

PAPER DE LA PLACOFILINA-2 EN LA  
MIOCARDIOPATIA ARITMOGÈNICA DE  
VENTRICLE DRET: BASES GENÈTIQUES I  
MECANISMES MOLECULARS

**Mireia Alcalde Masegu**

Per citar o enllaçar aquest document:  
Para citar o enlazar este documento:  
Use this url to cite or link to this publication:  
<http://hdl.handle.net/10803/385284>



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-  
NoComercial-SenseObraDerivada

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-  
SinObraDerivada

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-  
NoDerivatives licence



Institut  
d'Investigació  
Biomèdica  
de Girona  
Dr. Josep Trueta

Universitat de Girona

TESI DOCTORAL

**Paper de la Placofilina-2 en la Miocardiopatia  
Aritmogènica de Ventricle Dret: Bases Genètiques  
i Mecanismes Moleculars**

Mireia Alcalde Masegu

2015





TESI DOCTORAL

**Paper de la Placofilina-2 en la Miocardiopatia  
Aritmogènica de Ventricle Dret: Bases Genètiques  
i Mecanismes Moleculars**

Mireia Alcalde Masegu

2015

Ciències Experimentals i Sostenibilitat

Dirigida per Dr. Ramon Brugada i Dr. Oscar Campuzano

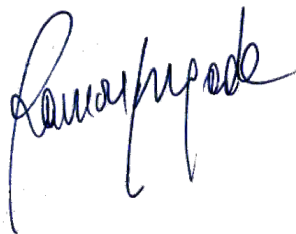
Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona



# Universitat de Girona

El **Dr. Ramon Brugada Terradellas**, professor titular facultat medicina (Universitat de Girona), metge adjunt servei cardiologia Hospital Josep Trueta i director del Centre de Genètica Cardiovascular (Universitat de Girona-IDIBGI); i el **Dr. Oscar Campuzano Larrea**, professor associat Facultat Medicina, investigador post-doctoral del centre del Centre de Genètica Cardiovascular (Universitat de Girona-IDIBGI) DECLAREM:

Que la Mireia Alcalde Masegu ha realitzat sota la nostra direcció i supervisió el treball d'investigació titulat: "**Paper de la Placofilina-2 en la Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret: Bases Genètiques i Mecanismes Moleculars**", per a l'obtenció del títol de doctora i, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signem aquest document.



Dr. Ramon Brugada Terradellas



Dr. Oscar Campuzano Larrea



Mireia Alcalde Masegu



**A la meva mare**





# Agraïments

M'agradaria dedicar les primeres línies a agrair als meus directors Ramon i Òscar, el seu suport i dedicació en aquesta tesi. Gràcies Ramon per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi en el Centre de Genètica Cardiovascular, ha estat un autèntic plaer.

És difícil posar en paraules tot el suport rebut al llarg d'aquests anys, a totes les persones que han viscut i compartit aquest procés, personal i professionalment. Gràcies a tots per ajudar-me a tirar-ho endavant i arribar fins aquí.

En primer lloc m'agradaria agrair el suport, les hores invertides, la predisposició i l'ajuda als millors companys de feina que un pot tenir. A vosaltres, Helena, Cristina, Mònica i Anna, gràcies per l'ajuda professional i personal, per la complicitat i pels bons moments, que han estat molts. Vaig començar amb vosaltres, i sense vosaltres, no estaria aquí. Hem viscut i compartit aquest viatge juntes i, creieu-me, ha estat un autèntic plaer. A tots els integrants del CGC, Pedro, Sara, Eli, Marcel, Anna, Guillermo i Fabi, per la vostra professionalitat, exemple i suport, aquesta tesi ha estat possible també gràcies a vosaltres. I per suposat, a tots els components de *doctores en projecte*, Irene, Alexandra, Ferran, Catarina, Javi, Mel·lina, Anna, Olallo, Txús i Bernat, perquè som un gran equip, i treballar cada dia al vostre costat és genial. Aquesta tesi és gràcies a vosaltres i per vosaltres.

La tesi no és només un procés professional, moltes vegades va més enllà i envaeix la vessant personal, per això vull agrair a tots els que heu estat al meu costat en aquesta etapa. Perquè no sempre ha estat fàcil compaginar-ho, vull agrair a la meua família i als meus amics que sempre heu sabut acompanyar-me de la millor manera.

Gràcies a les *pinipons*, Irene, Andrea, Laura, Mireia i Alba, amb vosaltres vaig començar fa més de 10 anys i vull agrair-vos tots els bons moments que m'heu regalat des de llavors. També a les *putis*, Sílvia C, Silvia G, Laia, Isis i Lorena, per

tot el que hem viscut i el que seguim vivint, sempre és una aventura amb vosaltres. A les *monitores*, Núries i Queralt que m'ompliu de felicitat cada vegada que ens veiem, sou genials. A les meves *Wilbur roommates*, Maggie and Kate, for beeing so especial to me, you two are part of this too. En definitiva, a tots aquells que d'una manera o altra heu compartir amb mi els bons moments que he viscut al llarg d'aquest temps.

I a vosaltres: Anna, que et podria posar a tots els grups ( i no sé a quin), gràcies per entendre i compartir amb mi els moments més difícils d'aquesta etapa; Laura i Marina, gràcies per la vostra amistat incondicional, per ser-hi sempre i per perdonar les meves absències. Aquesta tesi, com tantes coses a la meva vida, no hauria estat possible sense vosaltres.

I per últim, m'agradaria agrair a la meva família, especial i genial a la vegada, per ser com sou, sense vosaltres res tindria sentit. A tu David, per veure sempre el millor en mi, per creure-hi i ser-hi sempre. A vosaltres, Maria, Daniel Manolo i a les meves ties, Montse i Xesca, perquè és difícil posar en paraules tot el suport que em doneu, necessitaria pàgines senceres només per vosaltres. I a tu mama, perquè valoro tot el que sempre has fet per nosaltres, per ser un exemple de superació i per ensenyar-nos a no tirar mai la tovallola, a que un esforç més sempre val la pena. Perquè gràcies als que tu has fet, i el camí no ha estat fàcil, avui estic aquí. Així que gràcies, això és per tu.

En aquesta tesi hi ha l'esforç de moltes persones, desitjo que tots ens en sentim orgullosos. A tots vosaltres, gràcies, gràcies i gràcies.

## Llista de publicacions derivades de la tesi

La tesi que es presenta és en format compendi d'articles de recerca. El contingut d'aquesta tesi està basat en les següents publicacions

**Article 1:** Alcalde M, Campuzano O, Berne P, García-Pavía P, Doltra A, Sarquella-Brugada G, Iglesias A, Alonso-Pulpon L, Brugada J, Brugada R. *Stop-gain mutations in PKP2 are associated with a later age of onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy*. **Plos one**, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0100560. Factor d'impacte: 3,234 Q1 (Multidiciplinary sciences)

**Article 2:** Alcalde M, Campuzano O, Allegue C, Torres M, Arbelo E, Partemi S, Iglesias A, Brugada J, Oliva A, Carracedo A, Brugada R. *Sequenom MassARRAY approach in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy post-mortem setting: clinical and forensic implications*. **International Journal of Legal Medicine**. 2014. doi: 10.1007/s00414-014-0996-y. Factor d'impacte: 2,714, Q1 (Legal Medicine)

**Article 3:** Alcalde M, Campuzano O, Beltran-Alvarez P, Pagans S, Brugada R. *Truncated plakophilin-2 mutations affect desmoplakin subcellular localization in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. **Unpublished data. Submitted**



---

## Llista d'abreviatures

---

**ARM**            Repetició Armadillo

---

**BBD**            Bloqueig de Branca Dreta

---

**CNV**            De l'anglès, Copy Number Variant

---

**CTGF**           De l'anglès, Connective Tissue Growth Factor

---

**CTNNA3**       De l'anglès, Catenin (Cadherin-associated protein) alpha 3

---

**Cx**              Conexina

---

**DAI**            Desfibril·lador Automàtic Implantable

---

**DES**            Desmina

---

**DMD**            Distròfia Muscular de Duchenne

---

**DSC2**           Desmocolina-2

---

**DSG2**           Desmogleïna-2

---

**DSP**            Desmoplaquina

---

**ECG**            Electrocardiograma

---

**FFPE**           De l'anglès, Formaldehyde Fixed-Paraffin Embedded

---

**FI**              Filaments Intermedis

---

**FV**              Fibril·lació Auricular

---

**LMNA**          Lamina

---

<b>MAVD</b>	Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret
<b>MCD</b>	Miocardiopatia Dilatada
<b>MCH</b>	Miocardiopatia Hipertròfica
<b>MSC</b>	Mort Sobtada Cardíaca
<b>NGS</b>	De l'anglès, Next Generation Sequencing
<b>NMD</b>	De l'anglès, Nonsense-Mediated Decay
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>PG</b>	Placoglobina
<b>PKCa</b>	Proteïna Quinasa C alfa
<b>PKP2</b>	Placofilina-2, de l'anglès Plakophilin-2
<b>PKP2<sup>TR</sup></b>	Placofilina-2 Truncada
<b>PLN</b>	De l'anglès, Phospholamban
<b>PPAR</b>	De l'anglès, Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
<b>PTC</b>	De l'anglès, Premature Termination Codon
<b>RMN</b>	Ressonància Magnètica Nuclear
<b>RyR2</b>	De l'anglès Ryanodine Receptor 2
<b>SERCA</b>	De l'anglès, Sarcoendoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>SHF</b>	De l'anglès, Second Heart Field

<b>SNP</b>	De l'anglès ,Single Nucleotide Polymorphism
<b>SNV</b>	De l'anglès, Single Nucleotide Variant
<b>SUDNA</b>	De l'anglès, Sudden Unexplained Death with Negative Autopsy
<b>TF</b>	De l'anglès Task Force
<b>TGFb3</b>	De l'anglès, Transforming Growth Factor beta 3
<b>TMEM43</b>	De l'anglès, Transmembrane protein 43
<b>TTN</b>	Titina
<b>UTR</b>	De l'anglès, Untranslated Region





## Índex de taules

<b>Taula</b>	<b>Títol</b>	<b>Pàgina</b>
1	Gens associats a canalopaties	32
2	Gens associats a cardiomiopaties	37
3	Taula resum dels criteris diagnòstics Task Force	49
4	Gens associats a la MAVD	56
5	Models animals en la MAVD	70



# Índex de figures

<b>Figura</b>	<b>Títol</b>	<b>Pàgina</b>
1	Estructura anatòmica del cor humà	4
2	Estructura elèctrica del cor humà	6
3	Fases del potencial d'acció cardíac	10
4	Activitat elèctrica del cor	13
5	Esquema de les unions del disc intercalar	16
6	Estructura sarcomèrica del cardiomiòcits	18
7	Estructura del desmosoma	23
8	Esquema diagnòstic genètic	46
9	Electrocardiograma característic de la MAVD	55
10	Mecanisme molecular proposat en l'adipogènesi en la MAVD	73



<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>1. El Cor</b>	<b>2</b>
1.1 Estructura i funció del cor.....	2
1.2 Potencial d'acció i ritme cardíac.....	6
1.3. Alteracions del ritme cardíac.....	10
1.4 Tècniques clíniques d'avaluació de la funció cardíaca .....	11
1.4.1 L'electrocardiograma .....	11
1.4.2 Holter 24h.....	13
1.4.3 Ressonància magnètica nuclear .....	14
1.4.4 Ecocardiografia .....	14
<b>2. Cardiomiòcits</b>	<b>15</b>
2.1 Estructura i contractilitat.....	15
2.2 Unions Cel·lulars: discos intercalars .....	17
2.2.1 Unions GAP .....	18
2.2.2 Unions Adherents.....	19
2.2.3 Desmosomes .....	20
2.2.3.1 <i>Cadherines</i> .....	20
2.2.3.2 <i>Proteïnes armadillo</i> .....	21
2.2.3.3 <i>Desmoplaquina</i> .....	22
2.2.3.4 <i>Estructura del desmosoma</i> .....	23

2.2.3.5 Formació dels desmosomes .....	24
<b>3. Mort Soltada Cardíaca .....</b>	<b>26</b>
3.1 Epidemiologia de la mort soltada .....	26
3.2 Patologies associades a la mort soltada.....	28
3.3 Predisposició Genètica a la Mort Soltada .....	29
3.3.1 Canalopaties .....	31
3.3.1.1 Síndrome de QT llarg (LQTs).....	31
3.3.1.2 Síndrome de Timothy.....	31
3.3.1.3 Síndrome de Brugada (BS).....	31
3.3.1.4 Síndrome de Lev-Lenègre .....	34
3.3.1.5 Síndrome de QT curt (SQTs) .....	34
3.3.1.6 Fibril·lació auricular (FA).....	35
3.3.1.7 Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica (TVPC)...	35
3.3.2 Cardiomiopaties .....	36
3.3.2.1 Miocardiopatia hipertròfica (MCH) .....	36
3.3.2.2 Miocardiopatia dilatada (MCD).....	36
3.3.2.3 Miocardiopatia aritmogènica de ventricle dret (MAVD).....	37
<b>4. Diagnòstic genètic .....</b>	<b>39</b>
4.1 Conceptes generals .....	39

4.1.2 Les variants genètiques .....	39
4.1.2 Tipus d'herència .....	41
4.1.3 Expressió dels gens .....	43
4.1.4 Sistemes de vigilància.....	44
4.2 Anàlisis genètiques .....	45
4.2.1 Extracció DNA .....	46
4.2.2 Seqüenciació.....	47
4.2.2.1 Seqüenciació Sanger.....	47
4.2.2.2 MassARRAY Sequenom .....	48
4.2.2.3 Seqüenciació de nova generació (NGS) .....	49
4.2.3 Valoració de les variants .....	50
<b>5. Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret .....</b>	<b>52</b>
5.1 Evidències Clíiques i Diagnòstic .....	53
5.1.1 L'electrocardiograma en la MAVD .....	55
5.1.2 Ressonància magnètica nuclear .....	55
5.2 Tractament .....	57
5.3 Casos Post-mortem .....	58
5.4 Predisposició Genètica a la MAVD .....	61
5.4.1 Gens desmosomals .....	61
5.4.1.1 Placofilina-2.....	62



5.4.1.2	<i>Desmocolina-2</i> .....	63
5.4.1.3	<i>Desmogleïna-2</i> .....	63
5.4.1.4	<i>Placoglobina</i> .....	64
5.4.1.5	<i>Desmoplaquina</i> .....	64
5.4.2	Gens no desmosomals .....	65
5.4.2.1	<i>Desmina</i> .....	65
5.4.2.2	<i>Factor de creixement transformant beta 3</i> .....	66
5.4.2.3	<i>Proteïna transmembrana 43</i> .....	66
5.4.2.4	<i>Lamin A/C</i> .....	67
5.4.2.5	<i>Titina</i> .....	68
5.4.2.6	<i>Fosfolamban</i> .....	68
5.4.2.7	<i><math>\alpha</math>T-catenin</i> .....	69
5.4.3	Controvèrsies en la Genètica de la MAVD .....	69
5.4.3.1	Fenocòpies.....	69
5.4.3.2	Solapament en les miocardiopaties .....	70
5.5	Fisiopatologia de la MAVD .....	70
5.5.1	Origen dels adipòcits: possibles mecanismes .....	71
5.5.2	Models animals .....	74
5.5.3	Alteracions tissulars del miocardi humà .....	78

<b>HIPÒTESIS</b>	<b>81</b>
<b>OBJECTIUS</b>	<b>85</b>
Objectiu principal:.....	86
Objectius específics .....	86
<b>RESULTATS</b>	<b>87</b>
Resultats Globals .....	88
Article 1 .....	93
Article 2 .....	112
Article 3 .....	136
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>149</b>
<b>I. Caracterització de la població de MAVD</b>	<b>152</b>
1. <i>La població de MAVD</i> .....	152
<b>II. Utilitat de les eines genètiques, predisposició genètica i l'estratificació del risc</b>	<b>154</b>
2. <i>Utilitat de la seqüenciació per MassARRAY en DNA degradat.</i> .....	154
3. <i>Predisposició genètica i estratificació del risc</i> .....	156
<b>III. Mecanismes moleculars implicats en la MAVD:</b>	<b>159</b>
4. <i>Efecte cel·lular de les PKP2TR</i> .....	159
5. <i>Alteració de la localització subcel·lular de la desmoplaquina</i> .....	162
<b>IV. Alteracions en els discos intercalars en el teixit miocardiàc</b>	<b>165</b>
6. <i>Disminució de la senyal de PG als discos intercalars</i> .....	166

7. Unions GAP en la MAVD .....	168
<b>V. Perspectives de futur en l'estudi de la MAVD _____</b>	<b>169</b>
8. Diagnòstic genètic en la MAVD.....	169
9. Estratègies terapèutiques per PTC en MAVD .....	171
<b>CONCLUSIONS _____</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFIA _____</b>	<b>181</b>

## Resum en català

La miocardiopatia aritmogènica de ventricle dret (MAVD) és una malaltia rara d'origen genètic caracteritzada per la substitució progressiva del miocardi per teixit fibroadipós, especialment en el ventricle dret. Aquesta substitució fibroadiposa pot provocar alteracions en el sistema de conducció produint, en primer lloc, arítmies ventriculars i, fins i tot la mort sobtada (MS). Els mecanismes pels quals les alteracions genètiques en els gens associats a la patologia provoquen el fenotip de MAVD són encara molt desconeguts. Aquesta tesi té com a principal objectiu aprofundir en els mecanismes involucrats en el desenvolupament de la MAVD; la predisposició genètica, els mecanismes moleculars implicats i els defectes tissulars observats en el miocardi afectat per MAVD.

