

# APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y FORENSE DE LA MUERTE SÚBITA CARDÍACA.

ALLEGUE C<sup>1,2</sup>, BLANCO-VEREA A<sup>1,2</sup>, GIL R<sup>1,2</sup>, SANTORI M<sup>1,2</sup>, CARRACEDO A<sup>1</sup>, BRION M<sup>1,2</sup>

## RESUMEN

En el desarrollo de la muerte súbita cardíaca (MSC) están implicadas un amplio número de patologías fenotípica y genotípicamente heterogéneas, que pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: miocardiopatías estructurales y desórdenes arritmogénicos. Se han descrito un gran número de mutaciones en un elevado -y creciente- número genes implicados en el desarrollo de dichas patologías. Con este estudio nos planteamos el estudio genético de una cohorte de casos de muerte súbita cardíaca y de familiares de primer y segundo orden.

**PALABRAS CLAVE:** Muerte súbita cardíaca, Miocardiopatía hipertrófica, Síndrome de QT largo, genética, mutaciones.

## ABSTRACT

There have been described many different diseases both phenotypically and genotypically heterogenic which are implicated in sudden cardiac death event development. These pathologies can be classified in two main groups: structural cardiomyopathies and arrhythmogenic disorders. Many different mutations have been described in a large number of genes, making difficult the genetic study. This study shows the results obtained in the genetic screening in sudden cardiac death cases and in first and second degree relatives.

**KEY WORDS:** Sudden Cardiac Death, Hypertrophic Cardiomyopathy, Long QT Syndrome, Genetics, Mutations.

**CONTACTO:** maria.brion@usc.es

## INTRODUCCIÓN

Se considera muerte súbita (MS) aquella muerte natural que tiene lugar de manera rápida e inesperada en individuos aparentemente sanos y en la cual la pérdida de las funciones vitales ocurre instantáneamente o en un breve intervalo de tiempo desde el inicio de los síntomas. La definición más aceptada considera la muerte súbita como una muerte inesperada que ocurre 1 hora después de haber empezado los síntomas o bien 24 horas después de haber sido vista la víctima por última vez en buen estado de salud si se trata de una muerte que no ha sido presenciada. Las muertes no presenciadas, por ejemplo las que tienen lugar durante el sueño, suponen aproximadamente el 40% de los casos<sup>1</sup>. En muchas ocasiones estas muertes sobrevienen

sin asistencia médica e incluso sin testigos por lo que son consideradas muertes sospechosas de modo que se debe practicar una autopsia médico-legal. Una vez finalizada ésta y descartado el origen violento en cualquiera de sus modalidades (accidental, suicidio, homicidio...), se confirma que la causa del fallecimiento es de origen natural, consecuencia, en muchos casos, de una trágica complicación de diversas patologías clínicas. Son varios los intervalos de tiempo propuestos en que la muerte se considera muerte súbita: varían desde los 15 minutos a las 24 horas<sup>2,3</sup>, siendo el de 1 hora y el de 6 horas los más utilizados, principalmente en los trabajos de muerte súbita cardíaca. Tras excluir causas extra cardíacas al concluir la autopsia médico-legal, la muerte súbita se considera Muerte Súbita Cardíaca (MSC), que puede ser derivada

1 Grupo de Medicina Xenómica, Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro. Universidade de Santiago de Compostela.

2 Grupo de genética de enfermedades oftalmológicas y cardiovasculares. Instituto de Investigaciones Sanitarias (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS).

de mecanismos arrítmicos o de anomalías estructurales que comprometen la función mecánica del corazón. Además, en la práctica clínica, se considera súbita aquella muerte causada por un daño cerebral irreversible pese a haber sido recuperada de un paro cardíaco fulminante<sup>4</sup>. En el desarrollo de la muerte súbita cardíaca (MSC) están implicadas un amplio número de patologías que se caracterizan por presentar una gran heterogeneidad fenotípica y genotípica. Supone un grave problema de salud que afecta, en un elevado número de casos, a individuos jóvenes aparentemente sanos. A grandes rasgos, las diversas patologías que subyacen tras la MSC pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: miocardiopatías estructurales (en las que se puede detectar algún hallazgo morfológico en el corazón, que explique el episodio de muerte súbita, recuperada o no) y desórdenes arritmogénicos (en los que no se detecta malformación cardíaca ya que la muerte tiene lugar debido a un fallo arritmogénico fatal). Se han descrito un gran número de mutaciones en un elevado -y creciente- número genes implicados en el desarrollo de dichas patologías.

