

Cardiología pediátrica en la era de la genómica

José Marín-García

The Molecular Cardiology and Neuromuscular Institute. Highland Park. New Jersey. Estados Unidos.

A pesar de que las enfermedades cardíacas congénitas, las miocardiopatías, las arritmias y las enfermedades cardíacas adquiridas son causas frecuentes de mortalidad y morbilidad en niños de todas las edades, los mecanismos básicos que subyacen a muchas de estas enfermedades cardiovasculares pediátricas siguen sin esclarecerse. Los grandes avances en la tecnología genómica molecular empiezan ahora a aplicarse en la cardiología pediátrica a partir del uso de mapas cromosómicos y de la identificación de los genes involucrados tanto en la etiología primaria como en los factores de riesgo significativos para el desarrollo de anomalías cardíacas y vasculares. Esta revisión se centrará en la información que se ha obtenido hasta el momento a partir de análisis genéticos moleculares en el diagnóstico, el tratamiento y la comprensión general de la patogenia de la enfermedad cardiovascular pediátrica, examinando tanto los defectos cardíacos congénitos/heredados más prevalentes, las arritmias y las miocardiopatías, como las alteraciones esporádicas y adquiridas. Además, se examinará el arsenal terapéutico disponible en cardiología pediátrica en relación con el análisis molecular y genético, haciendo especial hincapié en los usos actuales de los métodos de diagnóstico molecular. Estos métodos incluyen los «microarrays», los mapas genéticos, la proteómica y las tecnologías transgénicas y de células madre. Finalmente, se analizarán las direcciones futuras, tanto en la aplicación clínica como en la investigación.

Palabras clave: *Cardiología pediátrica. Genoma. Biología molecular.*

Pediatric Cardiology in the Genomic Era

While congenital heart disease, cardiomyopathy, arrhythmias and acquired cardiac diseases are common causes of mortality and morbidity in infants and children, the basic underlying mechanisms of many specific pediatric cardiovascular diseases still remains undetermined. Breakthroughs in molecular genetic technology have just begun to be applied in pediatric cardiology stemming from the use of chromosomal mapping and the identification of genes involved in both the primary etiology and as significant risk factors in the development of cardiac and vascular abnormalities. This review will focus on information obtained thus far by molecular genetic analysis in the diagnosis, treatment and overall understanding of pediatric cardiovascular disease pathogenesis examining both the more prevalent congenital/inherited heart defects, arrhythmias and cardiomyopathies, as well as sporadic and acquired disorders. In addition, a survey of the pediatric cardiologist's armamentarium with regards to molecular and genetic analysis is presented highlighting the current use of molecular diagnostic methods including microarray, gene-mapping, proteomic, transgenic and stem cell technologies as well as future directions in both clinical application and research.

Key words: *Pediatric cardiology. Genomics. Molecular biology.*

Full English text available at: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardíacas congénitas, las miocardiopatías y las arritmias son causas frecuentes de mortalidad y morbilidad en niños de todas las edades, especialmente durante el período perinatal. Las ano-

malías cardiovasculares representan la clase más común de defectos al nacer y afectan a 1 de cada 100 niños cada año. La alta incidencia de defectos cardiovasculares en niños supone una enorme carga y un elevado coste para las familias, el sistema de salud y la sociedad en general.

Aunque la comprensión de la patología ha aumentado con rapidez en los últimos años, los mecanismos básicos que subyacen a muchas enfermedades pediátricas cardiovasculares todavía no han sido aclarados. Debido a los significativos avances técnicos asociados a la secuenciación del genoma humano, la investigación ha empezado a proporcionar una mejor compren-

Correspondencia: J. Marín-García, MD, FAAP, FACC, FESC.
The Molecular Cardiology and Neuromuscular Institute.
75 Raritan Ave. Highland Park, NJ 08904. USA.
Correo electrónico: tmci@att.net

ABREVIATURAS

AMPK: proteincinasa activada por AMP.
DMPK: proteincinasa de la miotonina.
FISH: hibridación fluorescente *in situ*.
Síndrome de MELAS: miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios de pseudoictus.
Síndrome de MERRF: epilepsia mioclónica y desorganización de las fibras rojas.
 β MHC: cadena pesada beta de la miosina.
 α MHC: cadena pesada alfa de la miosina.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
RYR2: receptor 2 de la ryanodina.
SHP-2: proteína tirosina-fosfatasa.
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.
TGF: factor transformador del crecimiento.

sión de los defectos moleculares específicos y a identificar los factores que contribuyen a las alteraciones cardíacas, muchas de las cuales están implicadas en anomalías del desarrollo del corazón. Sin embargo, mientras que la aplicabilidad clínica de estas técnicas moleculares supone una gran promesa en cuanto al diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad cardíaca pediátrica, su uso real en el marco clínico sigue siendo limitado, en parte debido a los altos costes y los recursos que implica, y en parte debido a la compleja heterogeneidad genética¹.

Esta revisión se centrará en la información proporcionada por el análisis molecular y genético en el diagnóstico, el tratamiento y el conjunto del conocimiento de la patogenia de la enfermedad cardiovascular pediátrica, abordando tanto los defectos cardíacos congénitos/heredados más prevalentes como las alteraciones esporádicas y adquiridas. Se presentará también una discusión sobre las arritmias y las miocardiopatías en pacientes prenatales, neonatales y en niños, desde un punto de vista molecular. Además, se examinará el arsenal terapéutico disponible en cardiología pediátrica en relación con el análisis molecular y genético, haciendo especial hincapié en el uso actual de métodos diagnósticos moleculares, como los *microarrays*, la proteómica y las tecnologías basadas en la transgénesis y en las células madre. Finalmente, se analizarán las direcciones futuras, tanto en aplicación clínica como en investigación.

GENÉTICA MOLECULAR: DEFECTOS QUE CONDUCEN A LAS ALTERACIONES CARDÍACAS

Los avances más recientes en genética molecular han revelado que determinados factores específicos genéti-

cos y moleculares están ligados a las enfermedades cardíacas congénitas y a las arritmias cardíacas, lo que permite su identificación en el mapa cromosómico humano (fig. 1) y proporciona una oportunidad valiosa para mejorar el diagnóstico genético y la terapia génica futura.

Enfermedades cardíacas congénitas

Las mutaciones de un único gen se han implicado en la patogenia de una gran variedad de defectos cardíacos congénitos (tabla 1) y diferentes observaciones sugieren que estas mutaciones (más comunes de lo que inicialmente se pensaba) están presentes en un amplio espectro de genes involucrados en la estructura y la función cardíaca. El grado de especificidad cardíaca de estas mutaciones es enormemente variable. Muchos síndromes asociados a mutaciones de un único gen tienen una presentación neuromuscular y sistémica con afección cardíaca (p. ej., la ataxia de Friedreich, la distrofia muscular de Duchenne). Una amplia variedad de defectos cardíacos procede de estas mutaciones genéticas, entre otros, las anomalías en la función electrofisiológica (como defectos en la conducción y arritmias), proteínas de la matriz extracelular, enzimas y transportadores de membrana que participan en la biosíntesis mitocondrial y de los ácidos grasos, el metabolismo de la fosforilación oxidativa del corazón, la estructura del sarcómero y de las proteínas contráctiles, los factores de transcripción nucleares que gobiernan la expresión génica miocárdica y el programa de desarrollo. Las malformaciones cardíacas pleiotrópicas pueden ser consecuencia de mutaciones discretas en factores de transcripción nucleares específicos, que son proteínas que desempeñan un papel regulador clave durante el desarrollo cardíaco y la morfogénesis²⁻⁴. Factores como el GATA4, NKX2.5, dHAND, TFAP2 y TBX5 se encuentran entre los factores de transcripción que se expresan más precozmente en el desarrollo del corazón y son cruciales para la activación de genes cardíacos específicos. Las mutaciones en cada uno de estos genes producen anomalías cardíacas severas, como defectos septales cardíacos (GATA4), defectos en la conducción (NKX2.5), hipoplasia ventricular derecha (dHAND), *ductus arteriosus* persistente en el síndrome de Char (TFAP2B) y síndrome de Holt-Oram (TBX5), lo que pone de relieve el papel crítico que desempeña el trastorno del desarrollo cardíaco inicial en la génesis de los defectos cardíacos congénitos⁵⁻⁹.

También se han identificado defectos genéticos en proteínas que están involucradas en vías de señalización múltiples y que modulan la proliferación celular, la migración y la diferenciación en el desarrollo cardíaco temprano. Las mutaciones en *Jag1* se han identificado en estudios familiares en asociación con el síndrome de Alagille, una alteración compleja de tipo autosómico dominante que se presenta con defectos cardíacos congénitos como la estenosis arterial