Concretament, es descriu que la MAVD té una predisposició genètica en més del 50% dels casos, principalment degut a variants patogèniques en els gens que codifiquen per proteïnes desmosomals, especialment per variants d'aturada a PKP2 (PKP2<sup>TR</sup>). En aquest treball es descriu que les variants PKP2<sup>TR</sup> estan associades a una major edat de diagnòstic. Els nostres resultats també indiquen que els efectes de PKP2<sup>TR</sup> a nivell cel·lular poden estar associats a un defecte de transport proteic que no només afecta a la PKP2 sinó també DSP; això suggereix que algunes PKP2<sup>TR</sup> podrien actuar a través d'un mecanisme de haploinsuficiència, però altres podrien tenir un efecte de dominància negativa. A més a més, els nostres resultats també descriuen que les variants a PKP2<sup>TR</sup> que provoquen un major defecte en la localització de DSP, són també aquelles que

presenten una major penetrància en les famílies portadores. Finalment, també es demostra que la MAVD presenta alteracions estructurals en el miocardi associades a una disminució de la senyal de PG als discos intercalars, donant suport a la idea de que podria utilitzar-se com a prova diagnòstica en biòpsies de pacients.

## Resumen

La miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (MAVD) es una enfermedad rara de origen genético, caracterizada por la sustitución progresiva del miocardio por tejido fibroadiposo, especialmente en el ventrículo derecho. Esta sustitución fibroadiposa puede provocar alteraciones en el sistema de conducción produciendo, en primer lugar, arritmias ventriculares e incluso la muerte súbita (MS). Los mecanismos a través de los cuales las alteraciones genéticas en los genes asociados a la patología provocan el fenotipo de MAVD son aún parcialmente desconocidos. Esta tesis tiene como objetivo principal profundizar en los mecanismos involucrados en el desarrollo de la MAVD, desde la predisposición genética, los mecanismos moleculares involucrados y hasta los defectos tisulares observados en el miocardio de los afectados por MAVD.

Concretamente, se describe que la MAVD tiene una predisposición genética en más de un 50% de los casos a causa de variantes en genes desmosomales, especialmente en variantes *stop* a PKP2 (PKP2<sup>TR</sup>). Las variantes PKP2<sup>TR</sup> están asociadas a una mayor edad de diagnóstico. Nuestros resultados también indican que los efectos de PKP2<sup>TR</sup> a nivel celular pueden estar asociados a un defecto en el transporte proteico que no solamente afecta a PKP2 sino también a DSP; sugiriendo que algunas PKP2<sup>TR</sup> podrían tener un efecto de dominancia negativa.

Además, nuestros resultados describen que las variantes que provoquen un mayor defecto en la localización subcelular de DSP son también aquellas que presentan una mayor penetrancia en las familias. Finalmente, también demuestra

que la MAVD presenta alteraciones estructurales en miocardio asociadas a una disminución de la señal de PG en los discos intercalares, apoyando la idea de que podría utilizarse como prueba diagnóstica en biopsias.

## Abstract

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a rare inherited disease, characterized by a progressive fibrofatty replacement in the myocardium, especially in the right ventricle. This fibrofatty replacement may affect the conduction system causing ventricular arrhythmias and even sudden cardiac death. However, how these genetic alterations eventually trigger this pathology and molecular mechanisms underlying that process still remain partially unknown.

This thesis aims to study mechanisms underlying ARVC, from genetic predisposition, molecular mechanisms to tissue effects observed in the myocardium.

In particular, we showed that ARVC has a genetic origin in more than 50% of cases as a consequence of genetic variants in desmosomal genes, especially caused by stop variants in *PKP2* ( $PKP2^{TR}$ ).  $PKP2^{TR}$  are associated with a later age of onset of ARVC. Our results also suggest that  $PKP2^{TR}$  may be associated with a protein traffic defect affecting not only their own traffic but also DSP's, suggesting some  $PKP2^{TR}$  might have a dominant negative effect depending on length protein.

Moreover, this fact seems to be associated with a higher penetrance, since families carrying  $PKP2^{TR}$  causing a more deficient DSP subcellular localization showed higher penetrance. In addition this work also show that tissue alteration in the myocardium such as a decreased in PG signal at intercalated disks, supporting the idea it could be used as a diagnostic tool in biopses.





# **INTRODUCCIÓ**

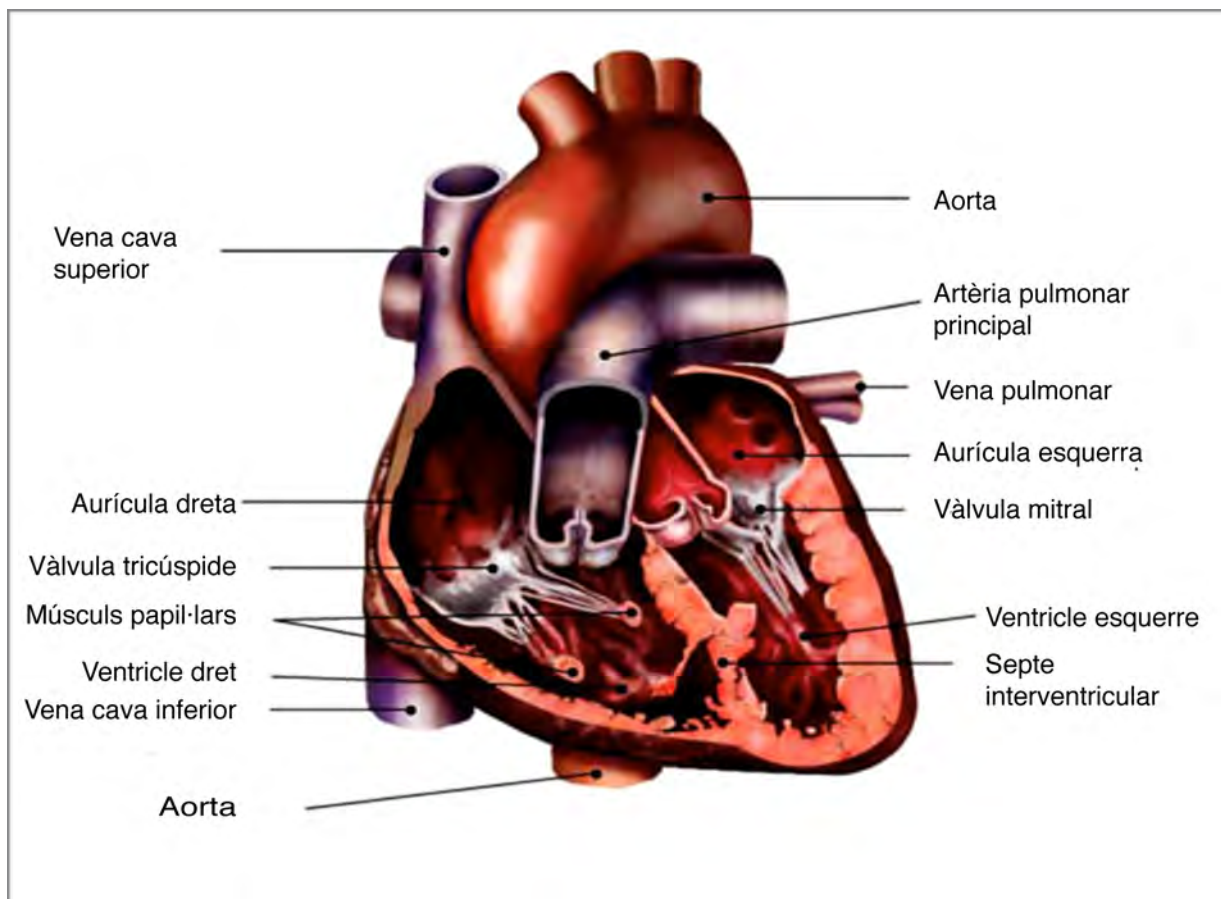
## 1. El Cor

### 1.1 Estructura i funció del cor

El sistema cardiovascular es compon de conductes pels quals circula la sang i està format per dos estructures bàsiques: el cor i els vasos sanguinis. D'aquesta manera, el cor és l'òrgan principal del sistema circulatori que permet bombejar la sang cap als teixits de l'organisme. Està format per tres capes. De la part externa a la interna aquestes capes són: l'epicardi, miocardi i endocardi. L'**epicardi** està format per dues capes, un mesoteli (epiteli pla simple) extern recolzat en una làmina basal i una capa interna denominada subepicardi. El subepicardi conté teixit conjuntiu lax, teixit adipós, vasos coronaris i ganglis. El **miocardi** és la capa mitja i de més gruix del cor, sobretot als ventricles. Conté els miòcits contràctils i les cèl·lules miocardiàques especialitzades en la secreció d'hormones localitzades principalment en les aurícules. Aquestes hormones regulen el volum sanguini, la pressió arterial i la concentració d'electròlits. Finalment, l'**endocardi**: constituït per tres capes; endoteli (pla simple), subendoteli i subendocardi. El subendoteli conté fibres elàstiques i de col·lagen, fibroblasts i cèl·lules musculars llises. El subendocardi és una capa de teixit conjuntiu laxa que conté vasos sanguinis, nervis i fibres de Purkinje del sistema de conducció cardíac.

Anatòmicament, el cor està dividit en 4 cavitats, dos aurícules a la part superior i dos ventricles a la part inferior, totes 4 formades principalment per múscul cardíac. Una paret muscular, el septe, divideix l'aurícula i el ventricle esquerre de l'aurícula i

el ventricle dret, evitant el pas de la sang entre les dues meitats. Les vàlvules mitral i tricúspide entre les aurícules i els ventricles esquerre i dret respectivament, asseguren el pas unidireccional coordinat de la sang entre les aurícules i els ventricles. Aquestes cavitats ventriculars tenen la funció de bombejar la sang cap als teixits (ventricle esquerre) o els pulmons (ventricle dret), fet pel qual les seves parets tenen més musculatura i són més denses que les de les aurícula. Al mateix temps, el ventricle esquerre presenta més musculatura en les parets que el dret, ja que ha d'exercir una major força per tal de que la sang es distribueixi per tot el cos a través de les artèries. El procés en el qual els ventricles es contreuen per bombejar la sang a través de les artèries s'anomena sístole, mentre que el procés de relaxació d'aquests s'anomena diàstole.

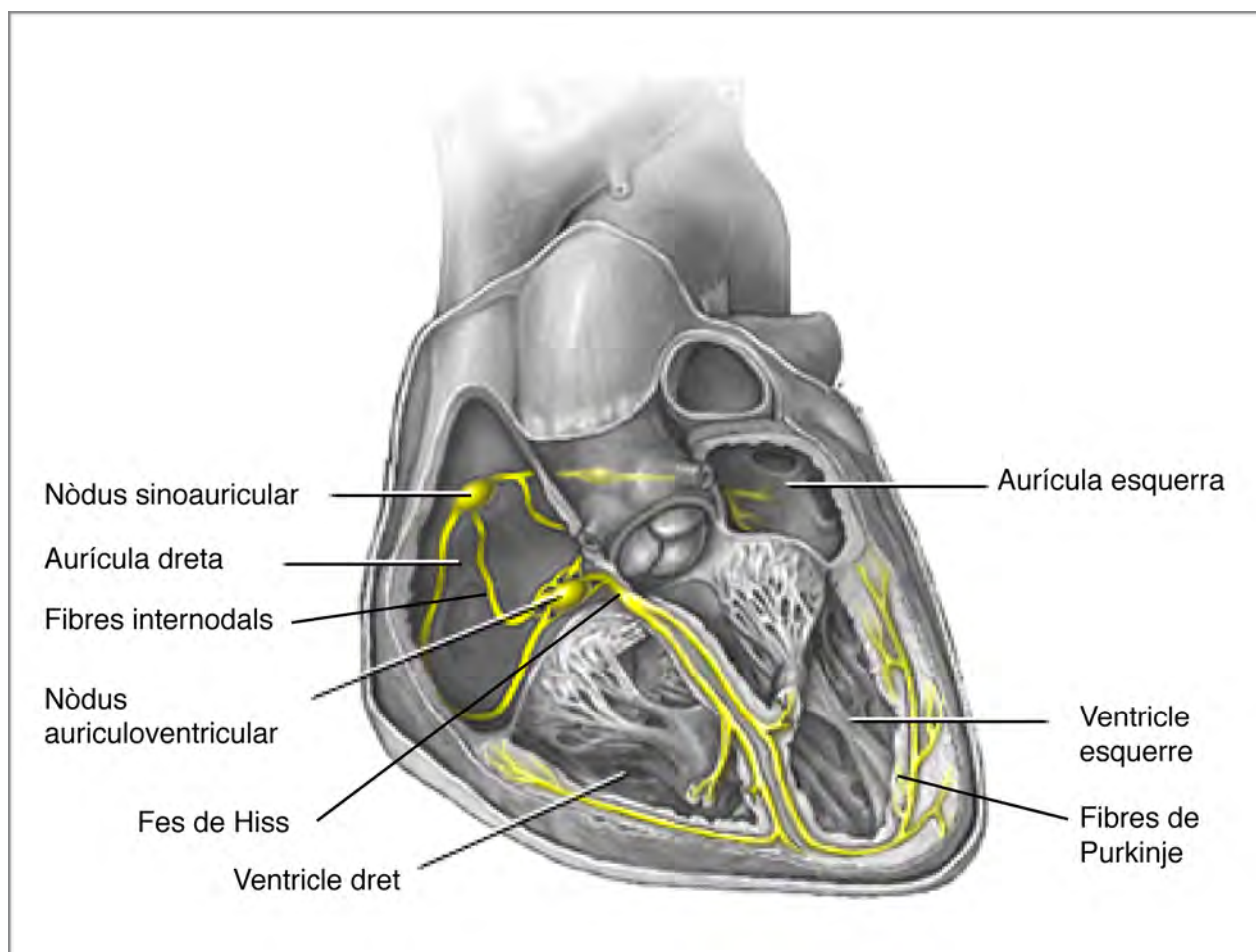


**Figura 1-** Representació estructura anatómica del cor. *Adaptada de Anatomy and Physiology de Kevin Patton.*

La circulació sanguínia que es realitza a partir del cor es divideix en dos circuits. D'una banda, **la circulació major o somàtica**: El trajecte de la sang comença en el ventriple esquerre, carregada d'oxigen i s'estén per l'aorta i les branques arterials cap al sistema capil·lar dels teixits. Un cop la sang ha aportat l'oxigen a les cèl·lules, aquestes alliberaran el  $\text{CO}_2$  a la sang. Dels teixits surten capil·lars que formen les venes que contenen sang pobre en oxigen. Aquestes desemboquen a la vena cava (superior i inferior) que drenen a l'aurícula dreta.

I de l'altra banda, **la circulació menor o pulmonar**: La sang pobre en oxigen és bombejada des del ventricle dret del cor per l'arteria pulmonar que es bifurca en els corresponents troncs per cadascun dels pulmons. En els capil·lars alveolars pulmonars la sang s'oxigena a través d'un procés conegut com hematosi i es recondueix cap a les quatre venes pulmonars que drenen la sang rica en oxigen, a la aurícula esquerra del cor.

Per tal de produir el batec rítmic del cor, aquest està dotat d'un sistema elèctric que permet generar impulsos, o potencial d'acció (PA), que produeixin la contracció periòdica del múscul cardíac, així com conduir aquests impulsos a través de tot el cor. Un PA és un canvi reversible en el potencial de la membrana produït per l'activació seqüencial de diferents corrents iòniques generades per la difusió de ions a través de la membrana a favor del seu gradient electroquímico. El PA cardíac (PAC) presenta unes propietats úniques necessàries pel funcionament del sistema de conducció elèctrica del cor. El sistema que permet generar i conduir aquests impulsos elèctrics és el denominat sistema cardionector, està format per un grup de cèl·lules encarregades de generar l'excitació i transmetre l'impuls a totes les cèl·lules miocardiàques. El sistema cardionector s'inicia al sinus auricular, seguint per les fibres internodals, el nòdul auriculoventricular, el feix de Hiss i finalment les cèl·lules de Purkinje.



**Figura 2-** Representació estructural elèctrica del cor humà. *Adaptada de Anatomy and Physiology de Kevin Patton.*

## 1.2 Potencial d'acció i ritme cardíac

Les cèl·lules cardíques en repòs estan polaritzades, és a dir, presenten una diferència de potencial entre el medi intra i extracel·lular, essent aquest negatiu. Aquesta diferència de potencial durant la diàstole elèctrica es denomina potencial de repòs transmembrana (PRT) i el seu valor depèn del tipus de fibra (-90 mV per les fibres auriculars, ventriculars i el sistema His Purkinje; -60 mV per les fibres del nòdul sinusal y nòdul auriculo-ventricular).

