o MS precoz a su ausencia a una edad avanzada.

Limitaciones del estudio

Nuestro estudio presenta dos limitaciones. En primer lugar, analizamos un número reducido de pacientes. Por otro lado, nuestros resultados no reflejan el espectro mutacional real de estos genes, sino la incidencia de varias mutaciones previamente descritas. Para conocer la frecuencia de mutaciones en *MYH7* y *TNNT2* sería necesario secuenciar todos los exones de estos genes.

CONCLUSIONES

Nuestra experiencia indica que el análisis directo de las 16 mutaciones en los genes *TNNT2* y *MYH7* permitiría identificar la base genética de la MCH en cerca del 7% de los casos, independientemente de la existencia de antecedentes familiares. Este método podría ser útil como primera aproximación al diagnóstico genético.

Agradecimiento

Además de los autores, han contribuido a este estudio V. Álvarez, B.D. Molina, V. Albaladejo, A. Cortina, M. Soto y G.I. Cubero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Circulation* 1995;92: 785-9.
2. Elliot PM, Poloniecki J, Dickie S, Sharma S, Monserrat L, Varnava A, et al. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: Identification of high risk patients. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2212-8.
3. Olivetto I, Gistri R, Petrone P, Pedemonte E, Vargiu D, Cecchi F. Maximum left ventricular thickness and risk of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:315-21.
4. McKenna WJ, Monserrat Iglesias L. Identificación y tratamiento de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica y riesgo de muerte súbita. *Rev Esp Cardiol* 2000;53:123-30.
5. Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002;11:2499-506.
6. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and α -tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995;332:1058-64.
7. Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, Levi T, McKenna W, Seidman CE, et al. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992;326:1108-14.
8. Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, et al. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:549-55.
9. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Isnard R, Hagege A, Bonne G, et al. Genotype-phenotype correlations in familial hypertrophic cardiomyopathy. A comparison between mutations in the cardiac protein-C and the beta-MHC genes. *Eur Heart J* 1998;19: 139-45.
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A salting out method for DNA preparation. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
11. Roberts R. Genética molecular de las miocardiopatías. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:292-302.
12. Ackerman MJ, Van Driest SL, Ommen SR, Will ML, Nishimura RA, Tajik AJ, et al. Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy. A comprehensive outpatient perspective. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:2042-8.