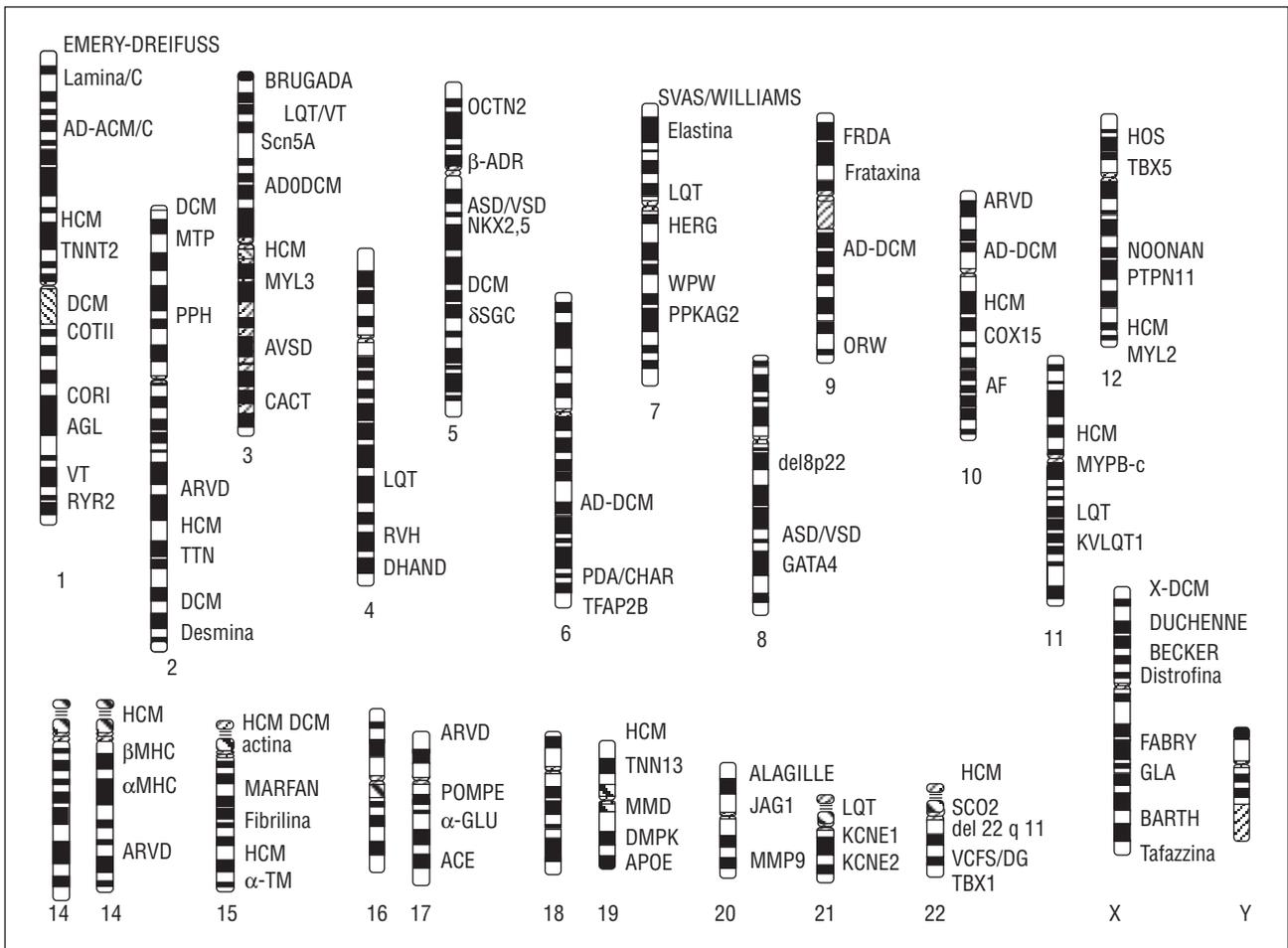


Fig. 1. Mapa cromosómico humano de alteraciones cardiovasculares pediátricas heredadas. Las alteraciones y los genes afectados se encuentran localizados en ideogramas de cada uno de los cromosomas humanos. Éstos incluyen:

ECA: enzima de conversión de la angiotensina; AD-DCM: miocardiopatía dilatada autosómica dominante; FA: fibrilación auricular familiar; AGL: enzima desramificadora del glucógeno; APOE: apolipoproteína E; ARVD: displasia arritmogénica del ventrículo derecho; AVSD: defecto septal aurículo-ventricular; α -GLU: alfa-glucosidasa; α -MHC: cadena pesada alfa de la miosina; α -TM: alfatropomiosina; β -MHC: cadena pesada beta de la miosina; CACT: translocasa de la carnitina-acilcarnitina; CPTII: palmitoiltransferasa de la carnitina; δ -SGC: deltasarcoglicano; DCM: miocardiopatía dilatada; DMPK: proteincinasa de la miotonina; FRDA: ataxia de Friedreich; GLA: alfa-galactosidasa; HCM: miocardiopatía hipertrófica; HERG: gen relacionado con ether-a-go-go humano; HOS: síndrome de Holt-Oram; KCNE1: canal de potasio, dependiente de voltaje, miembro 1 relacionado con la subfamilia Isk; KCNE2: canal de potasio, dependiente de voltaje, miembro 2 relacionado con la subfamilia Isk; KVLQT1: canal del síndrome 1 de QT largo dependiente de voltaje; LQT: síndrome de QT largo; MMD: distrofia muscular miotónica; MMP9: metaloproteínasa 9 de matriz; MTP: proteína trifuncional mitocondrial; MYPB-c: proteína C que se une a la miosina; MYL2: cadena ligera de la miosina ventricular reguladora; MYL3: cadena ligera de la miosina ventricular esencial; OCTN2: transportador 2 orgánico catiónico de la carnitina; ORW: síndrome de Osler-Rendu-Weber; PDA: *ductus arteriosus* persistente/síndrome de Char; PPH: hipertensión pulmonar primaria; PPKAg2: proteincinasa gamma 2 activada por AMP; PTPN11: proteína tirosina fosfatasa; RYR2: receptor 2 de la ryanodina; RVH: hipoplasia ventricular derecha; SCO2: síntesis de citocromo c oxidasa (proteína de ensamblaje de COX); SCN5A: canal de sodio dependiente de voltaje, tipo V, alfa-polipéptido; SVAS: estenosis aórtica supra-ventricular; TBX1: factor de transcripción de la caja-T 1; TBX5: factor de transcripción de la caja-T 5; TFAP2B: factor de transcripción de la familia AP-2; TNNT2: troponina T cardíaca; TNN13: troponina I cardíaca; VCFS/DG: síndrome velocardiocéfalo/síndrome de DiGeorge; VT: taquicardia ventricular; WPW: síndrome de Wolff-Parkinson-White; X-DCM: miocardiopatía dilatada ligada al cromosoma X.

pulmonar y la tetrada de Fallot¹⁰. *Jag1* codifica un ligando que se une al receptor Notch, una vía de señalización evolutivamente conservada y que participa en la especificación del destino celular. Las mutaciones en PTPN11, que codifica una proteína tirosina-fosfatasa (SHP-2), parecen desempeñar un papel en la patogenia del síndrome de Noonan, caracterizado por defectos en la conducción, estenosis pulmonar y miocardiopatía hipertrófica¹¹, y recientemente también han

sido implicados en la patogenia del síndrome LEOPARD, que probablemente es una alteración alélica¹².

Además de las mutaciones puntuales en regiones codificadoras de genes específicos, una gran cantidad de alteraciones neuromusculares heredadas, conocidos como los síndromes de tripletes repetidos, como la ataxia de Friedreich y la distrofia muscular miotónica, están causados por la repetición expandida de secuencias trinucleótidas dentro de genes específicos, como

TABLA 1. Errores innatos que causan defectos cardíacos congénitos

Genes afectados (<i>loci</i>)	Fenotipo cardíaco/(síndrome)	Autor y referencia bibliográfica
<i>Canalopatías/electrofisiología</i>		
Subunidad alfa del canal cardíaco de sodio dependiente de voltaje (SCN5A)	Arritmia, taquicardia ventricular y fibrilación, muerte súbita (QT largo y Brugada)	Bezzina C, et al ²² ; Splawski I, et al ²³
HERG (KCNH2)	Arritmias cardíacas, muerte súbita (QT largo)	Splawski I, et al ²³
MinK (KCNE1)	Arritmias cardíacas, muerte súbita (QT largo)	Splawski I, et al ²³
MiRP-1 (KCNE2)	Arritmias cardíacas, muerte súbita (QT largo)	Splawski I, et al ²³
KVLQT1 (KCNQ1)	Arritmias cardíacas, muerte súbita (QT largo)	Splawski I, et al ²³
Proteína de la membrana nuclear (lámina A/C)	Defectos de conducción, distrofia muscular (Emery-Dreifuss)	Bonne G, et al ²⁵
Receptor cardíaco de ryanodina (RyR2)	Taquicardia ventricular	Laitinen PJ, et al ²⁴
<i>Proteínas vasculares de la matriz extracelular</i>		
Fibrilina-1 (FBN-1)	Insuficiencia mitral o aórtica, muerte súbita (Marfan)	Dietz HC, et al ²⁷
Elastina	Estenosis arterial aórtica y sistémica (Williams)	Ewart AK, et al ²⁸
<i>Factores de transcripción</i>		
GATA4	Defectos cardíacos septales	Garg V, et al ⁵
TBX1	DiGeorge/velocardiofacial	Chieffo C, et al ¹⁷
TBX5	Holt-Oram	Bruneau BG, et al ⁹
CSX/NKX2.5	DSA/DSV bloqueo AV	Benson DW, et al ⁴ ; Schott JJ, et al ⁶
dHAND	Hipoplasia ventricular derecha	Srivastava D ³
TFAP2	<i>Ductus arteriosus</i> persistente (Char)	Zhao F, et al ⁸
<i>Proteínas de señalización</i>		
Proteína tirosina fosfatasa SHP-2 (PTPN11)	Defectos de conducción	Tartaglia M, et al ¹¹ , Legius E, et al ¹²
Jagged 1 (Jag1)	Estenosis pulmonar (Noonan y LEOPARD)	Krantz ID, et al ¹⁰
Proteincinasa de la miotonina (DMPK)	Estenosis arterial pulmonar Tétrada de Fallot (Alagille) Arritmias y defectos de conducción (distrofia muscular miotónica)	Korade-Mirnic Z, et al ¹⁴

AV: auriculoventricular; DSA: defecto septal auricular; DSV: defecto septal ventricular.

la frataxina y la proteincinasa de la miotonina (DMPK), respectivamente^{13,14}. Los individuos afectados presentan anomalías cardíacas como miocardiopatía, arritmias cardíacas y defectos en la conducción. En ambas alteraciones, la severidad del fenotipo clínico se correlaciona con el número de repeticiones nucleotídicas, de manera que en individuos afectados por la ataxia de Friedreich se encuentran más de 200 repeticiones del tipo GAA, mientras que en los casos de distrofia muscular miotónica se producen más de 50 copias de CTG.

Las grandes deleciones cromosómicas también han sido implicadas en las malformaciones estructurales y de desarrollo del corazón, como las anomalías conotruncuales, los defectos del canal auriculoventricular y defectos septales ventriculares y auriculares^{15,16}. Los defectos cardíacos del tracto de salida son una manifestación de la compleja alteración genética velocardiofacial del síndrome de DiGeorge, también llamado CATCH-22. La mayoría de los pacientes son hemiciotos para la deleción de una región de 1.5 a 3.0 Mb del cromosoma 22 (22q11), del que se sospecha que es fundamental en el desarrollo normal del arco faríngeo,

que contiene más de 30 genes; la deleción de 22q11 es un hecho relativamente común que ocurre en cerca de 1 de cada 4.000 nacimientos vivos. Se ha identificado el gen *TBX1*, derivado del área central de la región de la deleción, como el factor básico para el desarrollo de este defecto congénito¹⁷. El *TBX1*, un miembro de la familia génica filogenéticamente conservada que comparte un dominio común de unión al ADN (la caja T), codifica un factor de transcripción involucrado en la regulación del desarrollo cardíaco; la reducción en la expresión de *TBX1* (que ocurre en los casos de deleción hemiciótica), referida a menudo como haploinsuficiencia, tiene un impacto importante en la expresión génica temprana implicada en la morfogénesis cardíaca. Se han descrito otras microdeleciones cromosómicas asociadas a defectos cardíacos congénitos (por ejemplo, la 8p) y es posible que algunas de ellas hayan sido pasadas por alto debido a su pequeño tamaño y a su localización cromosómica¹⁸. Las tecnologías más recientes de citogenética molecular de alta resolución, como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), se utilizan actualmente de manera sistemática para confirmar el diagnóstico clínico de daño cromosómico

del tipo de microdeleciones cromosómicas y translocaciones de pequeño tamaño.