El PAC engloba el cicle des d'una despolarització fins a la següent. És a dir, durant la despolarització l'interior de la cèl·lula passa d'estar carregat negativament a estar-ho positivament (20-30mV) per després repolaritzar-se de nou fins a recuperar el PRT. La gènesis del PAC és deguda a diferents corrents iòniques, i presenta cinc fases(1-3):

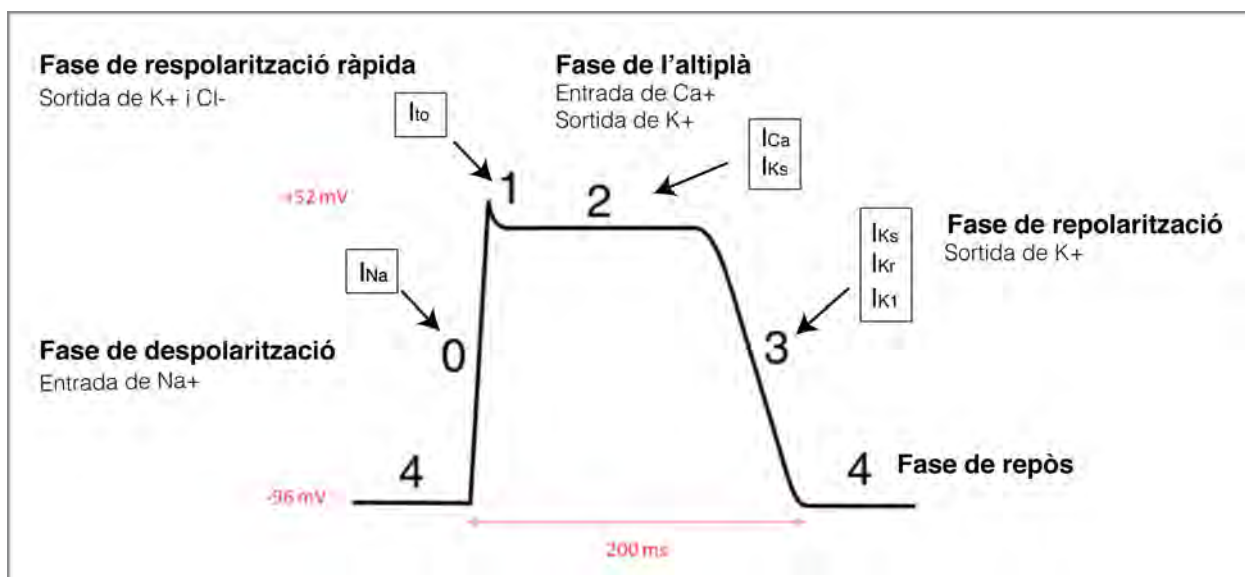
- Fase de despolarització ràpida (o fase 0): En aquesta fase es produeix una entrada massiva de ions de sodi ( $\text{Na}^+$ ) a través de canals de  $\text{Na}^+$  dependents de voltatge que generarà el corrent de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ). Aquests canals s'activaran/obriran amb la despolarització, permetent el pas de  $\text{Na}^+$  durant uns 1-2 ms provocant que la diferència del potencial de membrana passi de -90mV a +20 - +40mV.
- Fase de repolarització parcial de la membrana (o fase 1): En aquesta fase es produeix la inactivació dels canals de  $\text{Na}^+$ , seguit d'una repolarització parcial de la membrana degut a l'activació dels canals de potassi ( $\text{K}^+$ ) responsables del, corrent transitori de sortida ( $I_{\text{to}}$ ).
- Fase de l'altiplà o plateau (o fase 2): En aquesta fase es produeixen dos corrents d'entrada: (1) un de  $\text{Na}^+$ , a través d'una petita fracció de canals que no s'han activat completament al final de la fase 0, el que generarà una corrent lent de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{NaL}}$ ), i (2) l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través dels canals tipus-L que generen el corrent  $I_{\text{Ca}}$ . D'altra banda es produeixen tres corrents rectificadors tardans de sortida de  $\text{K}^+$  degut a d'activació dels canals de potassi ultra-ràpids  $I_{\text{Kur}}$ , ràpids- $I_{\text{Ks}}$  i lents- $I_{\text{Ks}}$ . L'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , activa l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle



sarcoplasmàtic, disparant la contracció cardíaca. Aquest fet és fonamental per l'acoblament electromecànic.

- Fase de repolarització (o fase 3): En aquesta fase la repolarització s'accelera degut a la inactivació dels corrents d'entrada de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  i el consegüent predomini dels corrents repolaritzadors de  $\text{K}^+$  activats durant la fase 2. Al final de la fase 3 prenen importància tres corrents més de  $\text{K}^+$ .
  - El corrent de rectificació interna ( $I_{K1}$ ), que determina la fase final de la repolarització i el nivell de potencial de la membrana durant la diàstole o fase 4.
  - El corrent generat per canals sensibles als nivells cel·lulars de ATPs ( $I_{KATP}$ ), pel que representa un mecanisme d'acoblament entre l'activitat elèctrica i metabòlica del cardiomiòcit.
  - El corrent generat per canals acoblats a proteïnes G inhibidores i activats per acetilcolina ( $I_{KACH}$ ) o adenosina ( $I_{KAdo}$ ) després de l'activació dels seus respectius receptors M2 i A1. L'activació d'aquest corrent en les cèl·lules auriculars hiperpolaritza el potencial de membrana i escurça la duració del PAC.
- Fase de repòs (o fase 4): Aquesta és la fase de repòs abans de l'inici del següent PAC, i correspon a la diàstole ventricular. Després de la repolarització de la cèl·lula aquesta manté el seu PRT estable fins que la cèl·lula és despolaritzada de nou gràcies als corrents de potassi mencionats anteriorment.

En aquesta fase es restitueixen les concentracions iòniques als dos costats de la membrana. Es poden observar diferències en la forma dels PAC dels cardiomiòcits auriculars i ventriculars, i del NSA i NSV. Aquestes divergències són causades principalment per la diferència en l'expressió d'alguns canals. Per exemple, el corrent rectificador de  $K^+$  ultraràpid ( $I_{K_{ur}}$ ), només s'expressa en els cardiomiòcits auriculars, i fa que la repolarització sigui més ràpida que en els ventriculars. Les diferències en la forma dels PAC dels cardiomiòcits del NSA i NAV respecte als cardiomiòcits auriculars i ventriculars, són degudes principalment al fet que en les cèl·lules nodals no s'expressen els canals que generen el corrent  $I_{K1}$ , però en canvi s'expressen els canals responsables de l'anomenat corrent marcapassos o *funny current* ( $I_f$ ) a la fase 4. Els canals responsables del corrent  $I_f$ , són permeables al  $Na^+$  i al  $K^+$ , i no permeten que la fase 4 es mantingui en repòs, sinó que es va despolaritzant lentament. A més, els canals responsables de la despolarització són els canals de  $Ca^{2+}$  tipus L i T ( $I_{CaL}$  i  $I_{CaT}$ ), i és per aquesta raó que la fase *plateau* és més curta, i el PAC d'aquests cardiomiòcits és més ràpid(3).



**Figura 3-** Fases del potencial d'acció cardíac. Adaptada de *Cardiac Electrophysiology* per Douglas P Zipes i José Jalife.

### 1.3. Alteracions del ritme cardíac

El ritme cardíac normal és aquell que s'origina en el nòdul sinusal, que presenta una descàrrega amb freqüència entre 60-100 batecs per minut, de manera regular, viatjant cap als ventricles sense retard.

El ritme cardíac respon a les necessitats de l'organisme i presenta un ventall ampli de variacions que, en general es consideren dins dels límits normals. La taquicàrdia és un ritme cardíac ràpid o irregular, normalment de més de 100 batecs per minut. La taquicàrdia es pot donar en les cambres superiors del cor (taquicàrdia auricular) o bé en les inferiors (taquicàrdia ventricular). D'altra banda, la bradicàrdia es defineix com a un ritme cardíac lent o irregular, normalment de menys de 60 batecs per minut. En els dos casos, una alteració del ritme cardíac, pot comportar que el cor no pugui bombejar de manera eficient la sang amb nivells alts d'oxigen al cos. En molts casos els canvis de freqüència cardíaca (taquicàrdia

o bradicàrdia) no són patològics i no s'altera l'ordre natural, des de l'estímul al nòdul sinusal fins als ventricles. D'altra banda, quan existeix una alteració del ritme cardíac, s'altera l'ordre d'excitació normal (l'estímul no parteix del nòdul sinusal), es considera una anomalia. En aquests casos l'alteració rep el nom de arítmia i existeixen dos grups principals: la taquiarítmia (ritmes ràpids) i la bradiarítmia (ritmes lents).

Les taquiarítmies poden tenir el seu origen per sobre el feix de Hiss (taquiarítmies supra-ventriculars), com és el cas de la fibril·lació auricular (FA) o el *flutter* auricular; o bé pot tenir el seu origen per sota del feix de Hiss (taquiarítmies ventriculars), com són la taquicàrdia ventricular o la fibril·lació ventricular (FV). Les bradiarítmies són produïdes per una alteració en la formació o conducció dels estímuls elèctrics.

## **1.4 Tècniques clíniques d'avaluació de la funció cardíaca**

### **1.4.1 L'electrocardiograma**

L'ECG és una representació gràfica del potencial elèctric que controla l'activitat del múscul cardíac. Els impulsos que viatgen a través del múscul del cor generen corrents elèctriques que condueixen fluids a la superfície del cos. Mitjançant la col·locació d'elèctrodes externs sobre la pell a la part antero-superior esquerra del tòrax, es pot mesurar l'activitat elèctrica (diferència de potencial de les cèl·lules del miocardi), i per tant estudiar el funcionament del múscul cardíac. El registre de

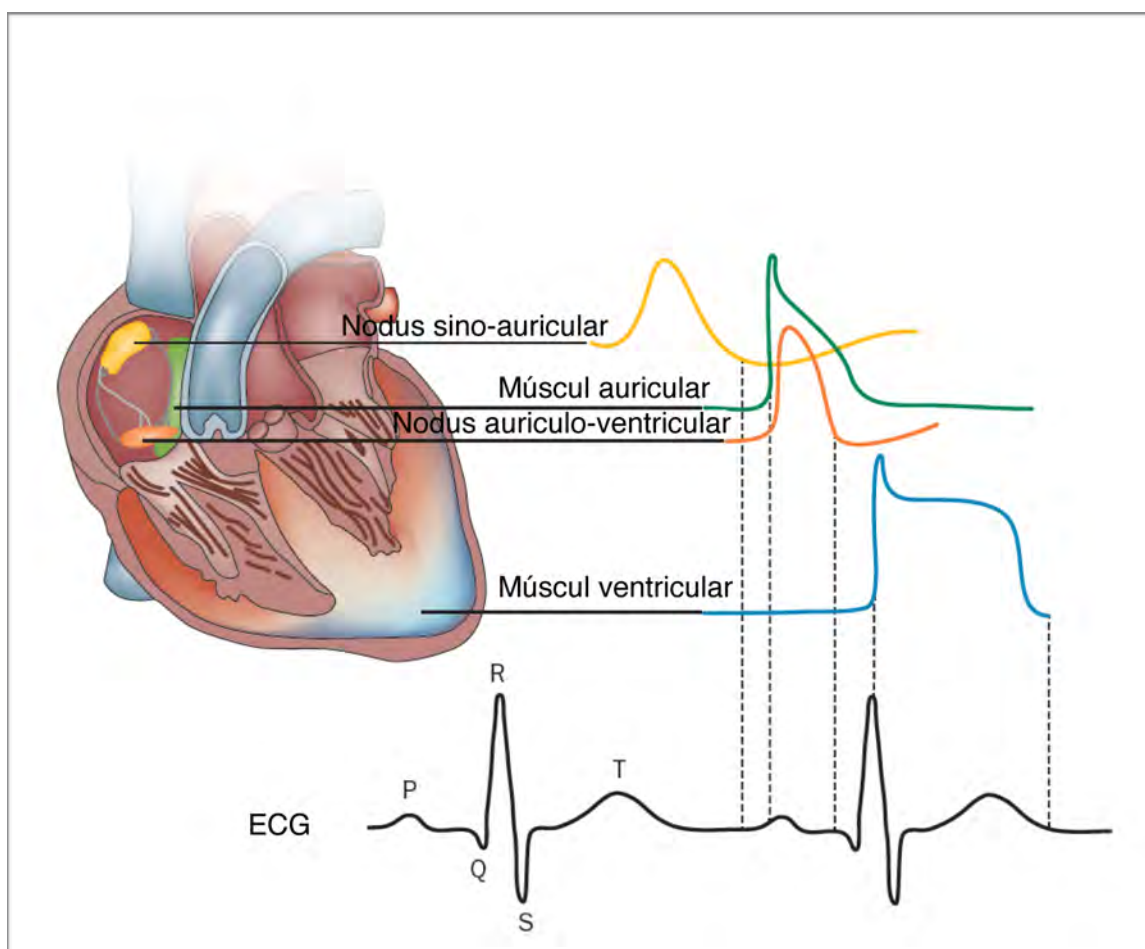
l'ECG pot mostrar alteracions que poden ser una petita alteració del ritme cardíac sense cap tipus d'importància o bé poden ser un marcador de malaltia cardíaca, ja sigui per lesió anatòmica o bé electrofisiològica, proporcionant una informació molt valuosa pel diagnòstic i tractament, especialment en el cas de les arítmies.

En un ECG es poden definir ones i intervals, i reflexa les diferents fases del PA

- Ones: s'anomenen ones a la successió de varis esdeveniments elèctrics repetitius. L'ona P correspon a la despolarització (fase 0) de les aurícules des del nòdul sinusal fins el nòdul auriculoventricular. Aquesta ona precedeix el complex QRS, que correspon a la despolarització ventricular, format per tres ones successives: ona Q, primera negativa; ona R, primera ona positiva del complex, i per últim l'ona negativa S. Qualsevol ona addicional, positiva o negativa, se l'anomenarà S', R' i així successivament. Seguidament al complex QRS es troba l'ona T corresponent a la repolarització ventricular. L'elevació del segment ST reflecteix el gradient transmural de voltatge durant la fase 2 del PAC.

- Intervals: els intervals es defineixen com la distància entre les ones. Els intervals QT, des de l'inici del complex QRS fins al final de l'ona T, corresponen a la despolarització i repolarització completa dels ventricles, i per tant a la duració del PAC ventricular. La seva prolongació o escurçament està vinculat en alguns casos a l'aparició d'una arítmia ventricular. L'interval QRS representa la duració de la despolarització del múscul ventricular. D'altra banda l'interval RR és la duració del ritme ventricular del cor. I per últim, l'interval PR és el temps entre l'inici de la P i l'inici del complex QRS, que ens indica el temps de la transmissió

dels impulsos elèctrics des de les aurícules als ventricles. Un PR curt indica que l'impuls s'origina en una zona diferent del nòdul sino-auricular, i un PR llarg indica que l'impuls es retarda mentre passa pel nòdul auriculoventricular(1,3).



**Figura 4- Activitat elèctrica del cor.** Correlació del diferents potencials d'acció a les diferents regions del cor i l'electrocardiograma(ECG). *Adaptada de Cardiac Electrophysiology per Douglas P Zipes i José Jalife*

### 1.4.2 Holter 24h

El *Holter* és un dispositiu electrònic de mida petita capaç d'enregistrar i emmagatzemar l'ECG del pacient durant almenys 24 hores. Normalment s'utilitza en pacients sospitosos de patir arítmies cardíques. Quan els símptomes són esporàdics el *Holter* convencional té una eficàcia limitada, ja que el període de

registre pot no coincidir amb el moment en que es manifesta el símptoma concret. En aquests casos s'utilitza un *Holter* implantable, de mida encara més reduïda, que es col·loca sota la pell i es manté allà fins el moment en que es produeix la incidència.

### **1.4.3 Ressonància magnètica nuclear**

La ressonància magnètica nuclear (RMN) és una tècnica d'imatge no invasiva. Utilitza un camp magnètic potent, polsos de radiofreqüència i una computadora per crear imatges detallades dels òrgans, teixits tous, ossos i pràcticament la resta d'estructures internes del cos. Mitjançant la RMN cardíaca es poden examinar l'estructura i la funció de les cavitats cardíques, així com fer-ne una caracterització del teixit, i identificar-ne les possibles lesions en el teixit del miocardiàc.

### **1.4.4 Ecocardiografia**

L'ecocardiografia és la tècnica d'imatge no invasiva més econòmica i àmpliament utilitzada, i que a nivell cardíac permet estudiar l'estructura i funció. Amb aquesta tècnica s'identifiquen les deficiències, parcials o totals, en la motilitat de les parets ventriculars (aquinesia/disquinesia), dilatació de les cavitats o disfunció sistòlica, entre altres(4).