El principal objetivo de este estudio es conocer las causas genéticas implicadas en la muerte súbita cardíaca, a fin de determinar el éxito del estudio genético tras la autopsia médico legal para determinar la causa de muerte y para prevenir futuras muertes súbitas en la familia

## MATERIAL Y MÉTODOS

Ha sido desarrollada una estrategia de detección de variantes genéticas descritas en bibliografía científica y en bases de datos, localizadas en los principales genes implicados en el desarrollo de la Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MCH)<sup>5</sup> y el Síndrome de QT largo (SQTL)<sup>6</sup>. La detección de dichas variantes se lleva a cabo de forma rápida y efectiva por medio de la plataforma de genotipado de alto rendimiento Sequenom MassARRAY® System

(Sequenom Inc.). La detección de variantes genéticas descritas como implicadas en el desarrollo de MCH se lleva a cabo en 16 genes, en su mayoría codificantes de proteínas sarcoméricas. Actualmente se analizan 680 variantes genéticas descritas; la detección de variantes genéticas implicadas en el desarrollo del SQTL y Síndrome de Brugada (SBr) se desarrolla en los tres principales genes implicados, los cuales codifican proteínas de los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Se analizan un total de 433 variantes genéticas descritas asociadas al desarrollo del SQTL y SBr. Además, llevamos a cabo la secuenciación directa de la región codificante de los genes KCNQ1 y KCNH2 (*Gene Bank*: AF000571 y U04270 respectivamente) -que codifican, respectivamente, las proteínas Kv7.1 y Kv11.1 del canal de K<sup>+</sup>- a fin de detectar nuevas variantes genéticas potencialmente causales del desarrollo del SQTL. Las variantes genéticas detectadas en la plataforma de genotipado de alto rendimiento fueron confirmadas por secuenciación directa. La confirmación de éstas así como la secuenciación directa de las regiones codificantes de los genes KCNQ1 y KCNH2 se llevan a cabo mediante el kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* y la detección se lleva a cabo por un secuenciador 3730xl, ambos de *Applied Biosystems*.

## MUESTRAS

Se han estudiado un total de 106 muestras que nos fueron enviadas de institutos de medicina legal de distintas regiones de España y de diversos centros hospitalarios españoles. Se trata de muestras de sangre o tejido de:

- 37 casos de muerte súbita cardíaca recogidos tras la autopsia
- 12 casos de muertes súbitas recuperadas
- 57 familiares de primer grado de casos MSC, de los que no se dispone de muestra del individuo fallecido (excepto en dos casos).

El ADN es extraído de las muestras según protocolos diferentes en función del tipo de muestra enviada. Así, el ADN extraído a partir de sangre periférica de casos clínicos se lleva a cabo según un kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation)*; la sangre recogida en autopsia y la extracción de ADN a partir de tejido congelado se lleva a cabo mediante un protocolo estándar con fenol-cloroformo; la extracción de ADN de tejido embebido en parafina se lleva a cabo previa digestión con proteinasa K seguida de una purificación mediante centrifugación y el uso de filtros comerciales dispositivos de *Amicon Ultra, Millipore*.

Las muestras fueron añadidas en la estrategia de detección de variantes adecuada a cada caso en particular en función de la historia clínica o informe forense que se nos proporcionó que incluía, en alguno de los casos, las circunstancias en que tuvo lugar la muerte. Así, un total de 53 muestras se analizaron en la estrategia de MCH; 62 muestras se analizaron para KCNQ1; 63 para KCN2 y 66 para SCN5A. En aquellas muestras incluidas en el estudio de SQTL en que no se detectó variante se llevó a cabo la secuenciación directa de KCNQ1 y KCN2

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cabe destacar que en un 71% de los casos de muerte súbita estudiados se trata de varones. Pese a que no se dispone de información sobre las circunstancias de la muerte en un número elevado de muestras, 9 de estas muertes tuvieron lugar en reposo o durante el sueño y 15 durante la realización de alguna actividad bien durante el trabajo, durante la conducción de un vehículo o bien durante o tras práctica deportiva.