Es importante señalar que este tipo de deleciones de gran tamaño está asociado a menudo con un amplio espectro de características clínicas, además de afectar al desarrollo cardíaco. Las malformaciones extracardíacas se asocian frecuentemente a los defectos cardíacos congénitos y su frecuencia se ha estimado en más del 30% de los casos. Estas alteraciones cromosómicas son más prevalentes en pacientes con anomalías cardíacas que en la población general. A diferencia de las malformaciones cardíacas neonatales, que se asocian a las trisomías 13, 18 y 21 (síndrome de Down), o a la monosomía XO (síndrome de Turner), y que son bien conocidas, las bases moleculares precisas por las que el desequilibrio en el número de genes causa un fenotipo cardíaco determinado todavía no se han podido elucidar.

Arritmia y muerte súbita

Las arritmias cardíacas son una complicación frecuente de la enfermedad cardíaca pediátrica y pueden ser una causa primaria de muerte cardíaca súbita. Las mutaciones en genes específicos que codifican canales iónicos cardíacos se han identificado como un factor de riesgo en la patogenia de las arritmias letales y no letales. Las mutaciones en el *SCN5A*, un gen que codifica los canales de sodio que inician los potenciales de acción, se asocian a una prolongación del intervalo QT o a síndrome de QT largo, que causa una predisposición al síncope y a la muerte cardíaca súbita^{19,20}. La característica fenotípica del síndrome de QT largo es una repolarización ventricular anormal, y puede resultar en fibrilación ventricular idiopática, taquicardia ventricular, defectos en la conducción cardíaca y síndrome de Brugada^{21,22}. Las mutaciones en otros 4 genes (como *HERG*, *KCNE1*, *KCNE2* y *KVLQT1*) que están involucrados en la formación de los canales de potasio se han asociado también al inicio del síndrome de QT largo²³. Estos defectos se caracterizan por una heterogeneidad genética significativa, con más de 30 mutaciones identificadas en 40 familias.

Las mutaciones en una gran variedad de transportadores de membrana que operan en *loci* celulares diferentes de la membrana plasmática miocárdica han sido implicadas en defectos de la conducción auriculoventricular, ampliando sustancialmente el concepto clásico de canalopatías cardíacas. Se han identificado mutaciones con pérdida de sentido en el canal de calcio sensible a la ryanodina (RyR2) involucrado en el acoplamiento electromecánico del sarcómero, en miocitos sometidos a sobrecarga de calcio, que conducen a taquicardia ventricular²⁴. Asimismo, en individuos afectados por la forma autosómica dominante de la distrofia muscular de Emery Dreifuss, que se presenta con lipodistrofia parcial familiar, miocardiopatía dilatada,

defectos en la conducción auriculoventricular y fibrilación auricular²⁵, están presentes mutaciones discretas en el gen de la lámina A/C, que codifica las proteínas de la membrana nuclear lámina A y lámina C.

Además, la acumulación de metabolitos intermedios de los ácidos grasos, como las acilcarnitinas de cadena larga, puede producir arritmias cardíacas severas y defectos de la conducción en los neonatos. Los errores innatos de la oxidación de los ácidos grasos (p. ej., deficiencias de la palmitoiltransferasa II de la carnitina, de la proteína trifuncional mitocondrial y de la translocasa de carnitina acilcarnitina) se han documentado en casos inexplicables de muerte infantil súbita o situaciones de alto riesgo de muerte, y en niños con defectos de la conducción o taquicardia ventricular²⁶.

Vasculopatías

Se han identificado defectos genéticos moleculares que subyacen a vasculopatías autosómicas dominantes, como el síndrome de Marfan, la estenosis aórtica supravalvular y el síndrome de Williams, lo que indica la importancia de los defectos en las microfibrillas y en la matriz extracelular en la fisiopatología de estas alteraciones^{27,28}. El síndrome de Marfan se caracteriza por anomalías en los sistemas esquelético, ocular y cardiovascular, que pueden conducir a una muerte prematura debida fundamentalmente a una progresiva dilatación de la raíz aórtica con disección aórtica fatal o insuficiencia aórtica, y está asociado a una elevada mortalidad neonatal secundaria a defectos polivalvulares, con el desarrollo subsiguiente de insuficiencia cardíaca congestiva severa. La mayoría de los casos de síndrome de Marfan con enfermedad cardiovascular presentan mutaciones en el gen de la fibrilina, que son distintas en las diferentes familias. La fibrilina es un constituyente del complejo multiproteínico (que incluye la elastina) presente en el componente microfibrilar de la pared vascular de los grandes vasos. Las mutaciones en el gen que codifica un componente de la matriz extracelular (como la elastina) causan estenosis aórtica supravalvular, caracterizada por una obstrucción resultante de un estrechamiento localizado en la aorta ascendente, y síndrome de Williams, que se presenta con estenosis de las arterias pulmonares y/o sistémicas.

Miocardiopatía

Las mutaciones que producen miocardiopatías en humanos se han identificado también en un amplio espectro de genes nucleares que codifican proteínas contráctiles miocárdicas y proteínas estructurales, enzimas involucradas en el almacenamiento de glucógeno (enfermedades de Pompe y Cori) y degradación de mucopolisacáridos (enfermedad de Fabry), metabolismo lipídico (oxidación beta de los ácidos grasos y defi-

TABLA 2. Defectos genéticos en la miocardiopatía pediátrica

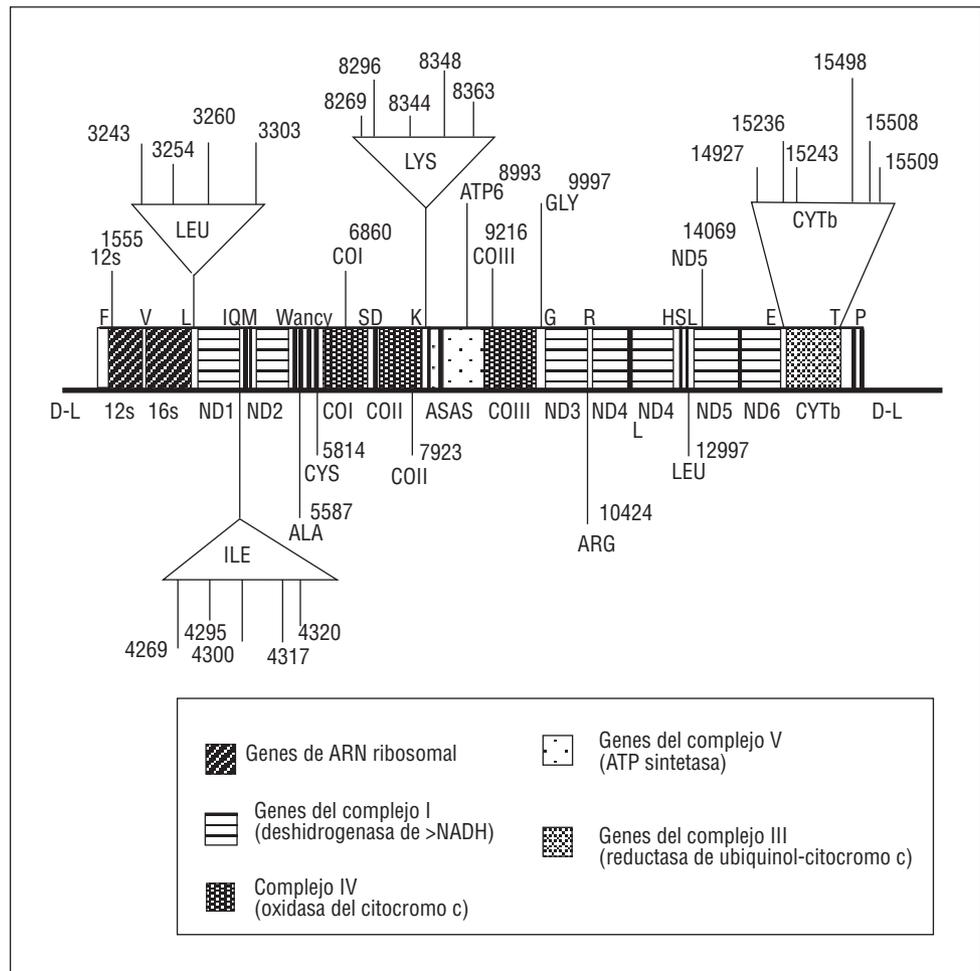
Productos genéticos afectados (<i>locus</i> genético)	Fenotipo cardíaco	Autor y referencia bibliográfica
<i>Proteínas estructurales/contráctiles</i>		
Cadena pesada beta de la miosina (β -MHC)	HCM	Anan R, et al ³³
Cadena pesada alfa de la miosina (α -MHC)	HCM	Berul CI, et al ³²
Cadena ligera esencial de la miosina (MYL3)	HCM	Kabaeva ZT, et al ⁸²
Cadena ligera reguladora de la miosina (MYL2)	HCM	Kabaeva ZT, et al ⁸²
Actina	DCM, HCM	Olson TM, et al ^{34,41}
Tropomiosina alfa (α -TM)	HCM	Thierfelder L, et al ³⁰
Troponina T cardíaca (TNNT2)	HCM	Thierfelder L, et al ³⁰
Troponina I cardíaca (TNNI3)	HCM	Kimura A, et al ³¹
Desmina	DCM	Dalakas MC, et al ⁴²
Sarcoglicano delta (δ -SGC)	DCM	Tsubata S, et al ⁴³
Proteína C que se une a miosina (MYBPC)	HCM	Bonne G, et al ²⁹
Titina (TTN)	HCM	Satoh M, et al ³⁵
Distrofina	DCM (distrofia muscular de Duchenne y Becker)	Beggs AH ³⁹ ; Towbin JA, et al ⁴⁴
DCM ligada al cromosoma X		
<i>Metabolismo y bioenergética</i>		
Proteína trifuncional mitocondrial (MTP)	Arritmias cardíacas, muerte súbita, DCM	Brackett JC, et al ⁸³
Palmitoiltransferasa II de la carnitina (CPTII)	Arritmias cardíacas, muerte súbita, CM	Taroni F, et al ⁸⁴
Deficiencia de la translocasa de carnitina acilcarnitina (CACT)	Arritmias cardíacas, muerte súbita, CM	Yang BZ, et al ⁸⁵
Transporte de carnitina (OCTN2)	HCM, DCM	Nezu J, et al ⁸⁶ ; Tein ⁸⁷
Tafazzina (G4.5)	DCM (Barth)	Olson TM, et al ⁴¹
Metabolismo del Fe ⁺⁺ mitocondrial (frataxina)	HCM (ataxia de Friedreich)	Palau F ¹³ ; Taniike M, et al ⁵¹
Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD)	HCM, muerte súbita	Strauss AW, et al ⁸⁸
Glucosidasa alfa lisosomal (maltasa ácida/almacenamiento de glucógeno)	Preexcitación ventricular, HCM (Pompe)	Zhong N, et al ⁸⁹
Enzima desramificadora del glucógeno (AGL)	HCM (Cori)	Shen JJ y Chen YT ⁹⁰
Galactosidasa alfa (GLA)	HCM (Fabry)	Yoshitama T, et al ⁹¹
Metabolismo mitocondrial de heme (COX15)	HCM fatal precoz	Antonicka H, et al ³⁶
Subunidad delta-2 de la proteincinasa activada por AMP (AMPK)	HCM, defectos en la conducción (Wolff-Parkinson-White)	Gollob MH, et al ³⁸
<i>ADN mitocondrial</i>		
ARN ^{t^{leu}} , ARN ^{t^{lys}} , ARN ^{t^{ile}} , ARN ^{t^{gln}}	HCM (MELAS, MERRF)	Marín-García J ³⁷ ; Wallace DC ⁴⁸
ATP-asa-6	HCM (Leigh)	Pastores GM, et al ⁹²
Deleciones esporádicas de ADN mitocondrial	HCM, defectos en la conducción (KSS)	Holt IJ, et al ⁶⁰