## 2. Cardiomiòcits

### 2.1 Estructura i contractilitat

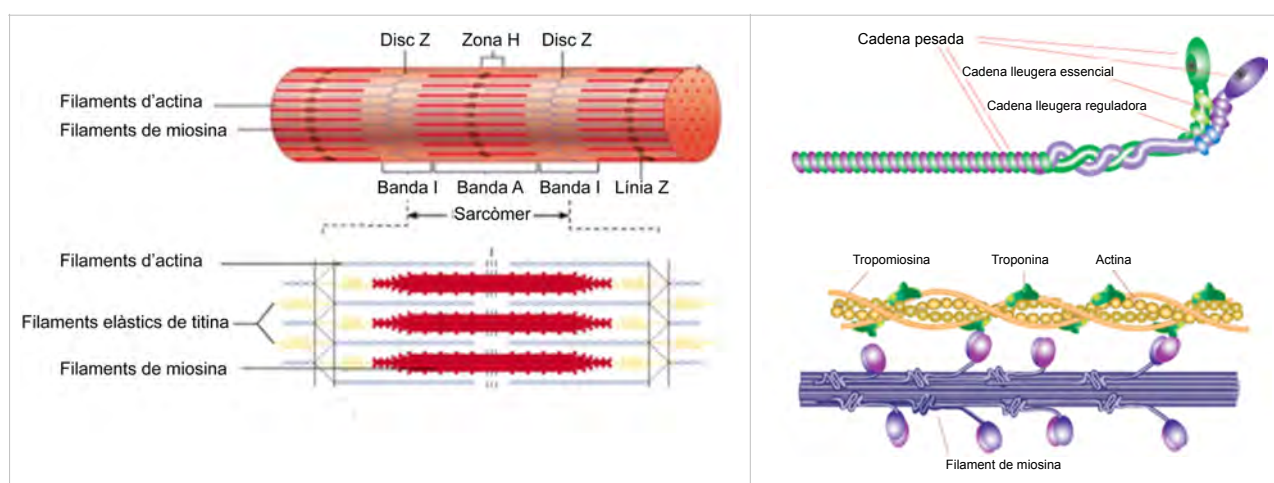
Els cardiomiòcits són cèl·lules musculars cardíques excitable que en resposta a un estímul generen un PAC associat a una resposta contràtil. Els cardiomiòcits presenten una morfologia cilíndrica amb el nucli central.

Durant la fase 2 del PAC, l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula els receptors de rianodina (RyR2) localitzats en la superfície del reticle sarcoplasmàtic i dispara l'alliberament de  $\text{Ca}^{2+}$  emmagatzemat en aquest orgànul. El  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat al citosol s'uneix a la troponina C i inicia el procés contràtil, connectant l'excitació elèctrica i la resposta contràtil (acoblament electromecànic). El moviment realitzat per aquests miòcits permetrà, gràcies a la contracció sincronitzada del miocardi, bombejar la sang a través dels vasos. Per tal de realitzar aquest bombeig amb l'eficiència necessària cal que es mantingui la unitat entre els miòcits i alhora se'n permeti la contracció. Aquesta dualitat s'aconsegueix gràcies a les estructures sarcomèriques, que són les unitats funcionals mínimes per a la contracció dels miòcits. Els sarcòmers, consten de bandes A, formades per miosina (filaments gruixuts), i bandes I, formades d'actina (filaments primers). Els filaments de miosina presenten una estructura característica, disposada de manera que es forma una cua llarga connectada a una regió globular (figura 5B). Aquesta regió globular conté lloc d'unió a ATP i actina. Cada filament de miosina està envoltant per 5 filaments d'actina. Aquests estan formats per dos cadenes de monòmers d'actina en doble



hèlix, juntament amb altres proteïnes com la tropomiosina (situada en el solc) i la troponina (formada per 3 subunitats i situada a l'extrem).

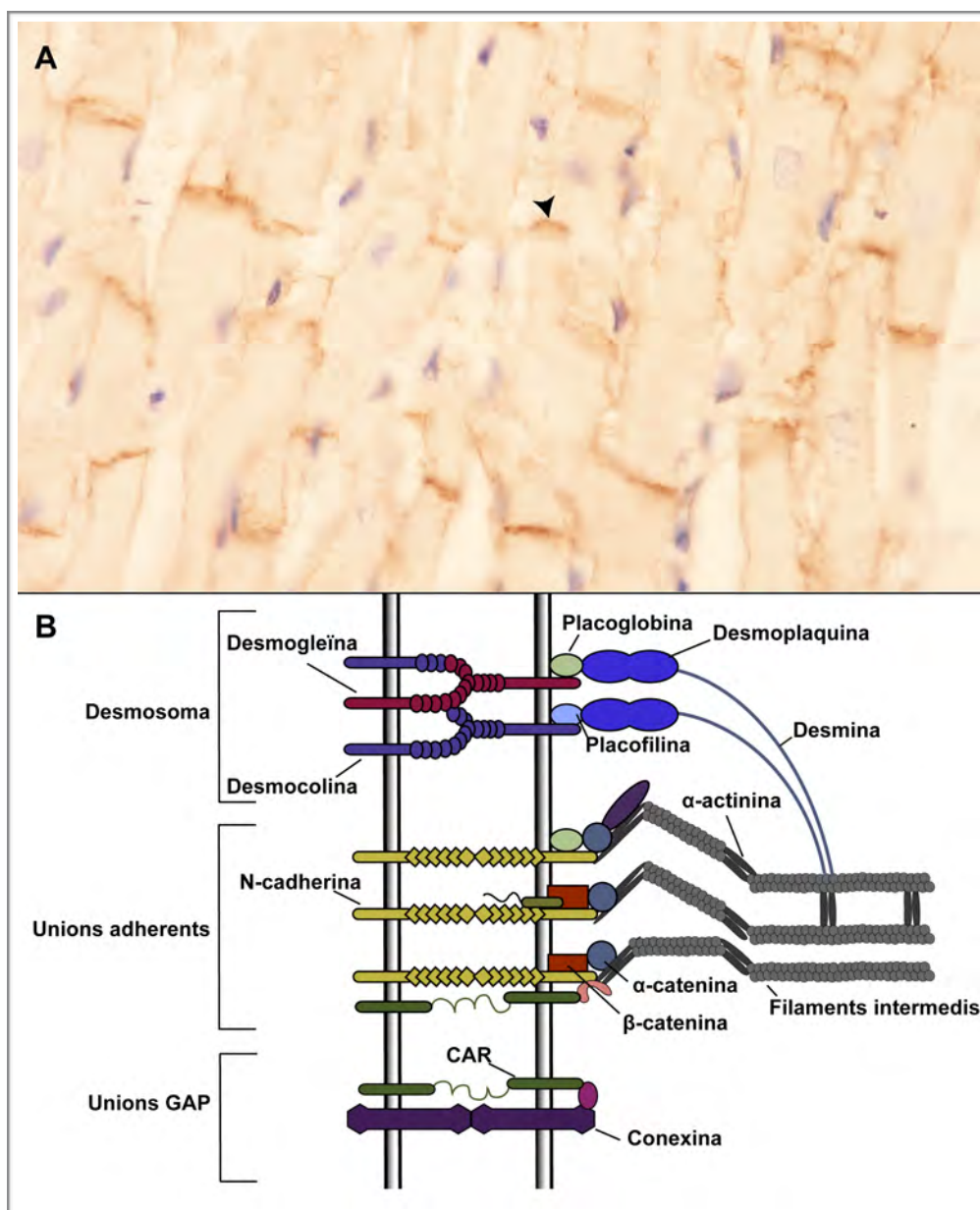
L'estructura que presenten aquests filaments és la responsable del mecanisme de contracció dels miòcits, on la regió globular de la miosina es desplaça pels filaments d'actina mitjançant una despesa d'ATP, fent que la banda I formada pels filaments d'actina redueixi la seva amplada. Així doncs, cada sarcòmer conté una banda A, formada per filaments de miosina que al desplaçar-se sobre els filaments d'actina produiran un apropament entre les dues que donarà lloc a la contracció muscular(5).



**Figura 5. A-** Representació de l'estructura sarcomèrica dels cardiomiòcits. **B-** Representació de la cadena de miosina. *Adaptada de Cardiac Electrophysiology per Douglas P Zipes i José Jalife*

## 2.2 Unions Cel·lulars: discos intercalars

Amb cada batec del cor, milions de cardiomiòcits treballen de manera sincronitzada per propagar l'excitació elèctrica i conduir la contracció muscular necessària per fer circular la sang amb eficàcia. Per tal de fer-ho, els cardiomiòcits es comuniquen físicament entre ells a través dels discos intercalars, formats per 3 tipus d'unions: les unions de tipus desmosomes, les unions adherents i les unions GAP. Les unions adherents i els desmosomes tenen com a funció mantenir la integritat del teixit; els desmosomes permeten mantenir la integritat del teixit en estrès mecànic i les unions adherents connecten els citosquelets de les cèl·lules veïnes; les unions GAP d'altra banda, permeten el pas dels ions i molècules petites entre cèl·lules adjacents, transmetent la senyal elèctrica(5).



**Figura 6-** Esquema de les unions del disc intercalar. **A.-** Imatge d'una secció de miocardi on es mostres els discos intercalars (fletxes). Tinció de nuclis (blau) i immunomarcatge anti-Cx43 (fletxes). **B.-** Representació de les 3 unions que formen els discos intercalars: desmosomes, unions adherents i unions GAP. *Adaptada de Nekrasova et al 2013. Trends in Cell Biology.*

## 2.2.1 Unions GAP

La conducció elèctrica cardíaca requereix la propagació eficient de la càrrega elèctrica d'una cèl·lula a l'altra. Les propietats fisiològiques essencials que afavoreixen aquest procés són l'excitabilitat de la membrana i la comunicació

intercel·lular. Les unions GAP són les responsables d'aquesta comunicació intercel·lular a través de canals que uneixen els dos citoplasmes adjacents. D'aquesta manera, es permet la sincronització de respostes mitjançant l'intercanvi de ions o petites molècules, que acabarà provocant la contracció del múscul cardíac. Les unions GAP estan formades per proteïnes transmembrana denominades conexines (Cx), que en grups de sis envolten el porus de la membrana formant un hemicanal o conexó. Dos conexons de cèl·lules adjacent s'alineen entre sí en l'espai extracel·lular per formar una unió GAP.

La distribució de les conexines (Cx40, 43, i 45) en el cor no és homogènia. Predomina la Cx43, amb l'excepció del NAV i parts del sistema de conducció. La Cx40 s'expressa en les aurícules, el sistema de conducció intraventricular proximal i en l'endoteli vascular coronari. El miocardi ventricular conté Cx43, localitzada principalment a nivell dels discos intercalars. La disposició geomètrica, mida i nombre d'aquests discos intercalars sembla determinant en la conducció(5).

### **2.2.2 Unions Adherents**

Les unions adherents tenen com a funció principal transmetre la força mecànica entre els cardiomiòcits adjacents. Proporcionen ancoratge entre els filaments intermedis i la superfície cel·lular. Estan formats per les proteïnes cadherines, concretament per les N-cadherines, que connecten les catenines (alfa i beta-catenines) als sarcòmers (figura 6B).

## 2.2.3 Desmosomes

Els desmosomes uneixen els filaments intermedis (FI) amb la membrana plasmàtica, formant un entramat que serà responsable de l'acoblament mecànic entre els miòcits adjacents. Els desmosomes estan formats bàsicament per tres famílies principals de proteïnes: les cadherines, les proteïnes armadillo i les plaquines.

### 2.2.3.1 Cadherines

Les cadherines són proteïnes transmembrana que permeten l'acoblament mecànic entre dues cèl·lules adjacents, en aquest cas els cardiomiòcits, entre les que s'hi inclouen la desmogleïna (DSG2) i la desmocolina (DSC2). Existeixen 3 isoformes de cadascuna de les cadherines que presenten una expressió específica de teixit i en ambdós casos la isoforma present en cardiomiòcits és la isoforma 2. desmocolina-2 i desmogleïna -2.

Les cadherines comparteixen una estructura similiar: un domini extracel·lular (ECs), que permetrà la unió extracel·lular amb una cadherina de la cèl·lula adjacent; un domini transmembrana (TM) i una cua citoplasmàtica. La cua citoplasmàtica conté el domini d'ancoratge intracel·lular i el domini ICS (*intracellular cadherin-like sequence motif*) que interaccionarà amb les proteïnes armadillo. La DSC2 presenta dues variants de *splicing* que difereixen en la llargada, DSC2a de 901 aa (99KDa) i una isoforma més curta, DSC2b de 847 aa (93KDa), a la que li falta el domini ICS. La DSG2 té una llargada 1118 aminoàcids (122 KDa) i conté, a

més a més dels dominis propis de les cadherines, un *linker* intracel·lular d'unió ric en prolina, el domini RUD; i el domini DTD, situat a l'extrem C terminal de la proteïna i ric en glicina(6).

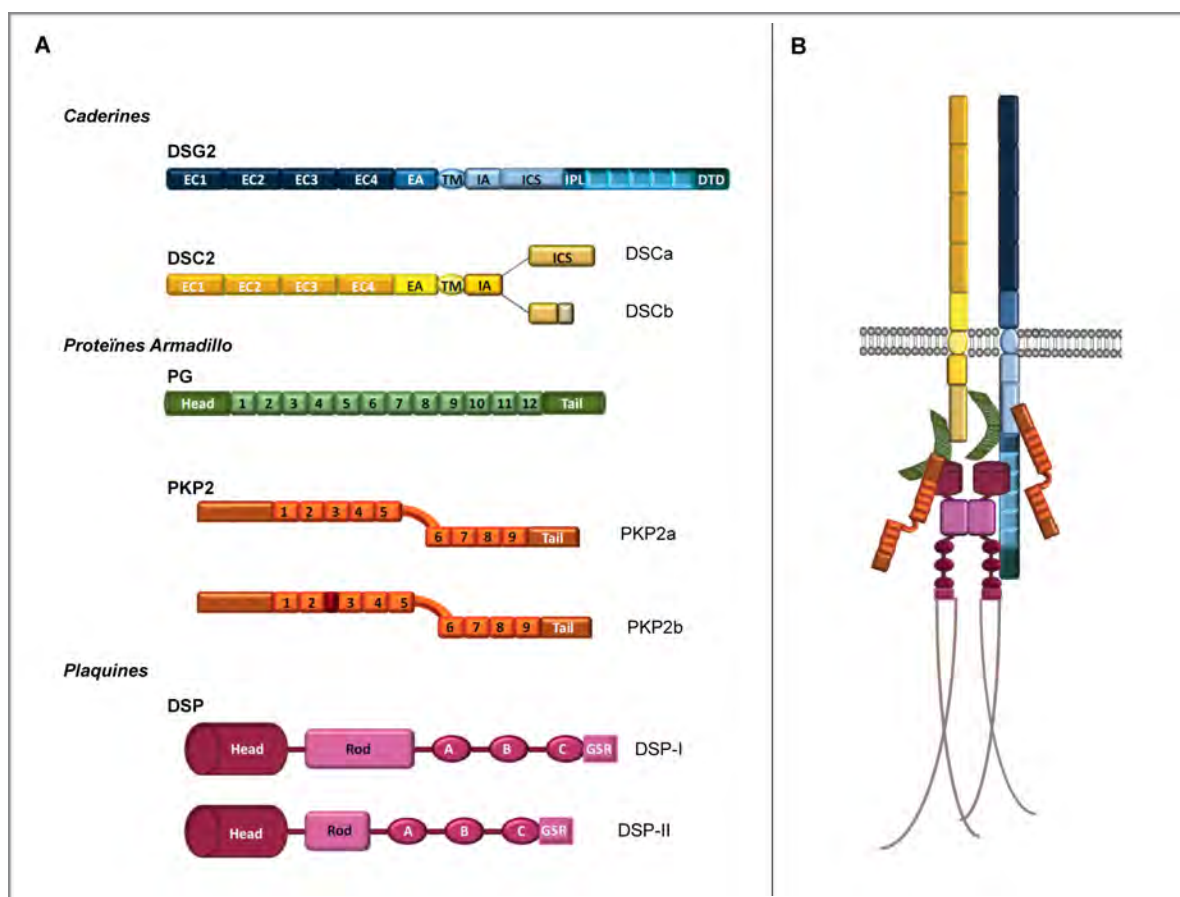
### **2.2.3.2 Proteïnes armadillo**

Les proteïnes armadillo, placofilina i placoglobina, permeten la unió entre les cues de les cadherines i la desmoplaquina. La PKP2 presenta dues isoformes que difereixen en la seva longitud, PKP2a està formada per 837 aminoàcids i PKP2b per 881 (91KDa). En concret, la isoforma PKP2a no conté els aminoàcids 460-503 de la isoforma PKP2b. PKP2 està formada per dos dominis principals: *head domain* (1-348) i el domini de repeticions armadillo (348-881). El *head domain* presenta una elevada variabilitat en la seqüència entre les diferents placofilines (PKP1, PKP2 i PKP3), tot i que presenta una seqüència consens HR2 comuna a totes elles(7). HR2 és crític per la majoria de les interaccions de PKP2 i s'ha descrit que és responsable i suficient per l'adreçament de la proteïna cap a la membrana plasmàtica(8). Tot i això, encara existeix certa controvèrsia al respecte, ja que existeixen treballs en els que es mostra que l'absència del domini armadillo impedeix a PKP2 localitzar-se correctament a la membrana plasmàtica(9,10). La interacció entre PKP2 i DSP té lloc mitjançant l'extrem N-terminal de PKP2 (8). El domini de repeticions armadillo (ARM) conté 8 repeticions, cadascuna d'elles està formada per 40 aminoàcids que sovint inclouen repeticions en tàndem (11).

La PG està formada per 745 aa (81,74KDa) i presenta 12 repeticions ARM en el seu domini armadillo (figura 7A). La PG interacciona directament amb els dominis citosòlics de les cadherines (DSC2 i DSG2), així com amb la desmoplaquina, permetent així la unió entre els desmosomes i els FI. La placoglobina, a diferència de la resta de proteïnes del desmosoma, també forma part de les unions adherents (figura 6B).