Los resultados de este estudio genético se han estructurado en dos apartados; un primer apartado en que se muestran los resultados

obtenidos en muestras con historia personal de MSC y un segundo apartado con los resultados del estudio genético de individuos con historia familiar de MSC.

## I. RESULTADOS DEL ESTUDIO GENÉTICO EN MUESTRAS DE INDIVIDUOS CON HISTORIA PERSONAL DE MSC.

De los 106 individuos incluidos en este estudio, 49 presentaban historia personal de MSC (37 casos de individuos fallecidos y 12 casos de individuos recuperados). De éstos, se ha detectado las variantes genéticas posiblemente responsable del episodio de MSC en 4 de los casos. En la tabla 1 se recogen los resultados obtenidos para este grupo de muestras. Las variantes detectadas pueden ser analizadas en los familiares de primer y segundo orden a fin de aplicar un tratamiento preventivo y evitar un nuevo episodio fatal en la familia.

Individuos con historia personal de MSC					
Caso	Variante genética detectada	Gen	MSC / MSC Recuperada	Patología cardíaca previa	Anomalías estructurales descritas en autopsia
1	M982T	MYH7	MSC	No	Corazón Hipertrófico. Dilatación cavidades.
2	K814del	MYBPC3	MSC	No	Corazón Hipertrófico. HVI. Histología compatible con MCH (fibrosis intersticial, miocitos hipertróficos, etc.)
3	G325R	KCNQ1	MSC	SQTL	No
4*	H562R	KCNH2	MSC Recuperada	SQTL	-

**Tabla 1.** Resultados positivos de la detección de variantes genéticas en individuos con historia personal de MSC (recuperada o no). HVI: Hipertrofia Ventriculo Izquierdo. SQTL: Síndrome de QT Largo. MCH: Miocardiopatía Hipertrófica. 4\* miembro de familia 3 del apartado II de resultados.

Las dos variantes detectadas en los genes sarcómicos (M982T en el gen MYH7 y la delección K814del en el gen MYBPC3) fueron detectadas en 2 muestras de individuos fallecidos en los que se había detectado anomalía estructural en la autopsia (casos 1 y 2). El caso 1 se trata de un varón de 22 años que fallece de forma súbita. No tiene historia personal ni familiar previa de MSC. Esta variante ha sido descrita en la bibliografía y se asocia a un grosor aumentado de la pared del ventrículo izquierdo y con MSC<sup>7</sup>. En este caso se detecta un corazón aumentado en tamaño y dilatación de las cavidades cardíacas. En el caso 2, la delección detectada en MYBPC3 ha sido también descrita en numerosos artículos<sup>8-10</sup>. Este caso corresponde a un varón de 23 años que fallece durante la práctica deportiva y en cuya autopsia se resuelve MCH como causa de la muerte.

En el caso 3 se detectó una variante genética en KCNQ1, G325R, en una muestra post mórtem de una mujer de 19 años de edad a la que no se detectó anomalía cardíaca alguna tras autopsia. Esta variante está descrita en multitud de artículos científicos, en los que se relaciona con la MSC<sup>11-14</sup>.

En el caso 4 se detectó una variante genética en KCNH2, H562R<sup>15</sup>, en un individuo de 71 años de edad recuperado una MSC. Su nieto, también incluido en el estudio resultó ser portador de esta misma variante. Como veremos en el apartado II de resultados, se trata de un individuo que sufre síncope en reposo al que se ha diagnosticado SQTL.