HCM: miocardiopatía hipertrófica; DCM: miocardiopatía dilatada.

ciencia de carnitina), y en genes de ADN tanto nuclear como mitocondrial esenciales para la producción de energía cardíaca (como se muestra en la tabla 2). Tanto la miocardiopatía dilatada como la hipertrófica ocurren en la juventud y pueden tener componentes genéticos familiares, pero la miocardiopatía hipertrófica ha sido caracterizada más extensamente, ya que representa la causa más frecuente de muerte cardíaca súbita en niños y adolescentes¹. La mayor parte de los casos de miocardiopatía hipertrófica exhibe un patrón de transmisión autosómico dominante (con excepción de los casos en los que se producen mutaciones patogénicas de ADN mitocondrial, que se heredan por vía materna). Las mutaciones que causan miocardiopatía hipertrófica se han localizado en más de 10 genes que codifican distintas proteínas sarcoméricas, incluyendo la cadena pesada beta de la miosina (β -MHC), la cadena

pesada alfa de la miosina (α -MHC), la proteína C que se une a miosina, la troponina T cardíaca y la troponina I, la alfa-tropomiosina, las cadenas ligeras de la miosina esenciales y reguladoras, la titina y la alfa-actina cardíaca²⁹⁻⁴⁰. Además, se han detectado defectos específicos en genes involucrados en el metabolismo mitocondrial del heme y del Fe⁺⁺ (p. ej., la frataxina codificada por el núcleo y la COX15)^{13,16}, y en la bioenergética mitocondrial (p. ej., el ARNt y la ATP-asa-6 codificadas por el ADN mitocondrial)³⁷, en pacientes con miocardiopatía hipertrófica (aunque más raramente que las mutaciones sarcoméricas). Además, en un subgrupo de casos de miocardiopatía hipertrófica se han documentado mutaciones en la subunidad reguladora de la proteincinasa activada por AMP (AMPK), un sensor y mediador clave en el metabolismo energético celular³⁸. En conjunto, estos hallazgos sugieren

Fig. 2. Mutaciones patógenas de ADN mitocondrial asociadas con enfermedad pediátrica cardíaca. Representación lineal de los 16.569 pares de bases de la molécula de ADN mitocondrial humana circular que muestra la localización relativa de los 13 genes codificadores de proteínas (ND1-ND6, COI-COIII, cytb y ATP6 y ATP8), los 22 ARNt identificados por sus correspondientes aminoácidos usando códigos de una única letra (F, V, L, I, Q, M, W, A, N, C, Y, S, D, K, G, R, H, S, L, E, T, P), los 2 genes de ARNr (12s y 16s) y de la región del asa D no codificadora (D-L). Se muestra la localización de los nucleótidos y de los genes que contienen las mutaciones patógenas de ADN mitocondrial asociadas a las enfermedades cardíacas pediátricas.



que la depleción energética mitocondrial cardíaca puede ser una causa subyacente de miocardiopatía hipertrófica en algunos pacientes, más que la contracción sarcomérica deprimida, y pueden ser útiles en la comprensión de un número importante de observaciones clínicas de la miocardiopatía hipertrófica, como su heterogeneidad, su inicio y severidad variables y la asimetría de la hipertrofia ventricular.

En la actualidad se estima que el 30%, aproximadamente, de todos los casos de miocardiopatía dilatada es heredado, mientras que el 70% parece ser esporádico. Se han identificado los genes de la miocardiopatía dilatada familiar ligados al cromosoma X (distrofina, *G4.5*)^{39,40} y se han documentado varios genes para la forma autosómica dominante de la miocardiopatía dilatada (actina, desmina, lamina A/C, delta-sarcoglicano)⁴¹⁻⁴³. En los casos de miocardiopatía dilatada ligada al cromosoma X y atribuida a un defecto genético en la distrofina (una proteína del citoesqueleto de gran tamaño asociada al sarcolema), el defecto en la distrofina se manifiesta sólo en los miocitos cardíacos; el lugar de la mutación se localiza principalmente en la región reguladora del promotor del gen de la distrofina, lo que concuerda con su expresión tisular específica⁴⁴.

Las mutaciones en el gen de la distrofina también pueden conducir a las distrofias musculares de Duchenne y Becker, que afectan tanto a la función esquelética como a la cardíaca³⁹. Típicamente, los pacientes con la forma más severa de distrofia de Duchenne carecen de distrofina detectable en los músculos esqueléticos, lo que puede estar causado por mutaciones de delección en los alelos de la distrofina que producen trastornos en el marco de lectura de la traducción, o por mutaciones puntuales específicas que crean codones de finalización. Los pacientes varones con miocardiopatía dilatada ligada al cromosoma X (debida a defectos en la distrofina) tienden a ser asintomáticos en la infancia temprana y desarrollan síncope e insuficiencia cardíaca congestiva rápidamente progresiva en la adolescencia tardía; las niñas afectadas suelen presentar un comienzo más tardío. En la distrofia de Duchenne, la debilidad muscular esquelética está presente en una edad temprana (3-6 años). Con posterioridad, más del 30% de los pacientes desarrolla signos de disfunción cardíaca hacia los 14 años y prácticamente todos los pacientes desarrollan miocardiopatía dilatada a los 18 años.

El síndrome de Barth, una miopatía cardioesquelé-

tica ligada al cromosoma X que cursa con neutropenia y miocardiopatía dilatada, se presenta a menudo en la infancia. La proteína tafazzina, origen del síndrome de Barth, está codificada por el gen *G4.5* y pertenece a la familia de aciltransferasas implicadas en la síntesis de fosfolípidos^{40,45}. Los pacientes que presentan una mutación en *G4.5* tienen unas concentraciones elevadas de ácidos grasos saturados, mientras que los ácidos grasos insaturados y la cardiolipina están significativamente reducidos, lo que afecta a la fluidez y la función de las membranas cardíacas. La displasia arritmogénica del ventrículo derecho es una forma autosómica dominante de miocardiopatía, caracterizada por una degeneración progresiva del miocardio ventricular derecho, arritmias y riesgo elevado de muerte cardíaca, y recientemente ha sido localizada por análisis de ligamiento a diferentes *loci* en varios cromosomas, incluidos el 2, 10, 14 y 17⁴⁶, aunque el defecto genético preciso todavía no ha podido ser determinado.

La miocardiopatía en neonatos y niños también puede deberse a deficiencias de la producción energética, secundarias tanto a defectos genéticos como esporádicos, en un amplio espectro de *loci*^{37,47}. Las alteraciones genéticas en el metabolismo energético que conducen a deficiencias específicas en la oxidación de los ácidos grasos/carnitina o a anomalías en la fosforilación oxidativa también pueden producir fenotipos de miocardiopatía dilatada o hipertrófica, y el incremento en la identificación de estos síndromes ha llevado a sugerir la existencia de una entidad denominada miocardiopatía mitocondrial, que se caracteriza por mitocondrias cardíacas anormales, tanto en número como en estructura o función. Se ha descrito una gran variedad de miocardiopatías mitocondriales en asociación con alteraciones neurológicas, como el síndrome MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios de pseudoictus), el síndrome de MERRF (epilepsia mioclónica y desorganización de las fibras rojas) y el síndrome de Leigh^{37,48}, con mutaciones patogénicas específicas identificadas en varios genes de ADN mitocondrial y que afectan a la función mitocondrial (enumeradas en la fig. 2) y, más recientemente, en genes nucleares involucrados en el ensamblaje de los complejos respiratorios mitocondriales^{36,49}. Estas alteraciones pueden presentarse de forma prematura en la infancia, mientras que otras se manifiestan más tardíamente. También se han descrito defectos en las enzimas y el ADN mitocondrial en casos de miocardiopatía infantil fatal⁵⁰⁻⁵². Estudios moleculares en pacientes con miocardiopatía hipertrófica o dilatada han dado lugar a la identificación de nuevas mutaciones patogénicas de ADN mitocondrial prevalentes en los tejidos cardíacos^{53,54}.