### **2.2.3.3 Desmoplaquina**

La desmoplaquina, membre de la família de les plaquines, és un component essencial en la placa citosòlica dels desmosomes. DSP conté una hèlix-alfa llarga que forma el domini rod, flanquejat per dominis globulars als extrems N i C-terminal. El domini N-terminal és el responsable de la unió amb la PG i PKP2, mentre que la regió C-terminal és la responsable de la unió amb els filaments intermedis. Existeixen dos isoformes de DSP: DSP-I i DSP-II. A DSP-II li falta aproximadament dos terços de l'hèlix alfa del domini rod. D'aquesta manera DSP-I està formada per 2871 aa (331,774 KDa), mentre que DSP-II en conté 2272 aa (260,119 KDa).



**Figura 7- Proteïnes del desmosoma i estructura.** **A-** Representació de les proteïnes desmosòmiques, amb els seus corresponents dominis. **B-** Representació de l'estructura d'un hemidesmosoma. *Adaptada de Nebrasova et al 2013. Trends in Cell Biology*

### 2.2.3.4 Estructura del desmosoma

Aquestes proteïnes s'organitzen de manera que formen dues grans estructures dins del desmosoma, la placa citosòlica i el complex transmembrana. El complex transmembrana, tal i com el seu nom indica, està format bàsicament per proteïnes transmembrana de la família de les cadherines, la DSC2 i la DSG2. Les cadherines intervenen en l'adhesió a través del seu domini extracel·lular que connecta directament amb els seus homòlegs de les cèl·lules adjacents; i serveixen de bastida per l'acoblament de la placa citosòlica a través dels dominis citoplasmàtics. La placa citosòlica està formada principalment per DSP, associada a la PKP2 i PG,



que interacciona amb les cues citosòliques de les cadherines. D'altra banda, DSP completarà la interacció amb els filaments intermedis a través del seu extrem C-terminal. La unió física dels filaments intermedis amb els desmosomes propaga la resistència a la tracció, impartida pels filaments intermedis del citosquelet a través de tot el teixit, essencial per la integritat del miocardi(12).

### **2.2.3.5 Formació dels desmosomes**

La formació dels desmosomes consta de dues fases seqüencials: l'acoblament del complex transmembrana i l'acoblament de la placa citosòlica. En la primera, durant l'acoblament del complex transmembrana es produeix el transport conjunt de les cadherines i les proteïnes armadillo (PKP2 i PG), i posteriorment l'ancoratge a la membrana plasmàtica on les proteïnes armadillo interaccionaran amb les cues citosòliques de les cadherines. Per tal de ser transportades des de l'aparell de Golgi fins a la membrana plasmàtica, aquestes proteïnes seran integrades en vesícules que es transportaran a través dels microtúbuls sota la direcció de proteïnes de la família de les quinesines(6). Les cadherines, DSC2 i DSG2, tenen mecanismes de transport diferents(13). Les vesícules que contenen DSC2 són dirigides per la quinesina-2 i transporten també PG, mentre que el transport de les vesícules que contenen DSG2 està controlat per quinesina 1, i necessita pel seu transport no només PG sinó també PKP2(13). És a dir, PG serà transportada per les dues vies; en vesícules que contenen DSG2 i PKP2 (controlades per quinesina 1) i en vesícules que contenen DSC2 (controlades per quinesina 2). Una vegada

les cadherines i les proteïnes armadillo es situen a les immediacions de la superfície cel·lular, un complex important per l'adreçament i ancoratge de les vesícules post-Golgi a la membrana plasmàtica (exocyst Sec 3 associat a desmosomes), facilitarà la fusió de les cadherines a la membrana plasmàtica(13,14).

En la segona fase es produeix l'acoblament de la placa citosòlica, on PKP2 hi té un paper clau en la seva regulació. Aquesta fase consisteix en dos processos paral·lels: el primer, el reclutament dels complexos PG-PKP2 a la membrana plasmàtica, que atrauran les molècules de DSP lliures cap a la zona; i el segon, la co-localització de PKP2 amb els precursors de DSP, formant els complexos DSP-PKP2, que promouen la seva translocació mitjançant l'estabilització del complex format per DSP i la proteïna quinasa C alfa (PKCa) per tal de modular la interacció entre DSP i els filaments intermedis(15). Aquesta translocació es completarà gràcies a la reorganització de l'esquelet d'actina, realitzada per maquinaria RhoA interaccionant amb PKP2 a les immediacions de membrana plasmàtica, afavorint així la una translocació eficient dels complexos DSP-PKP2 als desmosomes en formació(16).

### **3. Mort Soltada Cardíaca**

Les malalties cardiovasculars poden afectar a diferents elements del sistema circulatori, ja siguin vasos sanguinis o al cor pròpiament. En el cas de que afectin directament al cor, la descompensació del ritme cardíac o arítmia es presenta amb una incidència elevada en la població i la seva manifestació clínica més temuda és la mort sobtada (MS). La MS és definida com aquella mort natural que succeeix durant la primera hora des de l'inici dels símptomes fins el seu desenllaç final. Quan aquesta MS té un origen cardíac se la denomina mort sobtada cardíaca (MSC) i és produïda en la majoria dels casos per una fibril·lació auricular (FV) subjacent. En el desenvolupament de la MSC és necessari un substrat (la malaltia) i un detonant, com l'exercici físic o estrès emocional, que provoqui una inestabilitat cardíaca que desencadeni l'arítmia fatal. La MSC presenta una incidència de 50-100 en 100.000 en població general(17).

#### **3.1 Epidemiologia de la mort sobtada**

La incidència de MSC augmenta significativament amb l'edat, independentment del gènere i l'origen ètnic. La incidència en un home de 50 anys seria de 1 per 1000, mentre que per un home de 75 anys seria de 8 per 1000 (18). Malgrat el risc augmenta amb l'edat, la MSC té una presència important en el grup dels joves, entre els quals l'impacte social generat és superior.

A qualsevol edat, la incidència de MSC és superior en homes que en dones. Aproximadament dos terços de les dones que presenten MSC no tenen història de malaltia cardíaca prèvia, mentre que sí la tenen el 50% dels homes. D'altra banda, entre els supervivents a una aturada cardíaca i pacients de MSC, les dones semblen tenir cors estructuralment normals amb una major prevalença. Existeixen també diferències en la incidència de la MSC en funció de l'ètnia racial. La raça negra presenta de mitjana, tant homes com dones, una edat d'aparició de la primera aturada cardíaca inferior que en la raça caucàsica(18).

L'etiologia de la MSC és diversa, i cal tenir en compte que entre un 15-25% de les aturades cardíques no tenen una causa pròpiament cardíaca, és a dir, es secundàries a traumatismes, hemorràgies, intoxicació per drogues, embolisme pulmonar, etc. Del total de MSC, aproximadament el 75-80% del casos s'atribueixen a malaltia coronària, tot i que la freqüència de malaltia coronària és molt menor en els grups d'edat més jove. Per exemple, seria d'aproximadament 25% en edat inferior a 30 anys (19) o només d'un 10% segona altres estudis (20).

Aproximadament un 15% de les MSC presenten un origen genètic, percentatge que augmenta en els grups més joves. Un 10% de les MSC són degudes a malalties estructurals del cor (fins a 40% en menors de 30 anys)(20), mentre que un 5% són per malalties arítmiques, degudes a anomalies en la transmissió elèctrica del cor(21).

## 3.2 Patologies associades a la mort sobtada

Les malalties que afecten el cor tenen entre elles diferent naturalesa, i en alguns casos el primer símptoma pot ser l'arítmia, comportant fins i tot la mort sobtada.

En el cas de les arítmies familiars, es poden classificar en dos grans grups segons la seva associació amb malalties cardíaques:

- *Cardiopatia intrínseca o primària*: on la base de l'arítmia es troba en les propietats elèctriques del cor.
- *Cardiopatia extrínseca o secundària*: on la base de l'arítmia es producte d'una cardiomiopatia familiar, caracteritzada per hipertròfia, dilatació o infiltració fibroadiposa.

Les cardiopaties primàries reben el nom de canalopaties, ja que són aquelles que presenten algun tipus de disfunció elèctrica degut a una alteració en algun dels canals iònics, però amb un cor anatòmicament normal. A més, algunes de les canalopaties no estan acompanyades d'alteracions en l'ECG basal, dificultant-ne el diagnòstic. D'altra banda, les miocardiopaties (cardiopaties secundàries) presenten alteracions estructurals macroscòpiques, és a dir, provoquen anomalies anatòmiques cardíaques. Existeixen diferents tipus de miocardiopaties i algunes d'elles són hereditàries, les més importants són la miocardiopatia hipertròfica (MCH), la miocardiopatia dilatada (MCD) i la miocardiopatia aritmogènica del ventricle dret (MAVD). La MCH es caracteritza per una hipertrofia total o parcial del miocardi sense dilatació de la cavitat, fent d'obstacle pel pas lliure de sang durant

la ejecció sistòlica. La MCH és un trastorn genètic relacionat amb múltiples mutacions a gens que codifiquen proteïnes del sarcòmer, unitat bàsica de fibres musculars. La MCD es caracteritza per la dilatació biventricular, especialment l'esquerra, amb una alteració significativa de la funció cardíaca. Finalment, la MAVD es caracteritza per substitució progressiva del miocardi del ventricle dret per teixit fibro-adipós, provocant una alteració en el sistema de conducció, arítmies ventriculars greus i fins i tot la mort sobtada.

### **3.3 Predisposició Genètica a la Mort Sobtada**

En els últims anys la genètica ha tingut un paper cada vegada més important en l'avanç de la medicina, també en la medicina cardiovascular. La cardiologia ha incorporat progressivament els avanços en genètica, fet que ha permès identificar nombrosos gens associats a malalties cardíques. Existeixen múltiples malalties cardíques que presenten un origen genètic, acompanyats o no de cardiopatia estructural, que poden predisposar a l'aparició d'arítmies i de MSC. Aquestes patologies són conseqüència d'alteracions en gens que codifiquen per 2 grans famílies de proteïnes:

A. Proteïnes implicades en l'estructura dels cardiomiòcits i la transmissió mecànica, associades a les cardiomiopaties

- *Proteïnes sarcomèriques*, s'encarreguen de generar les forces en els cardiomiòcits, associades a MCH.

- *Proteïnes del citoesquelet*, s'encarreguen de la transmissió de la força entre cèl·lules adjacents, associades a miocardiopatia dilatada (MCD).
- *Proteïnes desmosòmiques*, s'encarreguen de l'acoblament mecànic entre les cèl·lules adjacents, associades a miocardiopatia aritmogènica de ventricle dret (MAVD).

B. Proteïnes de canals iònics, s'encarreguen de mantenir l'equilibri iònic intra i extracel·lular, associades a les diferents canalopaties.

- *Canals de sodi*: tenen un paper clau in l'inici del PAC, intervenint en la fase de despolarització (fase 0). Disfuncions en aquests canals estan associats a tres malalties: la síndrome de QT llarg (LQT), la síndrome de Brugada (BS) i la síndrome de Lev-Lenègre.
- *Canals de potassi*: intervenen en la fase de repolarització (fase 3) del PAC. Disfuncions en aquests canals poden resultar en tres malalties: la LQTs , la síndrome de QT curt (SQTs) i la FA.
- *Canals de calci*: intervenen en la fase de l'altiplà (fase 2) del PAC. Disfuncions en aquests canals estan associats a la taquicàrdia ventricular polimòrfica, la síndrome de Timothy i a la combinació de la SB i de SQTs.

### **3.3.1 Canalopaties**

#### **3.3.1.1 Síndrome de QT llarg (LQTs)**

La síndrome de QT llarg és una de les principals causes de la mort sobtada entre els joves. Pot ser congènita o adquirida, generalment associada a fàrmacs i desequilibri hidroelectrolític(22). La manifestació clínica pot ser diversa, des de síncope ( un síncope cardíac és una pèrdua temporal de la consciència amb una recuperació espontània completa), convulsions, arítmies ventriculars, FV i típicament, *torsades de pointes*(23).

La forma congènita s'associa a alteracions genètiques en canals iònics de sodi, per un retard en l'entrada de sodi al miòcit; o en canals de potassi, per una disminució dels corrents repolaritzadors. També algunes proteïnes associades a aquests canals s'han associat a LQTs (taula 1).

#### **3.3.1.2 Síndrome de Timothy**

La síndrome de Timothy és un tipus de QT llarg on les alteracions genètiques es troben en el gen *CACNA1C* que codifica pel canal de calci Cav1.2. Aquest tipus de QT llarg és molt poc freqüent però molt letal.

#### **3.3.1.3 Síndrome de Brugada (BS)**

La BS va ser descrita l'any 1992(24), i es caracteritza per la troballa electrocardiogràfica, caracteritzada per una elevació del segment ST en les derivacions V1-3, sense cardiopatia estructural associada. La mitjana d'edat d'inici



de les manifestacions clíniques es situa al voltant dels 40 anys, malgrat que la MSC pot afectar a persones de totes les edats, especialment homes (75%). Dels pacients afectats per aquesta síndrome, entre el 20-50% presenten antecedents de MSC familiar. La BS majoritàriament s'associa a variacions genètiques en els canals de sodi, malgrat també poden trobar-se en altres canals. Així doncs, entre 20-25% dels pacients afectats per BS presenten una variació genètica al gen *SCN5A*, que codifica pel canal de sodi cardíac depenent de voltatge 1.5 (Nav 1.5). (25) La pèrdua de funció del canal de sodi provoca un tancament prematur del canal o bé que aquest no s'activi, provocant un escurçament de la fase 1 del PAC. Aquest fet pot acabar generant arítmies per reentrada(26).

**Taula 1.** Gens associats a canalopaties

Malaltia	Gen	Proteïna	Efecte de la mutació
Síndrome de QT llarg	<i>KCNQ1</i> (11p15.5)	Canal de potassi depenent de voltatge. (KV1.7)	Pèrdua de funció, disminució I <sub>Ks</sub>
	<i>KCNH2</i> (7q35)	Canal de potassi depenent de voltatge. (KV11.1; HERG)	Pèrdua de funció, disminució I <sub>Kr</sub>
	<i>SCN5A</i> (3p21)	Canal de sodi depenent de voltatge Nav1.5)	Deficiència en la inactivació, increment en la I <sub>Na</sub>
	<i>ANK2</i> (4q25)	Anquirina 2	Localització deficient dels transportadors de ions
	<i>KCNE1</i> (21q22.1)	Proteïna accessòria del canal de potasi depenent de voltatge	Reducció de la I <sub>Ks</sub>
	<i>KCNE2</i> (21q22.1)	Proteïna accessòria del canal de potasi depenent de voltatge	Reducció de la I <sub>Kr</sub>
	<i>CAV3</i> (3p25)	Caveolina 3	Increment persistent de I <sub>Na</sub>
	<i>SCN4B</i> (11q23)	Subunitat b del canal de sodi depenent de voltatge	Increment persistent de I <sub>Na</sub>

Malaltia	Gen	Proteïna	Efecte de la mutació
	<i>SNTA1</i>	Sintrofina 1	Increment persistent de $I_{Na}$
	<i>KCNJ5</i>	Canal de potassi Kr3.4	Reducció de $I_{K, ACh}$
<b>Síndrome de Timothy</b>	<i>CACNA1C</i>	Canal de calci depenent de voltatge Cav1.2	Guany de funció, increment de $I_{Ca}$
<b>Síndrome de QT curt</b>	<i>KCNQ1</i>	Canal de potassi depenent de voltatge. (KV1.7)	Guany de funció, increment de $I_{Ks}$
	<i>KCNH2</i>	Canal de potassi depenent de voltatge. (KV11.1; HERG)	Guany de funció, increment de $I_{Kr}$
	<i>KCNJ2</i>	Canal de potassi Kir2.1	Guany de funció, increment de $I_{K1}$
	<i>CACNA1C</i>	Canal de calci depenent de voltatge Cav1.2	Pèrdua de funció, disminució $I_{Ca}$
	<i>CACNB2</i>	Subunitat del canal de calci depenent de voltatge	Pèrdua de funció, disminució $I_{Ca}$
	<i>CACNA2D1</i>	Subunitat del canal de calci depenent de voltatge	Pèrdua de funció, disminució $I_{Ca}$
<b>Síndrome de Brugada</b>	<i>SCN5A</i>	Canal de sodi depenent de voltatge. (Nav1.5)	Pèrdua de funció, disminució $I_{Na}$
	<i>GPD1L</i>	glicerol 3.-fostatasa-deshidrogenasa	Disminució $I_{Na}$
	<i>SCN1B</i>	Subunitat b del canal de sodi depenent de voltatge	Disminució $I_{Na}$
	<i>SCN3B</i>	Subunitat b del canal de sodi depenent de voltatge	Disminució $I_{Na}$
	<i>KCND3</i>	Canal de potassi depenent de voltatge Kv4.3	Guany de funció, increment de $I_{to}$
	<i>KCNE3</i>	Proteïna accessòria del canal de potassi depenent de voltatge.	Increment de $I_{to}$
	<i>KCNE5</i>	Proteïna accessòria del canal de potassi depenent de voltatge.	Increment de $I_{to}$

Malaltia	Gen	Proteïna	Efecte de la mutació
	<i>CACNA1C</i>	Canal de calci depenent de voltatge Cav1.2	Pèrdua de funció, disminució $I_{Na}$
	<i>KCNJ8</i>	Canal de potassi Kir6.1	Guany de funció, increment de $I_{K,ATP}$
<b>Taquicardia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica</b>	<i>RYR2</i>	Receptor de rianodina cardíac	Guany de funció, increment de l'alliberament de calci del reticle sarcomplasmàtic
	<i>CASQ2</i>	Calsequestrina 2	Guany de funció, increment de $I_{K,ATP}$
	<i>TRDN</i>	Triadina	Deficiència en la regulació de l'alliberament de calci del reticle sarcomplasmàtic

### 3.3.1.4 Síndrome de Lev-Lenègre

La síndrome de Lev-Lenègre és una malaltia rara que es caracteritza per una alteració del sistema de conducció que pot conduir a arítmies ventriculars i asistòlia. L'any 1995 es va associar a per primera vegada a un alteració cromosòmica (19q13.2-13-3)(27), i posteriorment també al gen *SCN5A*(25).