## II. RESULTADOS DEL ESTUDIO GENÉTICO EN MUESTRAS DE INDIVIDUOS CON HISTORIA FAMILIAR DE MSC.

Los 57 casos restantes corresponden a muestras de individuos con historia familiar de MSC. En estos casos, el estudio genético no pudo ser desarrollado en el familiar fallecido

por no disponerse de la muestra, salvo en dos de los casos. Así, el estudio genético se lleva a cabo en familiares directos con o sin patología cardíaca previa. Los resultados del estudio genético en este grupo de individuos se recogen en la tabla 2. Se han detectado un total de 11 portadores de variantes genéticas, pertenecientes a 5 familias.

Individuos con Historia familiar de MSC			
Familia	Variante detectada/n portadores	Gen	Patología clínica previa(n) (n)
1	R366W/6	KCNQ1	SQTL (4) Historia clínica desconocida (1)
2	P910T/2	MYBPC3	Síncope (1)
3	H562R/2*	KCNH2	SQTL
4	C566G/1	KCNH2	SQTL
5	P1093L/1	KCNH2	Síncope

**Tabla 2.** Resultados positivos de la detección de variantes genéticas en individuos con historia familiar de MSC. SQTL: Síndrome de QT largo. \*uno de los portadores es el caso 4 del apartado I de resultados.

Entre las muestras incluidas en el estudio por presentar historia familiar de MSC, incluimos tanto individuos con patología cardíaca relacionada con MSC, como diagnosticados de SQTL, individuos que han sufrido síncope inexplicado, individuos con miocardiopatía hipertrófica familiar, síndrome Brugada y síndrome de QT corto así como individuos asintomáticos e individuos con historia clínica desconocida.

La variante R366W en el gen KCNQ1 - descrita en multitud de artículos científicos en relación con la MSC<sup>16-19</sup> - fue detectada en la familia 1, en un individuo sin historia clínica previa y en cuatro miembros de esa misma familia con SQTL familiar. Se ha confirmado la cosegregación de la mutación detectada con la enfermedad en dicha familia, compuesta de 8 individuos y en la que no se dispuso de la muestra del caso índice de MSC. No disponemos de la historia clínica de uno de los portadores de la mutación en esta familia.

La variante P910T fue detectada en dos miembros de la familia 2, una madre portadora asintomática y su hijo, un varón de 33 años con historia familiar de MSC en dos hermanos de 8 y 14 años. Se trata de un individuo que sufre síncope inexplicados desde la infancia en tratamiento con  $\beta$ - bloqueantes. Esta variante, P910T, ha sido descrita dos veces en la bibliografía en pacientes en los que se encontraba, además de ésta, una segunda mutación por lo que la implicación de esta variante en la patología es todavía incierta<sup>20,21</sup>.

La familia 3 -comentada también en el apartado I de resultados- presenta historia familiar de MSC, concretamente, su abuelo fue recuperado de un episodio de MSC a los 71 años de edad y aunque no se trata de un individuo joven, fue incluido en el estudio, porque su nieto sufre síncope en reposo y se le diagnosticó SQTL a los 20 años de edad. Ambos son portadores de la variante H562R en el gen KCNH2.

El caso estudiado en la familia 4 corresponde a una mujer portadora de la variante C566G en KCNH2, con SQTL asintomático. Tiene historia familiar de SQTL (una hermana). Su padre fallece a los 30 años de edad por causa desconocida. No se dispone de información bibliográfica sobre esta variante genética pese a que se ha descrito en esa misma posición aminoácida una variante diferente.

Por último, el caso estudiado en la familia 5 corresponde a un varón joven portador de la variante genética P1093L<sup>15,22</sup> en el gen KCNH2. Este individuo tiene historia familiar de SQTL y sordera congénita.

La naturaleza genética de las patologías implicadas en la MSC hace necesario el estudio de las bases moleculares y de los factores genéticos implicados. El avance en el conocimiento de los factores genéticos resulta fundamental tanto en el campo de la medicina

forense, a la hora de esclarecer una muerte a la que no se le ha encontrado causa tras la autopsia médico-legal y análisis de laboratorio, como en la clínica para ayudar a guiar la terapia más adecuada en el individuo afecto.