La miocardiopatía mitocondrial puede ocurrir también de forma esporádica. Los agentes que causan

daño en las mitocondrias cardíacas y el ADN mitocondrial, como la adriamicina y el alcohol, pueden originar una miocardiopatía^{55,56}. Se ha demostrado que las mutaciones por delección (esporádicas) generadas somáticamente en el ADN mitocondrial aumentan durante la isquemia miocárdica⁵⁷, y su incremento (aunque globalmente poco abundante) se ha documentado en el corazón con miocardiopatía, probablemente como consecuencia de un incremento del estrés oxidativo^{58,59}. Además, el síndrome de Kearns-Sayre, una alteración neuromuscular que cursa con defectos en la conducción auriculoventricular y miocardiopatía, se asocia comúnmente con abundantes deleciones a gran escala de ADN mitocondrial, cuya generación se cree que tiene lugar de forma espontánea, puesto que raras veces se puede detectarlas en las madres o hermanos⁶⁰.

Por el contrario, la miocardiopatía dilatada que se asocia con deleciones múltiples y abundantes del ADN mitocondrial se ha documentado como un fenotipo distinto debido a defectos genéticos heredados de forma dominante o recesiva⁶¹. Los análisis de ligamiento en familias con deleciones de ADN mitocondrial heredadas de forma dominante han identificado alguna de las múltiples mutaciones específicas en las proteínas que participan en la replicación del ADN mitocondrial (p. ej., el gen *gamma* de la polimerasa de ADN mitocondrial y el gen *Twinkle*, una putativa helicasa mitocondrial) y en el metabolismo nucleotídico mitocondrial (p. ej., la translocasa de los nucleótidos de adenina)⁶².

También se ha documentado la depleción de ADN mitocondrial cardíaco en niños con miocardiopatía aislada, tanto dilatada como hipertrófica^{54,63}. Recientemente se han propuesto varios *loci* nucleares como causa probable de la depleción de ADN mitocondrial, un fenotipo que se identifica en raras ocasiones. En un subgrupo de pacientes (y sus respectivas familias) con depleción de ADN mitocondrial se han identificado mutaciones autosómicas recesivas en factores que pueden desempeñar un papel en el metabolismo nucleotídico mitocondrial como, por ejemplo, la cinasa 2 de la timidina, la fosforilasa de la timidina y la cinasa de la desoxiguanosina⁶². Además, la depleción del ADN mitocondrial cardíaco puede inducirse específicamente por zidovudina, que inhibe tanto la polimerasa de ADN viral como la polimerasa delta de ADN mitocondrial, impidiendo su replicación⁶⁴. Sin embargo, los estudios recientes no confirman que la zidovudina desempeñe un papel causal en el desarrollo de miocardiopatía en niños tratados con ella⁶⁵.

Dianas celulares en la enfermedad cardíaca

Tiene que quedar claro a partir de la discusión anterior que los defectos genéticos que dan lugar a anoma-

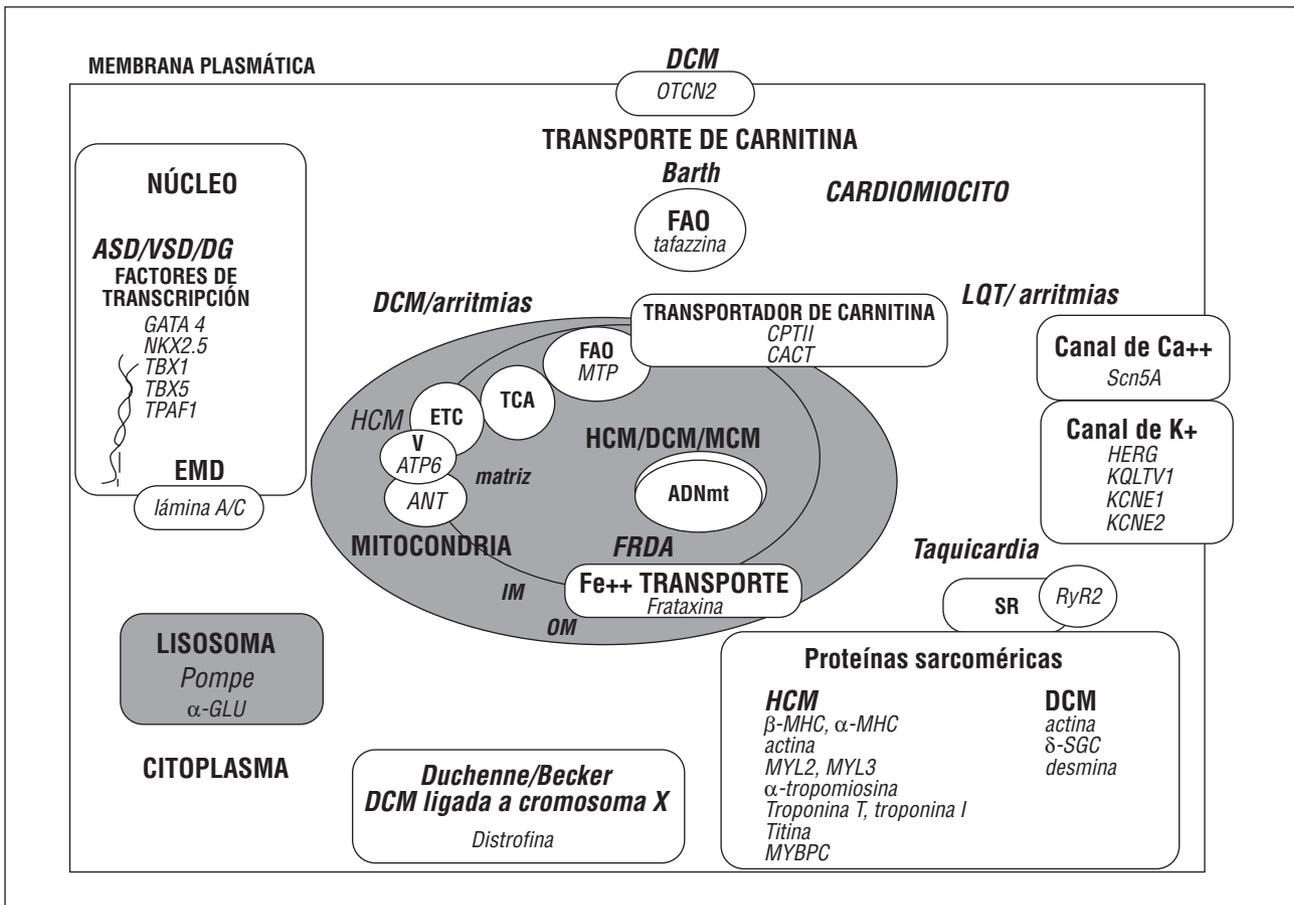


Fig. 3. Localización subcelular en el cardiomiocito de productos de genes defectuosos en la enfermedad cardíaca pediátrica. Los orgánulos, como el núcleo, lisosomas, mitocondrias, sarcómero/retículo sarcoplásmico y membrana plasmática, se muestran en letras más grandes y en negrita. Se indican los compartimentos de la mitocondria, incluyendo la matriz, la membrana externa (OM) y la membrana interna (IM). Los defectos cardíacos asociados a defectos localizados específicamente en cardiomiocitos se indican en cursiva y negrita, incluyendo los defectos septales auriculares y ventriculares (ASD/VSD), el síndrome de DiGeorge (DG), el síndrome de Barth, la enfermedad de Pompe, la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EMD), la distrofia muscular de Duchenne/Becker, la ataxia de Friedreich (FRDA), la taquicardia, el síndrome de QT largo, las arritmias, la miocardiopatía hipertrófica (HCM), la miocardiopatía dilatada (DCM) y la miocardiopatía mitocondrial (MCM). Las vías funcionales se indican en letra más pequeña e incluyen los factores de transcripción, los transportadores de membrana, los intercambiadores y canales, las proteínas sarcoméricas, la oxidación de los ácidos grasos (FAO), el ciclo del ácido cítrico (TCA), la cadena de transporte electrónico (ETC) con el complejo V asociado (V) y la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT). Los productos proteínicos/genes específicos involucrados aparecen en la letra más pequeña. Las abreviaturas utilizadas se explican en la figura 1.

lías cardíacas estructurales y funcionales tienen como diana un grupo de moléculas dentro y fuera del cardiomiocito. Las dianas específicas se localizan en una gran variedad de compartimentos subcelulares que incluyen el núcleo, las mitocondrias, los lisosomas, el citoplasma, el retículo endoplásmico y la membrana plasmática, como se muestra en la figura 3. Además, estas moléculas (ya sean receptores, enzimas, canales o cinasas) desempeñan a menudo múltiples funciones en distintas vías de señalización que interaccionan entre sí y que están involucradas en el ciclo celular, y procesos metabólicos, de desarrollo y funciones fisiológicas. Debido a la estrecha proximidad entre las diversas rutas de señalización, desentrañar los eventos cardíacos resulta altamente informativo (aunque más complejo) y presenta importantes ramificaciones rele-

vantes para los tratamientos terapéuticos dirigidos a dianas específicas.