### 3.3.1.5 Síndrome de QT curt (SQTs)

La SQTs va ser descrita l'any 2000, i es caracteritza per presentar un interval de QT < 330ms, amb una ona T alta i punteguda. L'edat d'aparició de les primeres manifestacions clíniques poden presentar-se des de la infància, amb símptomes com FA, arítmies ventriculars, síncope i la mort sobtada(28). L'origen genètic de la SQTs, va ser descrit l'any 2004, i actualment s'han associat 3 gens que codifiquen per canals de potassi (taula 1).

### **3.3.1.6 Fibril·lació auricular (FA)**

La fibril·lació auricular és l'arítmia més comunament observada en la pràctica clínica. La prevalença és d'1% en la població, i augmenta amb l'edat. L'any 1997 es va descriure per primera vegada com a malaltia genètica amb un patró d'herència autosòmic dominant(29). S'han associats 4 canals de potassi a la fibril·lació auricular (KCNQ1, KCNE2, KCNJ2 i KCNH2) malgrat que sembla que els factors ambientals són determinants en la seva manifestació(30).

### **3.3.1.7 Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica (TVPC)**

La TVPC és un trastorn aritmogènic familiar caracteritzat per una taquicàrdia ventricular bidireccional i polimòrfica, desencadenada únicament per un estímul adrenèrgic (exercici vigorós, por, etc), amb una elevada mortalitat (del 30% als 30 anys d'edat)(31). S'han identificat dos tipus d'herència: autosòmica dominant, causada per alteracions genètiques en el gen del receptor de rianodina (*RyR2*); i autosòmica recessiva, causada per alteracions genètiques en el gen de la calseqüestrina (*CASQ2*). En els dos casos les proteïnes estan relacionades amb la regulació del calci intracel·lular, l'alteració genètica provoca un augment en la seva funció, generant un increment en la sortida de calci del reticle sarcoplasmàtic. Aquest fet acabarà conduint a l'aparició de despolaritzacions tardanes que faciliten les arítmies(32).

### 3.3.2 Cardiomiopaties

#### 3.3.2.1 *Miocardiópatia hipertròfica (MCH)*

La MCH és una malaltia caracteritzada per una hipertròfia asimètrica del ventricle esquerre, amb una desorganització de miòcits i fibrosis. És l'alteració genètica cardiovascular més comuna (1/500), afectant joves i nens. La manifestació clínica inclou inicialment disfunció sistòlica, i sistòlica-diafistòlica en els estats més avançats de la patologia, conduint a una insuficiència cardíaca o a la MSC. La MCH va ser descrita per primera vegada l'any 1958, però fins l'any 1989 no es va descriure el primer gen associat a la malaltia, des d'aleshores s'han associat diferents gens a la MCH (taula 2). Es considera una patologia familiar en el 90% dels casos, amb un patró d'herència autosòmic dominant

#### 3.3.2.2 *Miocardiópatia dilatada (MCD)*

La MCD està caracteritzada per una dilatació ventricular que comportarà l'alteració de la funció sistòlica, principalment en el ventricle esquerre. Els pacients poden presentar símptomes d'insuficiència cardíaca, palpitations, o la MSC. La prevalença de la MCD és de 1/2.500 persones. La MCD va ser descrita com a una patologia genètica l'any 1994, quan es va associar el primer *locus*(33). Actualment, es considera que la MCD és hereditària en, al menys, un 35% dels casos(34). Existeixen 2 tipus d'herència en la MCD: autosòmica dominant i lligada al cromosoma X (gen *DMD*).

### 3.3.2.3 Miocardiopatia aritmogènica de ventricle dret (MAVD)

La MAVD es caracteritza per la substitució fibroadiposa progressiva del miocardi, especialment del ventricle dret. Presenta una prevalença de 1/5.000 persones amb una elevada incidència entre els homes (80% dels casos), la majoria diagnosticats abans dels 40 anys per l'aparició arítmies, síncope o per la pròpia MSC. Presenta un origen genètic en aproximadament el 60% dels casos, amb un patró d'herència autosòmic dominant en la majoria de casos, malgrat també s'ha descrit un patró autosòmic recessiu. La MAVD és l'objecte d'estudi d'aquesta tesi, per aquest motiu es fa una descripció detallada de la patologia en el capítol 5.

**Taula 2.** Principals gens associats a les cardiomiopaties

Malaltia	Gen	Proteïna
<b>Miocardiopatia hipertròfica</b>	<i>MYH6</i>	Miosina 6
	<i>MYH7</i>	Miosina 7
	<i>MYBPC3</i>	Proteïna C d'unió a miosina
	<i>MYL2</i>	Miosina cardíaca, cadena lleugera 2
	<i>MYL3</i>	Miosina cardíaca, cadena lleugera 3
	<i>TNNT2</i>	Troponina T (tipus 2)
	<i>TNNI3</i>	Troponina I (tipus 3)
	<i>TPM1</i>	Tropomiosina
	<i>ACTC</i>	Alfa actina cardíaca
	<i>TTN</i>	Titina
	<i>TNNC1</i>	Troponina C (tipus 1)
	<i>CRP3</i>	Proteïna C reactiva 3
	<i>TCAP</i>	Teletonina
<b>Miocardiopatia dilatada</b>	<i>MYH6</i>	Miosina 6
	<i>ACTC</i>	Alfa actina cardíaca
	<i>TNNT2</i>	Troponina T (tipus 2)

Malaltia	Gen	Proteïna
	<i>TPM1</i>	Tropomiosina
	<i>TTN</i>	Titina
	<i>TCAP</i>	Teletonina
	<i>DMD</i>	Distrofina
	<i>DES</i>	Desmina
	<i>VCL</i>	Metavinculina
	<i>TAZ</i>	Tafazina
	<i>LMNA</i>	Lamina A/C
	<i>PLN</i>	Fosfolamban
<b>Miocardiopatia aritmogènica de ventricle dret</b>	<i>PKP2</i>	Placofilina-2
	<i>DSP</i>	Desmoplaquina
	<i>DSG2</i>	Desmogleïna-2
	<i>DSC2</i>	Desmocolina-2
	<i>JUP</i>	Placoglobina
	<i>TTN</i>	Troponina
	<i>TMEM43</i>	Proteïna transmembrana 43
	<i>PLN</i>	Fosfolamban
	<i>LMNA</i>	Lamina A/C
	<i>DES</i>	Desmina
	<i>TGFB3</i>	Factor de creixement beta 3
	<i>CTNN3</i>	Catenina 3

## 4. Diagnòstic genètic

### 4.1 Conceptes generals

#### 4.1.2 Les variants genètiques

El genoma humà conté aproximadament 3.000 Mb de DNA, de les quals 1200Mb són gens (o seqüències relacionades amb gens) i només 48Mb són regions exòniques. Aproximadament l'1,5% del genoma humà correspon a regions gèniques codificants(35), aquests gens es troben distribuïts en 23 parelles de cromosomes (22 autosòmics i 1 parell sexual), a més d'un únic cromosoma mitocondrial. Cada parella de cromosomes homòlegs, conté una còpia diferent dels mateixos gens (denominada al·lel).

El 99% del genoma humà és idèntic entre individus, i només un 1% presenta diferències entre individus. Les variants genètiques es poden presentar des d'una variant d'un sol nucleòtid fins a grans fragments cromosòmics. Aquestes variants entre individus són les responsables de les diferències individuals dins de la mateixa espècie, i per tant són el substrat del procés evolutiu. També però, poden ser les causants de a malalties o predisposar-hi.

Aquestes variants genètiques es poden classificar segons la freqüència que presenten en la població general, en concret segons la freqüència de l'al·lel minoritari (MAF):

Tipus de Variant	MAF (%)
<i>Molt comuna</i>	Entre 5-50%



Tipus de Variant	MAF (%)
<i>Comuna</i>	Entre 1-5%
<i>Rara</i>	Menys d'un 1%
<i>Privada</i>	Exclusiva d'una família

Un elevat percentatge de les variants genètiques corresponen a variants d'una sola base (de l'anglès, *single nucleotide variation*, SNV). Les SNV són, per tant, comunes en el genoma humà. Quan es troben de manera freqüent en la població, és a dir, quan l'al·lel minoritari es troba en una freqüència igual o superior a l'1%, se'ls anomena polimorfismes d'una sola base, (de l'anglès, *single nucleotide polymorphism*, SNP), mentre que les variants amb una freqüència inferior se les denominaran variants rares (o mutacions<sup>1</sup>). Dins de les variants d'una base que es troben dins la zona codificant o exònica, es distingeixen dos grups: variants amb sentit (o *missense*) i variants sense sentit (o *nonsense*).

- Les variants amb sentit (o *missense*) són aquelles en les que en substituir-se una base per una altra és produeix un canvi en el codó, i per tant poden produir un canvi d'aminoàcid. D'entre les variants amb sentit trobem dos subgrups, les variants sinònimes i les variants no sinònimes: les variants sinònimes són aquelles que el canvi de codó implica un canvi d'aminoàcid, mentre que les variants sinònimes són aquelles que el canvi de codó no varia l'aminoàcid. Això

---

<sup>1</sup>. Qualsevol canvi en el genoma es considera una variant genètica o mutació, tanmateix en algunes disciplines el terme mutació està directament relacionat amb la seva associació a una malaltia. En aquesta tesi el terme mutació es referirà a qualsevol variant genètica que presenti una freqüència inferior a l'1%, associada o no a una patologia.

és degut al fet de que el codi genètic es troba degenerat, és a dir, diferents codons codifiquen pel mateix aminoàcid.

- Les variants sense sentit (o *nonsense*) són aquelles en les que la substitució de la base provoca el canvi del codó per un codó d'aturada (o *stop*), i per tant, no es produirà un canvi d'aminoàcid sinó que es produirà l'aturada en la traducció de la proteïna, sintetitzant així una proteïna més curta de l'habitual o truncada.

A banda de les variants d'una sola base, existeixen també les insercions i delecions petites, és a dir, d'una o poques bases. Les insercions i delecions sovint, exceptuant les múltiples de 3 bases, provocaran un desplaçament en la pauta de lectura (o *frameshift*), i una aturada prematura (de l'anglès, *prematur termination codon*, PTC,) i per tant, una proteïna truncada.

Quan aquestes insercions o delecions són de mida gran (més de 1Kb) es consideren variants en número de còpies (de l'anglès, *copy number variant*, CNV), i pot afectar a part d'un gen o un gen sencer.

#### 4.1.2 Tipus d'herència

Quan la variant genètica afecta a la cèl·lula germinal o reproductiva, es transmetrà a les següents generacions per l'herència genètica. En el cas de les malalties hereditàries, poden ser:

1. Degudes a *alteracions cromosòmiques*, insercions o delecions d'una part del cromosoma o del cromosoma sencer.
2. *Malalties poligèniques*, on es deuen a la interacció de diferents gens.

3. *Malalties monogèniques*: només un gen és la causa de la malaltia, i el seu patró d'herència segueix les lleis de Mendel.

El tipus d'herència de les malalties congènites poden ser:

- *Autosòmica dominant*: el caràcter dominant de la malaltia significa que amb un sol al·lel que presenti l'alteració genètica ja s'origina la malaltia. La descendència tindrà un 50% de probabilitats de ser portadora de la malaltia si un dels pares està afectat. Tant els homes com les dones poden heretar i transmetre la malaltia.
- *Autosòmica recessiva*: aquest tipus d'herència requereix que els dos al·lells presentin l'alteració genètica per tal de que la malaltia es manifesti. Si els dos pares són portadors, la descendència tindrà un 25% de probabilitats de presentar la malaltia, i un 50% de possibilitats de ser-ne portador.
- *Lligada al cromosoma X*: Les dones són les portadores, al tenir dos cromosomes X. Els homes, al tenir només un cromosoma X, presentaran la malaltia si hereten el cromosoma X amb l'alteració genètica.
- *Mitocondrial*: sempre es transmeten per via materna, ja que el cromosoma mitocondrial prové sempre de la mare. D'aquesta manera no existeix la transmissió home-home.

### 4.1.3 Expressió dels gens

Els processos cel·lulars necessaris perquè un gen es tradueixi en una proteïna funcional per la cèl·lula tenen lloc en diferents compartiments cel·lulars. De manera seqüencial són la transcripció de gen a RNA, la maduració del transcrit i la traducció d'aquest transcrit a proteïna.

1. *Transcripció*: durant la transcripció genètica, les seqüències de DNA són copiades a RNA mitjançant un enzim anomenat RNA polimerasa. La transcripció produeix pre-RNA( o RNA no madur) com a primer pas de la síntesi de proteïnes.
2. *Maduració del RNA*: consisteix en el processament del pre-RNA. Entre altres processos, en aquesta fase té lloc el mecanisme d'*splicing* que permet l'eliminació dels introns i la unió dels exons, donant lloc al mRNA.
3. *Traducció*: consisteix en la descodificació de l'mRNA per part dels ribosomes per tal de produir una cadena d'aminoàcids específica o polipèptid que, més tard serà plegada fins a ser una proteïna activa. La descodificació és possible gràcies al codi genètic: les regions exòniques estan formades per seqüències nucleotídiques que formen triples, cada triplet o codó, codifica per un aminoàcid; i serà durant el procés de traducció de la proteïna a partir del transcrit madur que es sintetitzarà la proteïna. En el codi genètic existeixen 64 codons diferents que codifiquen per 20 aminoàcids, a més a més del codó d'inici ATG (metionina) i els tres codons d'atura (TAA, TGA i TAG). En alguns casos seran necessàries modificacions post-traduccionals (canvis químics de

diferents tipus als aminoàcids) per tal de que la proteïna sigui funcional.) Cal recordar també que no tots els gens codifiquen per proteïnes funcionals, ja que alguns donen lloc a tipus de RNA no codificant (non-coding RNA).

#### 4.1.4 Sistemes de vigilància

L'expressió gènica en cèl·lules eucariotes està estrictament regulada a diferents nivells. Alteracions en aquests mecanismes podrien comportar una expressió anormal del gen i per tant, una funció cel·lular aberrant. Aquest fet podria conduir a diferents malalties genètiques i càncers. Per tal d'augmentar aquesta fidelitat en cadascuna de les etapes de l'expressió gènica, les cèl·lules eucariòtiques han desenvolupat un sistema de vigilància altament conservat. En concret, en els casos de PTCs que apareixen en el mRNA, aquests mRNA aberrants estan subjectes a mecanismes de control del mRNA per tal de bloquejar-ne la seva expressió, ja que podrien traduir-se en proteïnes truncades.

El mecanisme més important en la vigilància dels PTC és el conegut com a *non-sense mediated mRNA decay* (NMD). El mecanisme de NMD està estretament lligat a la traducció, ja que la maquinària del NMD ha de reconèixer el codó d'aturada en el mRNA per la seva degradació. Aquest sistema té lloc durant la primera ronda de la traducció. El mRNA de nova síntesi madura (procés d'splicing) per tal d'unir els exons i eliminar-ne els introns, en aquest procés intervenen uns complexos proteics anomenats EJC (de l'anglès, *exon junction complex*) que es situen en les unions exó-exó. El mRNA madur (amb els EJC) és exportat del nucli

al citoplasma on serà reclutat pels ribosomes en la primera ronda de la traducció. La determinació de si un mRNA és normal o aberrant succeeix durant la terminació de la traducció, és a dir, els codons d'aturada normals es situen en l'últim exó. D'aquesta manera, els EJs es dissociaran en la fase d'elongació de la primera ronda de traducció. Els PTC seran reconeguts per diferents complexos proteics de la maquinària de la NMD, gràcies a presentar, a diferència dels naturals, complexos EJs *downstream* (36). Quan els PTC són detectats, l'mRNA serà degradat, evitant la síntesi de la proteïna truncada.