En torno a la mitad de las víctimas de MSC en población joven de entre 1 y 35 años de edad no presentan patología cardíaca estructural y la muerte tiene lugar, en muchas ocasiones, sin síntomas premonitorios. La aplicación de la biología molecular a estos casos puede ayudar a esclarecer la causa de la muerte de estos individuos y a evaluar el riesgo de los familiares, incluso si se trata de individuos asintomáticos.

Cabe resaltar la necesidad de recogida de la muestra de los casos índice de las familias, durante la autopsia de modo que el estudio genético pueda comenzar con los casos de individuos que sufren una MSC, recuperados o no del episodio. La recogida de estas muestras ayudará a que el estudio genético se lleve a cabo de forma más rápida y precisa no sólo en los casos de individuos fallecidos o recuperados de una MSC, sino también, una vez conocida la posible variante genética causal, en sus familiares. El papel de los patólogos forenses en los casos de muerte súbita cardíaca es fundamental. La estandarización de los protocolos de autopsia así como la recogida de la muestra para posterior análisis molecular resultan cruciales a la hora de guiar el estudio genético de los familiares, asintomáticos o no, de un individuo que fallece súbitamente. En aquellos casos en que se producen hallazgos morfológicos tras la autopsia- tales como hipertrofia o dilatación ventricular, desorganización de fibras cardíacas u otras- la búsqueda de las bases genéticas se centrará en los genes descritos como implicados en las diferentes patologías que cursan con dichos hallazgos (ej. genes sarcoméricos). Sin embargo, en aquellos casos en que la causa de la muerte no puede ser establecida tras rigurosa autopsia y análisis

de laboratorio, la recogida de datos sobre las circunstancias en que tiene lugar la muerte resulta de gran ayuda a la hora de decidir la estrategia de búsqueda de la posible variante genética causal de la muerte, de modo que el informe forense es de nuevo de gran importancia para guiar el análisis molecular más acertado: se han descrito, por ejemplo, asociaciones claras entre el gen mutado, el subtipo de SQT1 y el desencadenante de la arritmia. Schwartz y colaboradores determinan que en un 97% de los pacientes con SQT1 tipo I (LQT1) los eventos cardíacos tienen lugar durante actividad física<sup>23</sup>. Se ha visto que la natación es un desencadenante frecuente de eventos cardíacos en pacientes con LQT1<sup>24, 25</sup>. El grupo de Schwartz afirma además que los desencadenantes típicos de eventos cardíacos en pacientes con SQT1 tipo 2 (LQT2) son estímulos auditivos y el momento de despertarse mientras que en los pacientes con SQT1 tipo 3 (LQT3) los eventos tienen lugar en reposo.

La historia clínica del paciente y su historia familiar es fundamental para conocer los antecedentes y confirmar la naturaleza hereditaria de la patología. Se pone de manifiesto la necesidad de una estrecha colaboración entre profesionales y la creación de grupos multidisciplinares de forenses, cardiólogos, genetistas, farmacéuticos y psicólogos que evalúen el riesgo en cada caso de forma individual y guíen la terapia farmacológica o quirúrgica más adecuada. Estos grupos se especializarán en prestar asesoramiento genético, clínico y psicológico a los familiares. La colaboración multidisciplinar es necesaria para el esclarecimiento de las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo de las variantes genéticas de modo que se logrará una mayor precisión en el diagnóstico que facilitará tanto la elección de la terapia más adecuada en afectados y familiares portadores de la variante o variantes genéticas detectadas en el familiar afecto como el conocimiento sobre el pronóstico en cada caso siempre teniendo

en cuenta que los factores ambientales pueden influir en dicho pronóstico.

El desarrollo de nuevas tecnologías de biología molecular con diferentes estrategias de genotipado de alto rendimiento es de gran utilidad en el estudio concreto de los factores genéticos de la MSC<sup>26</sup>. Las plataformas de estudio genético a gran escala permiten una actualización rápida de los estudios genéticos, fundamental a la vista de la rapidez con que se describen variantes y genes implicados. Estas plataformas permiten el estudio de mutaciones ya descritas, secuenciar regiones de genes ya conocidas mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y estudiar genomas completos. Se trata de estrategias cada vez más rápidas y asequibles por lo que el diagnóstico molecular se puede llevar a cabo cada vez en periodo de tiempo más reducidos y a bajo coste.