Diagnóstico molecular: técnicas, limitaciones y avances

Muchos de los defectos genéticos nucleares implicados en las miocardiopatías fueron inicialmente encontrados por análisis de ligamiento en familias afectadas, lo que permitió la identificación posterior de los genes candidatos (y alelos mutantes) por clonamiento posicional y el análisis subsiguiente de la secuencia de nucleótidos. Se ha utilizado una gran variedad de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el polimorfismo de fragmentos de restricción y el polimorfismo de conformación de ca-

TABLA 3. Genes con variantes polimórficas que contribuyen a la enfermedad cardiovascular

Gen afectado (<i>loci</i>)	Función normal	Fenotipo cardíaco asociado	Respuesta farmacológica afectada
Proteína que se une al <i>cassette</i> de ATP (ABC or MDR)	Transporte de lípidos	Enfermedad arterial coronaria	Digoxina
Enzima de conversión de la angiotensina (ECA)	Regulador de renina-angiotensina	Enfermedad arterial coronaria	Inhibidores de la ECA
Receptor betaadrenérgico beta (ADR- β -2)	Receptor neurohormonal	Insuficiencia cardíaca congestiva	Agonistas β_2 adrenérgicos
Apolipoproteína E (APOE)	Transporte de lípidos	Enfermedad arterial coronaria	Estatina
Proteína transportadora del éster de colesterol (CETP)	Transporte de lípidos	Enfermedad arterial coronaria	Estatina
Proteína relacionada con minK (KCNE2/MiRP1)	Canal de potasio	Arritmia cardíaca inducida por antibiótico	Claritromicina
Inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno (PAI-1)	Fibrinólisis intravascular	Infarto de miocardio	ND
Stromelisin-1 (MMP-3)	Metaloproteinasa de matriz	Infarto de miocardio Angina	ND
Trombospondina (TSP-1)	Inhibidor de la angiogénesis	Enfermedad arterial coronaria prematura	ND
Factor de transcripción nuclear (NFATC4)	Factor de transcripción	Hipertrofia cardíaca	ND
Interleucina-6 (IL-6)	Mediador inflamatorio	Infarto de miocardio	ND
Receptor A de la endotelina (ETA)	Vasorregulador	DCM idiopática	ND

ND: no determinado.

dena única, con el fin de rastrear alelos defectuosos a partir del individuo afectado y los miembros de la familia y, de esta forma, poder establecer patrones de herencia. En la mayoría de los casos, la detección de una mutación nueva representa por sí misma una gran promesa para la comprensión del análisis de amplias y múltiples regiones codificadoras (exones) de uno o varios genes candidatos. Además, en los relativamente bien caracterizados casos de rastreo genético de la miocardiopatía hipertrófica familiar, la experiencia general ha sido que cada mutación específica causante de miocardiopatía hipertrófica es rara, lo que cuestiona el concepto de mutaciones comunes, ya que la mayoría de las familias tiene mutaciones nuevas o «particulares». No obstante, la correlación entre el curso clínico y las mutaciones específicas ha demostrado tener gran valor informativo; por ejemplo, las mutaciones específicas de β -MHC la en la miocardiopatía hipertrófica están asociadas a una alta incidencia de muerte súbita, mientras que otro tipo de mutaciones se asocia a un mejor pronóstico. Los avances más recientes en la velocidad y sensibilidad para detectar mutaciones aplicando técnicas analíticas de alto rendimiento, como la cromatografía líquida desnaturalizante de alta presión o la electroforesis capilar, deberían ser capaces de mejorar aún más el uso del análisis genético molecular en el diagnóstico clínico y preclínico, y de proporcionar tratamientos dirigidos específicamente a las alteraciones cardíacas pediátricas. Además, en un futuro próximo, la disponibilidad de la tecnología basada en *chips* genéticos permitirá un rastreo automático y rápido de las mutaciones de ADN nuclear y mitocondrial.

Si bien, por una parte, la disponibilidad de las mo-

dernas técnicas de imagen está siendo de gran ayuda para definir fenotipos cardíacos en niños afectados, por otra, la heterogeneidad genética y la variabilidad intrafamiliar han dificultado enormemente la elucidación molecular precisa de muchos defectos cardíacos, así como la correlación entre el genotipo y el fenotipo cardíacos. Estas dificultades pueden proceder de la implicación de factores poligénicos o multifactoriales que contribuyen a la expresión de defectos genéticos cardíacos específicos, y la existencia de influencias epigenéticas o adquiridas. Se están obteniendo progresos graduales en la definición de estos factores poligénicos y epigenéticos, algunos de los cuales pueden prestarse a un análisis molecular.

Existe una evidencia creciente que apoya la tesis de que el contexto genético en el cual tienen lugar las mutaciones deletéreas puede modular significativamente la expresión de su fenotipo. Se ha establecido de forma sólida la presencia de genes modificadores en el contexto genético capaces de ejercer influencia sobre la expresión fenotípica y la severidad de las anomalías genéticas causantes de la miocardiopatía hipertrófica⁶⁶. La identificación de genes modificadores, que mejorará significativamente la comprensión de los factores de riesgo genéticos, ha sido posible gracias a enfoques genómicos a gran escala que permiten identificar variantes polimórficas que se correlacionan con la severidad de la enfermedad. Los estudios de asociación de polimorfismos de un único nucleótido han identificado varios candidatos a genes modificadores para algunas alteraciones cardíacas. Se ha hallado un gran número de polimorfismos genéticos específicos asociados al infarto de miocardio, la enfermedad arte-

rial coronaria y la miocardiopatía hipertrófica, como se muestra en la tabla 3. Con el incremento de la catalogación de polimorfismos de un único nucleótido, solos o dentro de una región cromosómica de gran tamaño (haplotipos), en las bases de datos compartidas actualmente disponibles, estos *loci* modificadores pueden ser evaluados por sus efectos sobre la predisposición a padecer defectos cardíacos específicos, y pueden tener un gran impacto en la elección de las opciones diagnósticas y terapéuticas.

Utilizando un análisis que abarque el genoma completo para abordar las alteraciones cardiovasculares, se puede proyectar una red de mayor tamaño en la detección de mutaciones asociadas a una enfermedad. Los avances metodológicos más recientes permiten evaluar simultáneamente el perfil completo de los genes expresados en el miocardio afectado utilizando una cantidad de tejido muy limitada, un aspecto muy importante en neonatos y niños. Cabe destacar, entre estos métodos, la determinación del perfil de expresión genético mediante el uso de *microarrays* de ADN. Los *microarrays* son rejillas de ADN construidas artificialmente en las que cada elemento de la rejilla sirve para probar un ARN específico. La expresión génica por análisis de *microarrays* ha demostrado ser una herramienta útil para establecer aspectos fisiopatológicos de una enfermedad mediante la evaluación comprensiva de los genes que presentan una expresión aumentada o disminuida, y puede aplicarse tanto para el diagnóstico clínico como para la evaluación de la respuesta de los pacientes a la terapia.

La asociación entre genes defectuosos y enfermedad cardíaca revelada por análisis genómico debe continuarse con un análisis proteómico, que permita establecer la función y el papel fisiopatológico desempeñado por la proteína mutante, y revelar los moduladores que pueden estar interaccionando. Una vez que se han identificado los genes implicados y sus productos, se puede emplear la secuenciación y el subsiguiente análisis bioinformático para identificar motivos estructurales y funcionales comunes, así como posibles homologías con proteínas conocidas. La potencial interacción funcional de las proteínas (que puede ser un determinante importante del fenotipo cardíaco) puede determinarse posteriormente por análisis de hibridación doble con levadura. Este enfoque ha demostrado ser productivo para establecer que las proteínas de titina mutantes (derivadas de pacientes con miocardiopatía hipertrófica) tenían una afinidad de unión reducida para otras proteínas sarcoméricas específicas (p. ej., la α -actinina) y para caracterizar las interacciones sinérgicas de los factores de transcripción NKX2.5 y TBX5 en el desarrollo cardíaco temprano⁶⁷.

Análisis transgénico

El papel de un gen particular y de su producto para

determinar fenotipos cardíacos específicos puede confirmarse posteriormente *in vivo* utilizando la técnica de ablación génica o *knock-out*, que se ha introducido sobre todo en ratones transgénicos. Así, por ejemplo, los ratones que contienen alelos nulos para genes involucrados en la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos (p. ej., la proteína trifuncional mitocondrial), en la transcripción de ADN mitocondrial y en la bioenergética (p. ej., el factor A de transcripción mitocondrial), y en los genes que codifican la frataxina mitocondrial, desarrollan rápidamente una disfunción cardíaca severa y una miocardiopatía dilatada que concuerda con los hallazgos clínicos de miocardiopatía asociada a mutaciones específicas en una variedad de *loci* implicados en la función bioenergética mitocondrial⁶⁸⁻⁷⁰. Esta técnica ha demostrado también tener un gran valor informativo para establecer la importancia del *TBX1* en la etiología del síndrome de DiGeorge/velocardiofacial. Los ratones heterocigotos para un único alelo nulo de *TBX1* exhiben una alta incidencia de anomalías cardíacas en el tracto de salida, así como otras anomalías del desarrollo comunes al síndrome de DiGeorge⁷¹.

Anomalías fetales: análisis molecular

La reconstrucción tridimensional de los defectos cardíacos mediante ultrasonidos, rayos X o resonancia magnética ha mejorado drásticamente el diagnóstico y las estrategias terapéuticas de las enfermedades cardíacas. La mayoría de las formas de presentación de las enfermedades cardíacas congénitas se puede detectar *in utero*. Después del diagnóstico de enfermedad cardíaca congénita, se recomienda una posterior evaluación de las posibles anomalías extracardíacas y cromosómicas, puesto que se han encontrado hasta en un 62 y 38%, respectivamente, de los casos. La orientación basada en la evaluación prenatal puede proporcionar información realista acerca de la incidencia, diagnóstico y pronóstico de los defectos cardíacos fetales. El diagnóstico prenatal de las malformaciones cardíacas congénitas y sus correspondientes defectos moleculares (p. ej., las microdeleciones de 22q11 en el síndrome de DiGeorge y 7q en el síndrome de Williams), que son detectables por técnicas citogenéticas y moleculares tras la amniocentesis, ha demostrado ser una herramienta básica en el manejo de malformaciones que ponen en peligro la vida del neonato, como la transposición de las grandes arterias o el síndrome de la hipoplasia del hemicardio izquierdo.

Enfermedades cardíacas adquiridas en los niños

Las enfermedades cardíacas adquiridas en neonatos y niños incluyen la enfermedad de Kawasaki, la enfermedad cardíaca reumática aguda y crónica, la endocarditis infecciosa y la miocarditis. La tecnolo-

gía genética molecular ha sido aplicada de forma limitada en el análisis de estas enfermedades y podría mejorar el diagnóstico clínico. La enfermedad de Kawasaki, una vasculitis aguda autolimitante de la infancia temprana, es la principal causa de enfermedad cardíaca adquirida en los niños de Estados Unidos y Japón⁷². Su etiología sigue sin ser conocida, y el extenso análisis molecular que se ha llevado a cabo ha sido incapaz de detectar hasta ahora la participación de virus o bacterias. Si no se trata, el 25% de los niños afectados desarrollan aneurismas de las principales arterias coronarias. Puesto que el tratamiento es normalmente efectivo cuando se administra en los primeros 10 días de la enfermedad (para prevenir la implicación de las arterias coronarias), su diagnóstico supone un reto para el cardiólogo pediátrico, que debe distinguir entre la enfermedad de Kawasaki y otras enfermedades en un plazo de tiempo relativamente limitado. Mientras que los ultrasonidos intravasculares presentan la ventaja de mejorar la evaluación de las arterias coronarias, los marcadores moleculares de la enfermedad potencialmente identificables mediante análisis por *microarrays*, tienen a su favor la gran baza de confirmar el diagnóstico.