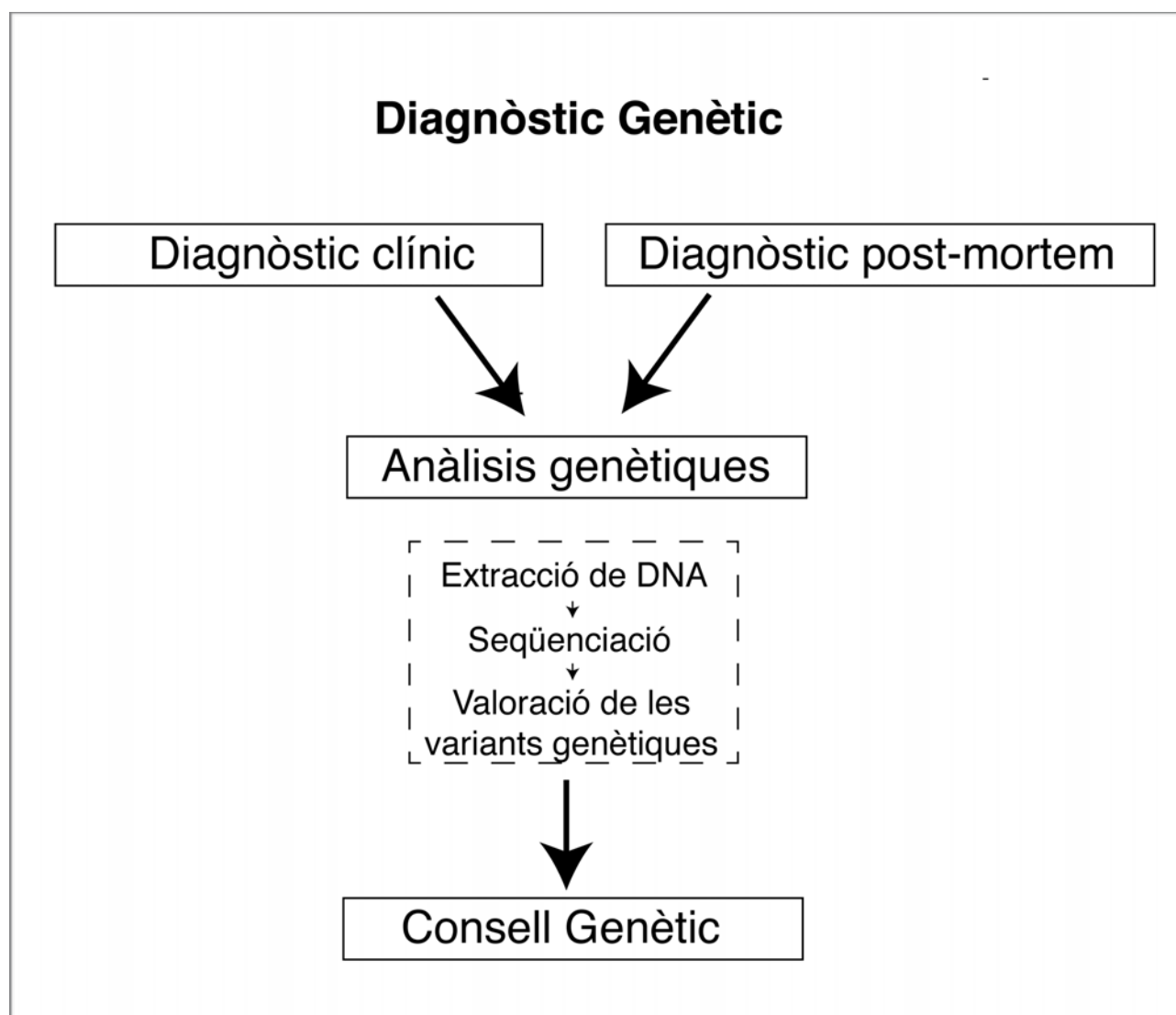
## 4.2 Anàlisis genètiques

El diagnòstic genètic és una disciplina que analitza les bases genètiques d'una malaltia i que permet obtenir la informació necessària per decidir com actuar davant de la patologia en termes de diagnòstic, tractament o estudi familiar. En alguns casos també pot incloure el diagnòstic prenatal o preimplantacional per evitar la transmissió de la malaltia a la seva descendència. El diagnòstic genètic es basa en dos processos principals: l'anàlisi genètica i el consell genètic.

L'anàlisi genètica és el conjunt de proves realitzades per detectar les variants genètiques en el DNA que comporten una malaltia genètica o un major risc de desenvolupar-la. L'anàlisi genètica consta bàsicament de 3 passos: l'extracció del DNA, la seqüenciació i anàlisi de les seqüències, i la valoració de les variants.

El consell genètic és un servei orientat a les persones i famílies que pateixin o estiguin en risc de patir la malaltia genètica, proporcionant-los informació sobre la

malaltia i suport per poder conèixer totes les opcions disponibles per la millor gestió de la situació.



**Figura 8-** Esquema diagnòstic genètic

### 4.2.1 Extracció DNA

L'extracció de DNA es pot realitzar a partir de qualsevol mostra de teixit de cos, habitualment si és possible s'utilitza el teixit sanguini. Les mostres sanguínies es processen de manera que es concentra la fracció cel·lular de la sang, descartant eritròcits i plaquetes mitjançant centrifugació. D'aquesta manera les cèl·lules amb

una velocitat de sedimentació més elevada, com les cèl·lules nucleades de la sang, quedaran concentrades. A aquestes cèl·lules se'ls indueix primer la lisis cel·lular i posteriorment se n'eliminarà la fracció proteica per precipitació química. Una vegada eliminades les restes cel·lulars i les proteïnes es procedirà a la precipitació i rehidratació del DNA.

## 4.2.2 Seqüenciació

### 4.2.2.1 Seqüenciació Sanger

La seqüenciació Sanger va ser desenvolupada per Frederick Sanger l'any 1977, i ha estat el mètode de seqüenciació de referència durant 25 anys. Actualment s'ha anat substituint progressivament per mètodes de seqüenciació de nova generació (*Next Generation Sequencing*, NGS), malgrat encara s'utilitza per obtenir seqüències de DNA de fins a uns 500 pb, especialment quan està dirigit a l'anàlisi d'un gen en concret.

La seqüenciació Sanger es basa en la incorporació selectiva de dideoxinucleotids terminadors (ddNTPs) per part de la DNA polimerasa durant la replicació. És a dir, durant la replicació s'obtenen molècules de doble cadena de DNA de totes les mides que hauran incorporat un ddNTP en el seu extrem 3' i haurà provocat la parada de la reacció degut a la falta del grup –OH en 3'. Aquest ddNTP a més es troba marcat amb un fluorocrom diferent per cada una de les 4 bases nitrogenades. La proporció de dNTP/ddNTP és vital per tal de que s'obtinguin cadenes de totes les mides possibles fins a la longitud total del



fragment amplificat i que difereixen entre elles en un sol parell de bases. Així doncs, al finalitzar la reacció obtindrem molècules de DNA de totes les mides marcades en el seu extrem 3'. El producte desnaturalitzat de DNA de cadena senzilla marcat fluorescentment en el seu extrem 3' es separa mitjançant electroforesis capil·lar, amb una resolució d'una sola base de diferència en longitud i identifica la última base de cadascuna. Això és possible ja que cada un dels quatre tipus de ddNTPs marcats produirà un color diferent al ser il·luminat pel làser de l'equip. Posteriorment el software generarà de manera automàtica la seqüència completa del fragment en qüestió que serà comparada amb la seqüència de referència.

### **4.2.2.2 MassARRAY Sequenom**

El sistema MassARRAY és un plataforma que ofereix un conjunt d'aplicacions en l'anàlisi genòmica utilitzant el sistema d'espectrometria de masses (MALDI-TOF). Consta de dues parts principals: el disseny de les reaccions i la detecció de les variants genètiques.

Un cop realitzada la selecció de les variants que es volen interrogar, es crea un arxiu amb fragments de 140 bases aproximadament, i es procedeix al disseny de l'assaig. Es realitza mitjançant el programa de disseny MassARRAY assay design 3.1 (Sequenom, Inc.), que agrupa les variants genètiques en multiplexes, és a dir, en reaccions de genotipat múltiple en un única reacció. El programa dissenya els encebadors per l'amplificació per PCR per cada una de les variants i l'encebador

per la reacció d'extensió. Els encebadors de la reacció d'extensió porten unides cues no homòlogues de diverses mides que fan possible crear diferències suficientment grans per analitzar els resultats per espectrometria de masses.

En la reacció d'extensió, l'encebador hibrida una base prèvia al locus d'estudi. El genotipat de la mostra es dur a terme per l'addició d'un ddNTP a l'encebador d'extensió, que serà complementari a la base d'estudi. Aquest ddNTP està modificat en massa de manera en què es mostra a la taula 3, amb la finalitat d'augmentar la diferència en massa entre les diferents seqüències esteses. Aquesta massa determinada, serà detectada per l'espectòmetre MALDI-TOF MS (*matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) que registra el temps de vol del producte d'extensió a l'interior d'una columna de buit, temps que s'associa a una massa que, alhora, està associada a un genotip.

**Taula 3-** Variacions en la massa dels ddNTPS

	Massa original (Da)	Massa modificada (Da)	Diferències en massa (Da)			
			Adenina	Citosina	Guanina	Timina
<b>Adenina</b>	313,2	360,1	————	24	-16	-55,9
<b>Citosina</b>	289,2	384,1	-24	————	-40	-79,9
<b>Guanina</b>	329,2	344,1	16	40	————	-39,9
<b>Timina</b>	304,2	304,2	55,9	79,9	39,9	————

#### 4.2.2.3 Sequenciació de nova generació (NGS)

La seqüenciació NGS engloba diferents tecnologies, amb un ampli ventall d'estratègies a l'hora d'identificar les variants genètiques en diferents gens al mateix moment, sempre basant-se en la seqüenciació massiva en paral·lel.

---

Tanmateix, les diferents plataformes de NGS poden diferir en la manera en què obtenen les seqüències.

### 4.2.3 Valoració de les variants

En l'anàlisi genètica d'una malaltia hereditària, en el cas d'aquesta tesi la MAVD, es tenen en compte totes les variants que presenten una freqüència de l'al·lel minoritari (MAF) per sota de l' 1% o bé que es descriuen per primera vegada són susceptibles d'estudi, ja que podrien ser les causants de la patologia.

Existeixen diferents bases de dades genètiques públiques on es recullen les variants genètiques identificades en diferents poblacions:

La base de dades 1000 genomes, llançada el 2008, cataloga les variacions genètiques humanes (<http://browser.1000genomes.org>)(37); així com també The Exome Sequencing Project(38). D'altra banda, també existeixen bases de dades on es recullen les variants genètiques que s'han associat prèviament a diferents patologies, com són The Human Gene Mutation database ([www.hgmd.org](http://www.hgmd.org))(39) o bé ARVD/C Genetic Variants Database ([www.arvcdatabase.info](http://www.arvcdatabase.info))(40), en la que es recullen específicament les variants associades a la MAVD. D'aquesta manera, les variants que ja han estat prèviament associades a la MAVD, són probablement responsables de la patologia o bé hi tenen un paper important. D'altra banda les variants de baixa freqüència i noves no associades amb anterioritat a la patologia poden ser analitzades per diferents plataformes *in silico*, que permetran estimar l'efecte que produeix el canvi aminoacídic en la proteïna en qüestió. Entre les

plataformes més utilitzades trobem Provean o Condel (que integra els resultats de SHIF, Polyphen-2, Mutation Assessor i Fathmm).

## 5. Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret

La MAVD va ser descrita per primera vegada per Fontaine et al. l'any 1978(41). Aleshores es va definir com a una patologia cardíaca associada a arítmies, com a conseqüència d'una substitució progressiva del miocardi per teixit fibro-adipós. La primera descripció clínica exhaustiva la van dur a terme Marcus et al l'any 1982 (42), que descriuen taquicàrdies ventriculars amb bloqueig de branca dreta (BBD). Posteriorment, l'any 1996, l'organització mundial de la salut (OMS) va classificar-la com a una miocardiopatia. La MAVD és una patologia cardíaca rara que presenta una prevalença de 1 entre 5000 en població general. Tanmateix, pot variar segons la població d'origen, ja que al nord d'Itàlia i Alemanya s'han descrit prevalences de fins a 20/5000(43), o segons el gènere, ja que els homes pateixen aquesta patologia en una proporció major que les dones (entre 1,6 i 3:1)(44).

La MAVD es caracteritza per la substitució progressiva del miocardi per teixit fibro-adipós al ventricle dret, tot i que quasi en un 50% dels casos afecta també el ventricle esquerre(45,46), donant lloc a l'afectació biventricular. Tot i això, també s'han descrits casos esporàdics on només hi ha una afectació del ventricle esquerra. La presència de teixit fibro-adipós provoca alteracions en la transmissió elèctrica (impuls elèctric), que en ocasions pot estar també associada a deficiència en la funció mecànica. Aquestes anomalies poden provocar arítmies ventriculars, síncope i fins i tot a la MSC (47,48). S'estima que la MAVD és responsable d'un 5% del total de les MSC que succeeixen anualment. Malauradament, en alguns

casos la pròpia mort sobtada es pot presentar com el primer símptoma de la patologia.

El rang d'edat en presentació del primer símptoma és molt ampli, i es situa entre els 20-60 anys d'edat. Malgrat aquest rang ampli en la presentació de símptomes derivats de la MAVD, l'edat mitjana de diagnòstic es situa al voltant dels 35-40 anys. En població menor de 35 anys però, la MAVD es considera la primera causa de MSC i és responsable de fins a un 15% dels casos(49), i molt especialment en joves atletes(50), ja que l'esport és un inductor d'arítmies letals en casos predisposats genèticament a patir la patologia.

### **5.1 Evidències Clíiques i Diagnòstic**

La MAVD presenta una elevada heterogeneïtat en la seva manifestació clínica; des de cors macroscòpicament normals a alteracions estructurals severes, presentant des d'una absència de símptomes fins a arítmies malignes i mort sobtada (48). És per aquest motiu que no existeix una prova diagnòstica definitiva, sinó que requereix un sistema de diagnòstic complex.

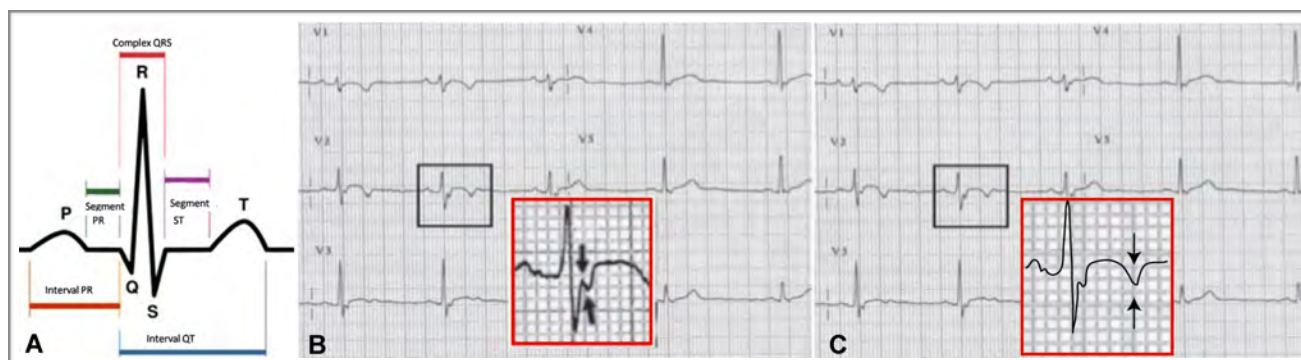
El diagnòstic clínic de la MAVD està basat en un sistema de puntuació, mitjançant els criteris anomenats Task Force (TF), resumits a la taula 4. Aquest sistema va ser proposat l'any 1994 per un grup d'experts(51) i és basa en la combinació d'una sèrie de defectes en les següents sis categories: (I) la morfologia i funció del ventricle dret; (II) anomalies característiques en el teixit; anomalies específiques observables a l'electrocardiograma (ECG), (III) en la repolarització i

en la (IV) despolarització; (V) arítmies, (VI) historia familiar. Els criteris TF es classifiquen en criteris majors i criteris menors en cadascuna d'aquestes sis categories. Els criteris majors comptabilitzen com a 2 punts mentre que els menors com a 1 punt, i s'estableix un diagnòstic de MAVD quan un pacient arriba als 4 punts. Els criteris TF van ser revisats i actualitzats l'any 2010 (52), quan també es va incloure els resultats genètics, establint com a criteri major la presència d'una variant genètica associada o probablement associada a la MAVD. Malgrat que aquests paràmetres són molt útils en els casos més greus, encara són limitats a l'hora de diagnosticar pacients en estadis més incipients de la malaltia. Per aquest motiu, altres tècniques de diagnòstic agafen cada vegada més protagonisme com a eines complementàries per al diagnòstic de la patologia com per exemple, l'estudi immunohistoquímic en biòpsies(53).

L'avaluació inicial dels pacients sospitosos de patir MAVD consisteix en una exploració física, la revisió de la història clínica (incloent els antecedents familiars d'arítmies, síncope o de mort sobtada), l' ECG, el monitoratge *Holter* de 24h i l'exploració dels dos ventricles mitjançant tècniques d'imatge no invasives. Quan els resultats de les tècniques d'imatge no invasives són suggestius però no diagnòstics de MAVD, podria ser necessari practicar proves complementàries com, una prova electrofisiològica o una biòpsia endomiocàrdica, per tal de finalment establir-ne el diagnòstic.