## CONCLUSIÓN

A la vista de los resultados, podemos concluir que el estudio molecular tanto de las víctimas como de los familiares de primer y segundo orden de MSC puede ayudar no sólo a esclarecer la causa de la muerte de un individuo aparentemente sano al que no se encuentra la causa del fallecimiento tras autopsia -o los hallazgos no son suficientes para explicar la muerte- sino también para la prevención de un nuevo episodio de MSC en la familia. Es necesaria la colaboración entre diferentes especialistas a fin de conseguir una evaluación del riesgo potencial de portadores de las variantes genéticas detectadas. Las nuevas tecnologías de biología molecular avanzan de manera rápida agilizando y abaratando el estudio genético, lo que contribuye a la estratificación del riesgo de MSC y ayuda a decidir la terapia más adecuada en portadores de mutaciones causales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. De Vreede-Swagemakers JJ, Gorgels AP, Dubois-Arbouw WI, et al., Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30(6): p. 1500-5.
2. Moritz ARZamcheck N, Sudden and unexpected deaths of young soldiers; diseases responsible for such deaths during World War II. *Arch Pathol (Chic)* 1946; 42(5): p. 459-94.
3. Kuller L, Lilienfeld AFisher R, Sudden and unexpected deaths in young adults. An epidemiological study. *JAMA* 1966; 198(3): p. 248-52.
4. Oliva A, Brugada R, D'Aloja E, et al., State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death. *Am J Forensic Med Pathol* 2010.
5. Brion M, Allegue C, Monserrat L, et al., Large scale analysis of HCM mutations in sudden cardiac death. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2008; 1 p. 549-550.
6. Allegue C, Gil R, Sanchez-Diz P, et al., A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY system. *Electrophoresis* 2010; 31(10): p. 1648-55.
7. Morita H, Larson MG, Barr SC, et al., Single-gene mutations and increased left ventricular wall thickness in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2006; 113(23): p. 2697-705.
8. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, et al., Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(9): p. 1903-10.
9. Song L, Zou Y, Wang J, et al., Mutations profile in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 2005; 351(1-2): p. 209-16.
10. Cardim N, Perrot A, Santos S, et al., Hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese population: mutations in the myosin-binding protein C gene. *Rev Port Cardiol* 2005; 24(12): p. 1463-76.
11. Tanaka T, Nagai R, Tomoike H, et al., Four novel KVLQT1 and four novel HERG mutations in familial long-QT syndrome. *Circulation* 1997; 95(3): p. 565-7.
12. Donger C, Denjoy I, Berthet M, et al., KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 1997; 96(9): p. 2778-81.
13. Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al., Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; 102(10): p. 1178-85.
14. Lupoglazoff JM, Denjoy I, Villain E, et al., Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(5): p. 826-30.
15. Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, et al., Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 2009; 6(9): p. 1297-303.
16. Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al., Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* 1998; 51(1): p. 86-97.
17. Larsen LA, Christiansen M, Vuust JAndersen PS, High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by automated capillary electrophoresis: robust multiplex analysis and pattern-based identification of allelic variants. *Hum Mutat* 1999; 13(4): p. 318-27.
18. Choi G, Kopplin LJ, Tester DJ, et al., Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation* 2004; 110(15): p. 2119-24.
19. Struijk JJ, Kanters JK, Andersen MP, et al., Classification of the long-QT syndrome based on discriminant analysis of T-wave morphology. *Med Biol Eng Comput* 2006; 44(7): p. 543-9.
20. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, et al., Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(6): p. 630-8.
21. Hershberger RE, Norton N, Morales A, et al., Coding Sequence Rare Variants Identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1 and TNNI3 from 312 Patients with Familial or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010.
22. Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, et al., Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009; 120(18): p. 1752-60.
23. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, et al., Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; 103(1): p. 89-95.