Los análisis inmunológicos y moleculares han implicado a agentes virales (la mayoría de las veces, virus *Coxsackie* del grupo B) y a respuestas autoinmunitarias aberrantes en la patogenia de la miocarditis pediátrica, que en algunos casos puede evolucionar a miocardiopatía dilatada. Estudios moleculares recientes en los que se ha utilizado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa también han identificado adenovirus además de enterovirus en el miocardio de niños con miocarditis y miocardiopatía dilatada⁷³. Además, aunque no se ha podido elucidar todavía los mecanismos patogénicos precisos de la fiebre reumática inducida por estreptococos ni de la enfermedad cardíaca reumática, el análisis molecular ha aportado una información valiosa sobre aspectos autoinmunitarios esenciales de la enfermedad, y un análisis posterior de ligamiento/asociación génica podría proporcionar una información clave sobre los factores genéticos implicados en la susceptibilidad del huésped. Los datos moleculares también pueden ser útiles para idear estrategias de manejo de las anomalías cardiovasculares asociadas con infecciones adquiridas, como la hipertensión pulmonar, que puede presentarse asociada a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana⁷⁴.

Farmacogenómica y cardioprotección

La comprensión de la enfermedad cardiovascular pediátrica en el ámbito genómico facilita una estratificación más efectiva de las subclases de pacientes y optimiza la terapia específica para cada paciente.

La farmacogenómica y la farmacogenética son campos relacionados que ofrecen la promesa de mejorar el desarrollo de medicamentos y la capacidad de adaptar la terapia farmacológica a las necesidades de cada individuo para metabolizar los fármacos, algo que está determinado sólo en parte por la edad y está influido por la enfermedad, los factores ambientales (p. ej., la dieta), las medicaciones concurrentes y los variables factores genéticos que determinan el transporte, el metabolismo y las dianas de los fármacos. Por ejemplo, un subgrupo de polimorfismos de un único nucleótido que se ha identificado en genes humanos, como el receptor betaadrenérgico y la enzima de conversión de la angiotensina, se ha asociado a cambios significativos en el metabolismo o en los efectos de las medicaciones utilizadas para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular, y puede tener valor informativo para predecir la respuesta clínica (tabla 3)⁷⁵. La terapia individualizada puede ser particularmente importante para establecer las dosis de los fármacos y su eficacia en niños con enfermedad cardiovascular una población para la que la farmacocinética se ha mostrado poco definida y, a menudo, impredecible. La caracterización fenotípica inmunológica y genética de pacientes pediátricos puede proporcionar una estrategia terapéutica más efectiva, ya sea inhibiendo o estimulando las respuestas específicas.

Un creciente número de observaciones indica que puede obtenerse cardioprotección por preconditionamiento isquémico o mediante intervención farmacológica (p. ej., con nicorandil y diazóxido), y que estas maniobras pueden ser útiles como estrategias para la protección de órganos y tejidos en la cardiopatía isquémica y en las lesiones hipóxicas, aunque en el momento actual la disponibilidad de datos que confirmen la respuesta cardioprotectora en niños es limitada. El trabajo exhaustivo que se ha llevado a cabo utilizando modelos animales ha establecido que las bases moleculares implicadas en los mecanismos de cardioprotección incluyen toda una red de rutas de transducción de señales que están mediadas por receptores de la superficie celular, la activación y translocación subcelular de proteincinasas específicas (p. ej., la PKC- ϵ , la cinasa MAPp38 y la cinasa JUN), y la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP sarcolemales y mitocondriales⁷⁶. Se ha encontrado que los niños con defectos cardíacos cianóticos e hipoxia tienen activadas ciertas proteincinasas miocárdicas como la PKC- ϵ , la cinasa MAPp38 y la cinasa JUN, que no están presentes en niños con defectos acianóticos ni en individuos normales, lo que indica que la vía de transducción cardioprotectora está, por lo menos parcialmente, operativa en niños hipóxicos⁷⁷. También se ha demostrado la cardioprotección asociada a proteínas de estrés y a señalización mitocondrial durante breves períodos de hipotermia previos a una lesión isquémica prolonga-

da⁷⁸, y este fenómeno puede tener relación con la eficacia demostrada de la hipotermia en la taquicardia ectópica nodal⁷⁹. Los trabajos de investigación futuros que se realicen en esta área pueden poner de manifiesto moléculas potenciales que sirvan de diana (p. ej., receptores, cinasas de señalización o canales) para intervenciones farmacológicas altamente específicas. Sin embargo, conviene ser cautos y tener presente que este proceso puede tardar y requerirá una comprensión mayor de la red de vías que interaccionan entre sí. A pesar de los recientes logros en la identificación de los defectos genéticos y de señalización precisos causantes de arritmias cardíacas, el desarrollo de fármacos efectivos (como bloqueadores específicos de canales iónicos), que pueden reducir sustancialmente la mortalidad asociada a alteraciones arrítmicas severas, ha demostrado tener un éxito sorprendentemente pequeño, lo que pone de relieve la complejidad del circuito cardíaco y la multiplicidad de factores de riesgo, causales y genotípicos, implicados en el desarrollo de los fenotipos patológicos⁸⁰.

FRONTERAS FUTURAS

A pesar de los significativos avances en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cardíacas en los niños, siguen sin determinarse muchos aspectos fundamentales relacionados con los mecanismos básicos subyacentes y su fisiopatología. Los grandes adelantos en la tecnología genética molecular empiezan ahora a aplicarse a estudios de enfermedades cardiovasculares, lo que permite establecer los mapas cromosómicos e identificar los numerosos genes que pueden estar implicados en la etiología primaria o actuar como factores de riesgo en estas anomalías. Las siguientes áreas de investigación se presentan como muy prometedoras:

1. Como nuestra comprensión del desarrollo cardíaco y vascular se encuentra en sus inicios, la identificación de nuevos genes involucrados en la organogénesis cardíaca y el desarrollo vascular podrá servir de base para entender los mecanismos por los que los defectos genéticos congénitos específicos pueden generar los correspondientes fenotipos cardíacos. La bioinformática puede ser empleada para explorar bases de datos disponibles mediante las técnicas genéticas inversas utilizadas habitualmente, lo que permitirá la clonación subsiguiente de nuevos genes/ADNc de interés, y facilitará la posterior caracterización de patrones espaciales-temporales de expresión génica específica en el embrión en desarrollo (usando la hibridación *in situ*).

2. Los mecanismos que gobiernan la especificación temprana de las cámaras cardíacas en el tubo cardíaco en desarrollo no se han podido delinear hasta el momento, pero se cree que incluyen una nueva vía de se-

ñalización célula a célula entre las células que migran, y la puesta en marcha de programas de expresión génica específicos para cada cámara, mediados por factores específicos de transcripción y factores de crecimiento, como la proteína morfogenética del hueso. Las áreas de estudio futuro se van a centrar en la elucidación del papel de las moléculas de señalización (como el WNT), usando modelos de genes *knock-out* condicionales (en contextos genéticos diferentes), y abordando su interacción con factores críticos de transcripción como el dHAND, NKX2.5, GATA4 y TBX. Otros enfoques similares pueden aportar información sobre el origen del sistema de conducción cardíaco y pueden ayudar a descifrar cuál es la participación de los sistemas de señalización en las células endoteliales para la formación vascular, centrándose en la interacción entre el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiopoyetina, el factor transformador del crecimiento (TGF) y la vía de Notch.

3. Otra área crítica de investigación es la identificación de los reguladores moleculares que controlan la proliferación de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos son mitóticamente activos durante la embriogénesis y suelen detener su proliferación poco después del nacimiento. La comprensión de las bases moleculares de la proliferación de los cardiomiocitos puede tener un gran impacto en nuestras tentativas clínicas de reparar el tejido cardíaco lesionado. Se puede investigar los mecanismos de la regulación del crecimiento celular mediante una comparación cuidadosa de los perfiles de expresión génica en miocitos embrionarios y posnatales, así como generando líneas celulares de miocitos en cultivo que tengan la capacidad de responder a inductores de la proliferación. Como alternativa, se puede utilizar el trasplante celular como estrategia para aumentar el número de miocitos en corazones isquémicos o enfermos. Un estudio reciente ha demostrado que la inyección en el corazón isquémico de una subpoblación de células madre adultas de origen cardíaco fue capaz de reconstituir completamente el miocardio diferenciado, y que las células inyectadas se diferenciaron en forma de cardiomiocitos y de vasos sanguíneos nuevos⁸¹. Sin embargo, será preciso hacer nuevas investigaciones para definir las condiciones óptimas necesarias para la diferenciación y la proliferación de los cardiomiocitos, y para la integración funcional completa de las células madre en el miocardio; asimismo, habrá que investigar la capacidad de las células madre trasplantadas para reparar defectos en el corazón de los niños. En todo este proceso será muy importante aclarar si las anomalías cardíacas severas, como las miocardiopatías (p. ej., la miocardiopatía dilatada), la enfermedad de Kawasaki con daño miocárdico o la displasia arritmogénica del ventrículo derecho, pueden ser rectificadas mediante trasplante de células madre.

Llegar a comprender las consecuencias cardiovasculares de las anomalías en la función y expresión génicas puede conducir, finalmente, al desarrollo de estrategias terapéuticas específicas, mejorar el manejo de las enfermedades infantiles que cursan con alteraciones cardíacas congénitas o adquiridas y reemplazar las modalidades terapéuticas menos efectivas que se dirigen meramente a rectificar los defectos cardíacos estructurales y a mejorar su función de manera temporal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maron BJ, Moller JH, Seidman CE, Vincent GM, Dietz HC, Moss AJ, et al. Impact of laboratory molecular diagnosis on contemporary diagnostic criteria for genetically transmitted cardiovascular diseases: hypertrophic cardiomyopathy, long-QT syndrome, and Marfan syndrome. *Circulation* 1998;98:1460-71.
2. Benson DW. Advances in cardiovascular genetics and embryology: role of transcription factors in congenital heart disease. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:497-500.
3. Srivastava D. HAND proteins: molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9:11-8.
4. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999;104:1567-73.
5. Garg V, Kathiriyi IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 2003;424:443-7.
6. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998;281:108-11.
7. Jay PY, Berul CI, Tanaka M, Ishii M, Kurachi Y, Izumo S. Cardiac conduction and arrhythmia: insights from Nkx2.5 mutations in mouse and humans. *Novartis Found Symp* 2003;250:227-38.
8. Zhao F, Weismann CG, Satoda M, Pierpont ME, Sweeney E, Thompson EM, et al. Novel TFAP2B mutations that cause Char syndrome provide a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2001;69:695-703.
9. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 2001;106:709-21.
10. Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. Clinical and molecular genetics of Alagille syndrome. *Curr Opin Pediatr* 1999;11:558-64.
11. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;29:465-8.
12. Legius E, Schrander-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns JP. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J Med Genet* 2002;39:571-4.
13. Palau F. Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis. *Int J Mol Med* 2001;7:581-9.
14. Korade-Mirnics Z, Tarleton J, Servidei S, Casey RR, Gennarelli M, Pegoraro E, et al. Myotonic dystrophy: tissue-specific effect of somatic CTG expansions on allele-specific DMAHP/SIX5 expression. *Hum Mol Genet* 1999;8:1017-23.
15. Strauss AW. The molecular basis of congenital cardiac disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 1998;1:179-88.
16. Marino B, Digilio MC. Congenital heart disease and genetic syndromes: specific correlation between cardiac phenotype and genotype. *Cardiovasc Pathol* 2000;9:303-15.
17. Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, et al. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics* 1997;43:267-77.
18. Giglio S, Graw SL, Gimelli G, Pirola B, Varone P, Voullaire L, et al. Deletion of a 5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. *Circulation* 2000;102:432-7.
19. Wang DW, Yazawa K, George AL Jr, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na⁺ channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13200-5.
20. Towbin JA, Wang Z, Li H. Genotype and severity of long QT syndrome. *Drug Metab Dispos* 2001;29:574-9.
21. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;392:293-6.
22. Bezzina C, Veldkamp MW, Van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, et al. A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res* 1999;85:1206-13.
23. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;102:1178-85.
24. Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B, et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;103:485-90.
25. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999;21:285-8.
26. Bonnet D, Martin D, De Lonlay P, Villain E, Jouvet P, Rabier D, et al. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation* 1999;100:2248-53.
27. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991;352:337-9.
28. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, et al. Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 1993;5:11-6.
29. Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, et al. Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1995;11:438-40.
30. Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, et al. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994;77:701-12.
31. Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, et al. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1997;16:379-82.
32. Berul CI, Christe ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG, Mendelsohn ME. Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in alpha MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest* 1997;99:570-6.
33. Anan R, Greve G, Thierfelder L, Watkins H, McKenna WJ, Solomon S, et al. Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1994;93:280-5.
34. Olson TM, Doan TP, Kishimoto NY, Whitby FG, Ackerman MJ, Fananapazir L. Inherited and de novo mutations in the cardiac ac-

- tin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1687-94.
35. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:411-7.
 36. Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, et al. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2003;72:101-14.
 37. Marín-García J, Goldenthal MJ. La mitocondria y el corazón. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:1293-310.
 38. Gollob MH, Green MS, Tang AS, Gollob T, Karibe A, Ali Hassan AS, et al. Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N Engl J Med* 2001;344:1823-31.
 39. Beggs AH. Dystrophinopathy, the expanding phenotype. Dystrophin abnormalities in X-linked dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997;95:2344-7.
 40. D'Adamo P, Fassone L, Gedeon A, Janssen EA, Bione S, Bolhuis PA, et al. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *Am J Hum Genet* 1997;61:862-7.
 41. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998;280:750-2.
 42. Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N Engl J Med* 2000;342:770-80.
 43. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, et al. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000;106:655-62.
 44. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 1993;87:1854-65.
 45. Neuwald AF. Barth syndrome may be due to an acyltransferase deficiency. *Curr Biol* 1997;7:465-6.
 46. Rampazzo A, Beffagna G, Nava A, Occhi G, Bauce B, Noiato M, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1 (ARVD1): confirmation of locus assignment and mutation screening of four candidate genes. *Eur J Hum Genet* 2003;11:69-76.
 47. Kelly DP, Strauss AW. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 1994;330:913-9.
 48. Wallace DC. Diseases of mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 1992;61:1175-212.
 49. Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, et al. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 1999;23:333-7.
 50. Tanaka M, Ino H, Ohno K. Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. *Lancet* 1990;336:1452.
 51. Taniike M, Fukushima H, Yanagihara I, Tsukamoto H, Tanaka J, Fujimura H, et al. Mitochondrial tRNA^{Ile} mutation in fatal cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:47-53.
 52. Silvestri G, Santorelli FM, Shanske S, Whitley CB, Schimmenti LA, Smith SA, et al. A new mtDNA mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mutat* 1994;3:37-43.
 53. Marín-García J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME. The complete sequence of mtDNA genes in idiopathic dilated cardiomyopathy shows novel missense and tRNA mutations. *J Card Fail* 2000;6:321-9.
 54. Marín-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Pierpont ME. Biochemical and molecular basis for mitochondrial cardiomyopathy in neonates and children. *J Inher Metab Dis*. 2000; 23:625-33.
 55. Serrano J, Palmeira CM, Kuehl DW, Wallace KB. Cardiospecific and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:201-5.
 56. Schoppet M, Maisch B. Alcohol and the heart. *Herz* 2001;26:345-52.
 57. Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res* 1992;275:169-80.
 58. Marín-García J, Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Fricker FJ, Lipshultz SE, et al. Specific mitochondrial DNA deletions in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 1996;31:306-13.
 59. Li YY, Hengstenberg C, Maisch B. Whole mitochondrial genome amplification reveals basal level multiple deletions in mtDNA of patients with dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:211-8.
 60. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of mtDNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988;331:717-9.
 61. Carozzo R, Hirano M, Fromenty B, Casali C, Santorelli FM, Bonilla E, et al. Multiple mtDNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogeneses. *Neurology* 1998;50:99-106.
 62. Zeviani M, Spinazzola A, Carelli V. Nuclear genes in mitochondrial disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:262-70.
 63. Marín-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ, Pérez-Atayde A. Cardiac mitochondrial dysfunction and DNA depletion in children with hypertrophic cardiomyopathy. *J Inher Metab Dis* 1997;20:674-80.
 64. Lewis W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Med* 1995;1:417-22.
 65. Lipshultz SE, Easley KA, Orav EJ, Kaplan S, Starc TJ, Bricker JT, et al. Absence of cardiac toxicity of zidovudine in infants. Pediatric Pulmonary and Cardiac Complications of Vertically Transmitted HIV Infection Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:759-66.
 66. Marian AJ. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:242-52.
 67. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 2001;28:276-80.
 68. Wang J, Wilhelmsson H, Graff C, Li H, Oldfors A, Rustin P, et al. Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* 1999;21:133-7.
 69. Ibdah JA, Paul H, Zhao Y, Binford S, Salleng K, Cline M, et al. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J Clin Invest* 2001;107:1403-9.
 70. Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, et al. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 2001;27:181-6.
 71. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, et al. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 2001;104:619-29.
 72. Singh GK. Kawasaki disease: an update. *Indian J Pediatr* 1998;65:231-41.
 73. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction: evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:466-72.
 74. Cea-Calvo L, Escribano Subias P, Tello de Meneses R, Lazaro Salvador M, Gómez Sánchez MA, Delgado Jiménez JF, et al. Tratamiento de la hipertensión pulmonar asociada a la infección por VIH con treprostinil. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:421-5.
 75. Daley GQ, Cargill M. The heart SNPs a beat: polymorphisms in candidate genes for cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:60-6.
 76. O'Rourke B. Myocardial KATP channels in preconditioning.

- Circulation Res 2000;87:845-55.
77. Rafiee P, Shi Y, Kong X, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Litwin SB, et al. Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. *Circulation* 2002;106:239-45.
 78. Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Hu YJ, Lupinetti FM, et al. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am J Physiol* 1998; 274:H786-93.
 79. Mosquera Pérez I, Rueda Núñez F, Medrano López C, Portela Torión F, Zavanella Botta C, Castro Beiras A. Tratamiento mediante hipotermia de la taquicardia ectópica de la unión tras cirugía cardíaca infantil. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:510-4.
 80. Sanguinetti MC, Bennett PB. Antiarrhythmic drug target choices and screening. *Circ Res* 2003;93:491-9.
 81. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-76.
 82. Kabaeva ZT, Perrot A, Wolter B, Dietz R, Cardim N, Correia JM, et al. Systematic analysis of the regulatory and essential myosin light chain genes: genetic variants and mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2002;10:741-8.
 83. Brackett JC, Sims HF, Rinaldo P, Shapiro S, Powell CK, Bennett MJ, et al. Two alpha subunit donor splice site mutations cause human trifunctional protein deficiency. *J Clin Invest* 1995; 95:2076-82.
 84. Taroni F, Verderio E, Fiorucci S, Cavadini P, Finocchiaro G, Uziel G, et al. Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8429-33.
 85. Yang BZ, Mallory JM, Roe DS, Brivet M, Strobel GD, Jones KM, et al. Carnitine/acylcarnitine translocase deficiency (neonatal phenotype): successful prenatal and postmortem diagnosis associated with a novel mutation in a single family. *Mol Genet Metab* 2001;73:64-70.
 86. Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* 1999;21:91-4.
 87. Tein I. Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:147-69.
 88. Strauss AW, Powell CK, Hale DE, Anderson MM, Ahuja A, Brackett JC, et al. Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10496-500.
 89. Zhong N, Martiniuk F, Tzall S, Hirschhorn R. Identification of a missense mutation in one allele of a patient with Pompe disease, and use of endonuclease digestion of PCR-amplified RNA to demonstrate lack of mRNA expression from the second allele. *Am J Hum Genet* 1991;49:635-45.
 90. Shen JJ, Chen YT. Molecular characterization of glycogen storage disease type III. *Curr Mol Med* 2002;2:167-75.
 91. Yoshitama T, Nakao S, Takenaka T, Teraguchi H, Sasaki T, Kodama C, et al. Molecular genetic, biochemical, and clinical studies in three families with cardiac Fabry's disease. *Am J Cardiol* 2001;87:71-5.
 92. Pastores GM, Santorelli F, Shanske S, Gelb B, Fyfe B, Wolfe D, et al. Leigh syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in an infant with a mitochondrial point mutation (T8993G). *Am J Med Genet* 1994;50:265-71.