### 5.1.1 L'electrocardiograma en la MAVD

Mitjançant l'ECG estàndard de 12 derivacions, es poden observar anomalies en la majoria dels casos de MAVD(43,54). D'aquesta manera, tot i que un ECG normal no és excloent en el diagnòstic de MAVD, és extremadament estrany. L'alteració electrocardiogràfica més comuna és la inversió de l'ona T en la derivació precordial dreta (V1-V3) (figura 9C) i està considerada criteri major de diagnòstic (taula 4), mentre que la inversió de l'ona T només en V1-V2 és un criteri menor. En menor freqüència, també s'observa la presència d'una ona Èpsilon posterior al complex QRS, correspon a la dispersió de la propagació de la senyal elèctrica en el moment de la recuperació ventricular(47) (figura 9B). Per últim, la presència del BBD, complet or incomplet, és comú en pacients de MAVD, especialment en aquells amb alteracions estructurals severes(55).



**Figura 9 - Electrocardiograma en la MAVD.** A- Representació esquemàtica d'un ritme d'un cor humà vist en un electrocardiograma. B- Electrocardiograma on es mostra l'ona èpsilon després del complex QRS. C- Electrocardiograma on es mostra la inversió de l'ona T.

### 5.1.2 Ressonància magnètica nuclear

En el diagnòstic de la MAVD, la caracterització a teixit miocardiàc -és especialment valuosa, ja que ens permet detectar la presència de teixit fibrós i



adipós. La infiltració fibro-adiposa es troba sovint situada en les àrees de disquinesia o aquinesia, s'observa com el teixit adipós substitueix el teixit muscular de la paret lliure del ventricle dret. Tanmateix, la RMN en el diagnòstic de la MAVD requereix molta experiència, ja que hi ha abundant teixit adipós de l'epicardi sobreposat al ventricle dret, especialment en el solc auriculoventricular(56).

**Taula 4.** Taula resum dels criteris diagnòstics Task Force.

Criteri	Major	Menor
<b>Disfunció global i/o regional i alteracions estructurals del ventricle dret</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dilatació severa i reducció de la fracció d'ejecció del ventricle dret sense o amb una lleugera disfunció del ventricle esquerre.</li> <li>Aneurismes localitzats al ventricle dret</li> <li>Dilatació segmental severa del ventricle dret.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dilatació moderada del ventricle dret i/o reducció de la fracció d'ejecció amb funcionament normal del ventricle esquerre.</li> <li>Dilatació segmental moderada del ventricle dret.</li> <li>Hipoquinesia localitzada del ventricle dret.</li> </ul>
<b>Característiques del teixit de les parets</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Substitució fibro-adiposa del miocardi en una biòpsia endomiocàrdica</li> </ul>	
<b>Anormalitats en la repolarització.</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Inversió de l'ona T en les derivacions V2 i V3</li> </ul>
<b>Anormalitats de la despolarització conducció</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ones Èpsilon o prolongació localitzada (110ms) del complex QRS en les derivacions V1, V2 o V3</li> </ul>	
<b>Arítmies</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Freqüència ventricular extrasistòlica amb bloqueig de branca esquerra (LBBB) morfologia (<math>\pm</math> 1,000 [<math>&gt;</math> 200]/24 h) (Holter)</li> </ul>
<b>Història familiar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Historia familiar de la malaltia confirmada en autòpsia o cirurgia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Historia familiar de mort sobtada (edat <math>&lt;</math>35 anys) degut a una MAVD sospitosa.</li> <li>Historia familiar (diagnòstic clínic basat en aquests criteris)</li> </ul>

## 5.2 Tractament

El principal objectiu del tractament en la MAVD és la prevenció d'arítmies i de la MSC. En el cas de presència d'arítmies s'administraran fàrmacs com beta-bloquejants o anti-arítmics de classe III, principalment sotalol o amiodarona. Actualment, es considera que l'administració de sotalol és la més efectiva, mentre que l'amiodarona sola o combinada amb beta-bloquejants és una alternativa en els casos quan no es respon al sotalol. Si els tractaments amb fàrmacs no són eficients, s'aconsella practicar una ablació del circuit de taquicàrdia ventricular i/o la implantació d'un desfibril·lador automàtic (DAI). La selecció de casos de MAVD on la implantació del DAI és aconsellable encara no s'ha aclarit per complet. Actualment es recomana la implantació en tots els pacients que complexin els criteris TF, especialment els que presentin història de MSC, taquicàrdia ventricular sostinguda, síncope aritmogènic o taquicàrdia ventricular no sostinguda en el *holter* de 24h. De totes maneres, en aquests casos s'expliquen detalladament als pacients quins són els riscos i beneficis del DAI, per tal de que aquest pugui prendre una decisió informada. En un estadi final de la MAVD, es podria valorar un trasplantament cardíac si la situació del pacient és molt greu, tot i que és extremadament estrany que aquesta patologia requereixi un trasplantament (57).

D'altra banda, una de les recomanacions més importants en els casos de MAVD és la restricció esportiva, basada en l'evidència de que la majoria de pacients que desenvolupen MAVD són atletes d'elit. A més, les taquicàrdies ventriculars succeeixen normalment durant exercici. Així doncs, s'ha observat la pràctica

esportiva accelera la progressió de la patologia en pacients de MAVD, fet que també ha estat demostrat en models animals(58). Fins que no es determini quin és el nivell de seguretat en l'exercici esportiu, es recomana la màxima restricció als pacients de MAVD. Tot i això, aquestes recomanacions sempre s'han d'equilibrar amb una bona qualitat de vida.

### 5.3 Casos Post-mortem

La MSC pot ser en ocasions el primer símptoma de la MAVD. Molts d'aquests casos són diagnosticats en el moment de l'autòpsia, gràcies a les alteracions estructurals pròpies de la patologia que s'identifiquen durant l'anàlisi macroscòpic i microscòpic del cor(59).

La MAVD es va descriure per primera vegada l'any 1982, tot i que no va ser fins a finals dels anys 80 quan se'n van definir les característiques patològiques de manera sistemàtica(60). En l'estudi realitzat per Thiene *et al* es va descriure dos patrons diferents: el primer, infiltració adiposa, en el que s'observava la substitució del miocardi exclusivament per adipòcits; i el segon, infiltració fibro-adiposa, en el que s'observava una substitució del miocardi per teixit fibrós i adipós. En la variant de infiltració adiposa es descriu afectació del ventricle dret antero-lateral i les regions infundibulars, mentre que la paret postero-inferior, el sèptum i el ventricle esquerre no presentaven alteracions. En la variant de infiltració fibro-adiposa s'observa un aprimament de la paret lliure del ventricle dret i translúcida a la llum, amb aneurismes a l'àpex, de l'infundíbul i de la paret lliure del ventricle dret

(l'anomenat triangle de la displasia). D'aquesta manera, el diagnòstic de la MAVD en els casos post-mortem tradicionalment s'ha basat en la substitució fibro-adiposa del miocardi de la paret lliure del ventricle dret.

En les dècades posteriors, diferents autors han descrit com a normal la presència de teixit adipós en el cor, ja que s'ha identificat en sèries de pacients, especialment d'edat avançada. Aquest fet posa en dubte el valor clínic o patològic de la presència aïllada d'infiltració adiposa, suggerint per tant que aquesta és una entitat diferent a la MAVD(61,62). La necessitat d'adoptar un criteri estricte pel diagnòstic és important per la pràctica forense. Aquests criteris són de vital importància tant per l'epidemiologia com per la pràctica clínica, ja que la identificació de l'alteració genètica representa el punt de partida per l'anàlisi i seguiment de familiars per tal de prevenir una possible mort sobtada (63). En concret, Burke *et al* va identificar va descriure, en una sèrie de casos de mort sobtada, la presència de infiltració adiposa, un engruiximent del miocardi de ventricle dret, mentre el ventricle esquerre no presentava alteracions estructurals evidents, sense inflamació ni atrofia dels miòcits. A més a més, els autors consideren que a partir d'un 15% de substitució adiposa en la sortida del ventricle dret o de la paret posterior seria anormal, mentre que això seria probablement normal en la paret propera a l'àpex(64). Tansey *et al* va descriure que un 85% dels cors procedents de morts per causes no cardíaques presentaven infiltració adiposa en el miocardi, sense fibrosis ni inflamació, especialment en el ventricle dret en els casos de major edat(65). Una infiltració adiposa massiva en el ventricle dret sense

fibrosis ni degeneració dels miòcits no representaria una causa probable de la mort, així com no s'esperaria una tendència familiar(66). En aquestes condicions, els miòcits semblen ser apartats més que no substituïts i són estructuralment normals. Contràriament a la infiltració fibro-adiposa del ventricle dret característica de la MAVD que presenten canvis degeneratius en els miòcits. Encara és motiu de debat si la infiltració adiposa en el ventricle dret *per se* hauria de considerar-se una marca morfològica de la MAVD(67).

D'aquesta manera, a més a més de la infiltració adiposa, hi ha dos característiques histològiques essencials pel diagnòstic inequívoc de la MAVD: la substitució fibròtica i la degeneració dels miòcits. En aquest context, són especialment importants les tècniques d'imatge, ja que permeten detectar no només la presència de teixit adipós sinó també el teixit fibrós (67). La presència de infiltració adiposa en el miocardi del ventricle dret en absència de defectes en la motilitat de la paret s'hauria de interpretar amb precaució. En el cas del pacient de mort sobtada, on es presenta una extensiva infiltració adiposa del ventricle dret, es preferible no relacionar aquest fet directament amb la causa de la mort. És a dir, aquest fet no necessàriament implica que la mort s'hagi produït per MAVD(68). En aquest sentit, s'han publicat treballs on es descriu una elevada incidència, més del 10%, de MAVD en casos de mort sobtada a França: en la majoria de casos sense presència de teixit fibrós(69).

Actualment, l'anàlisi genètica en mostres post-mortem ajuda a realitzar un diagnòstic acurat en els casos de mort sobtada, ja que permet identificar la variant

---

genètica causal de la MAVD en alguns dels casos. Això té una importància cabdal a l'hora de determinar els familiars asimptomàtiques que potencialment estarien en risc de patir una mort sobtada.

## 5.4 Predisposició Genètica a la MAVD

La miocardiopatia aritmogènica de ventricle dret es va descriure per primera vegada com a una patologia possiblement heretable l'any 1988, quan se'n van estudiar nou famílies(49). Actualment, s'identifica la causa genètica en un 60% dels casos de MAVD, majoritàriament amb un patró d'herència autosòmic dominant, penetrància incompleta i expressió fenotípica variable(45,70). D'altra banda però, també s'han descrit casos d'herència autosòmica recessiva amb diferents gens implicats(71,72). La forma autosòmica recessiva tradicionalment s'ha associat a un fenotip de Naxos; caracteritzat per presentar queratoderma palmoplantar, engruiximent de la capa externa de la pell dels palmells de mans i peus, i cabell arrissat; a més a més de les alteracions cardíques pròpies de la MAVD(73,74). Tanmateix existeixen casos d'herència recessiva no associats a aquest fenotip(72).

### 5.4.1 Gens desmosomals

La MAVD està causada bàsicament, tot i que no exclusivament, per variants en els gens que codifiquen per proteïnes desmosòmiques: placofilina (PKP2), desmoplaquina (DSP), desmocolina-2 (DSC2), desmogleïna-2 (DSG2) i plakoglobina (PG), codificada pel gen *JUP*. Conjuntament, són responsables d'entre un 60-65% del total de casos de MAVD, mentre que la resta de gens

associats representen conjuntament menys d'un 5%. La prevalença relativa d'aquests gens es distribueix de la següent manera 30%-40% per *PKP2*, 10-15% per *DSP*, 3-8% *DSG2*, 1-5% per *DSC2* i menys d'un 1% en el cas de *JUP*.

#### **5.4.1.1 Placofilina-2**

El gen més prevalent associat a la MAVD és *PKP2* (ENSG00000057294), que codifica per la placofilina-2, proteïna armadillo localitzada en la placa citosòlica dels desmosomes cardíacs. El gen de la placofilina es troba situat al locus 12p11 i conté 14 exons i té una llargada de 106.101 parells de bases (pb). Fins a dia d'avui, s'han descrit més de 150 variants patogèniques localitzades a *PKP2* associades a la MAVD(75), i responsable d'entre un 30-40% del total dels casos(76). Les variants a *PKP2* responsables de MAVD presenten majoritàriament un patró d'herència autosòmic dominant, tot i que també s'han descrit casos d'herència recessiva(71). D'entre totes les variants descrites a *PKP2* destaquen les variants sense sentit, és a dir aquelles que provocaran un aturada prematura de la traducció de la proteïna. La majoria dels portadors d'una variant genètica patogènica a *PKP2* presenten una variant *nonsense*(77), ja sigui per una inserció i/ o deleció o bé per una variació de un sol nucleòtid senzill que provocarà un codó d'aturada (TAA, TAG o TGA). D'aquesta manera, les variants que provoquen la síntesi de la placofilina truncada (*PKP2<sup>TR</sup>*) són les alteracions genètiques més prevalents en MAVD.

D'altra banda, l'any 2011 Cox *et al* va descriure per primera vegada una variant en nombre de còpies (CNV) associada a MAVD. Es van identificar la deleció d'un exó en tres casos entre 149 individus afectats(78). Posteriorment, Roberts *et al* l'any 2012 i Li Mura *et al* l'any 2013 també van publicar casos de grans delecions genòmiques a *PKP2* associades a aquesta patologia (79,80).

#### **5.4.1.2 Desmocolina-2**

El gen que codifica per la desmocolina-2 (ENSG00000134755) es troba situat al locus 18q21, té una llargada de 36.447 pb i consta de 17 exons. L'any 2006, Heuser *et al* va associar per primera vegada aquest gen a la MAVD(81). Actualment existeixen al voltant de 50 variants patogèniques a *DSC2* associades a la MAVD, de les quals un 50% són variants *missense*. La resta corresponen a insercions i delecions petites i 4 variants situades en llocs de *splicing* (75).

#### **5.4.1.3 Desmogleïna-2**

El gen que codifica per la desmogleïna-2 (ENSG00000046604) es troba situat al locus 18q12.1, i té una llargada de 50.788 pb i consta de 15 exons. L'any 2006, Pilichou *et al* va descriure per primera vegada l'associació entre *DSG2* i aquesta patologia(82). Des d'aleshores, més de 50 variants patogèniques s'han identificat en casos de MAVD; un 60% corresponents a variants amb sentit, 20% a insercions i/o delecions petites, i el 20% restant corresponent a variants en llocs de *splicing* (75). Malgrat que la majoria de variants en aquest gen presenten un patró



d'herència autosòmic dominant, s'han publicat treballs on es suggereix una herència autosòmica recessiva(72).

#### **5.4.1.4 Placoglobina**

El gen que codifica per la placoglobina (ENSG00000173801) es troba situat al locus 17q21, té una llargada de 32.106 pb i consta de 14 exons. L'any 2000, McKoy *et al* van identificar per primera vegada una variant genètica en aquest gen, una deleció petita, associada a la MAVD amb un patró d'herència autosòmica recessiva i associada al fenotip de Naxos (73). La síndrome de Naxos es va ser identificar per primera vegada en famílies a les illes gregues de Naxos, atorgant-li així el nom(83). El fenotip característic d'aquesta síndrome és una miocardiopatia aritmogènica de ventricle dret associada a queratoderma palmoplantar i cabell arrissat.(84). La síndrome de Naxos en portadors homozigots presenta una penetrància del 100% a partir de l'adolescència, sense manifestar-se en edat infantil(85). Actualment, s'han descrit poc menys de 20 variants patogèniques associades a MAVD, de les quals 30% corresponen a variacions en homozigosis(75).

#### **5.4.1.5 Desmoplaquina**

El gen que codifica per la desmoplaquina (ENSG00000096696) es troba situat al locus 6p24, té una llargada de 45.077 pb i consta de 24 exons. L'any 2002, Rampazzo *et al* va descriure per primera vegada l'associació entre la MAVD i el *DSP*(86). A dia d'avui, s'han descrit més de 100 variants patogèniques a *DSP*

associades a la MAVD; un 40% d'elles són variacions amb sentit, 30% variacions sense sentit, 25% són insercions i/o delecions petites, mentre que només s'han descrit 5 variacions en llocs de *splicing*(75). Les variants en el gen *DSP* s'associen de manera generalitzada a una herència autosòmica dominant; tot i que també se n'ha descrit una herència recessiva més associada la síndrome de Carvajal, descrita com a una variant de la síndrome de Naxos(74). Estudis més recents posen de manifest que l'associació entre *DSP* i el fenotip de Naxos estaria determinat per la presència de variants en una regió determinada de la proteïna (564-597 aa), en aquest cas amb una herència autosòmica dominant(87,88).

## 5.4.2 Gens no desmosomals

La MAVD està causada bàsicament pels gens que codifiquen per proteïnes desmosomals, tanmateix s'han descrit 7 gens no desmosomals associats a la patologia (taula 2). Conjuntament representen aproximadament un 5% del total de casos.

### 5.4.2.1 Desmina

El gen que codifica per la desmina (*DES*) (ENSG00000175084) es troba situat al locus 2q35, té una llargada de 8.363 pb i consta de 9 exons. La desmina és una de les proteïnes principals dels filaments intermedis, forma una bastida proteica al voltant dels discos Z, i permetent així, la unió entre els desmosomes i l'estructura sarcomèrica (veure secció miòcits contràctils, Figures 4B). El gen de la *DES* es va associar a la MAVD l'any 2009(89), tot i haver-se associat amb anterioritat a

miopatia (coneguda com a desminopatia). Fins a dia d'avui, existeixen 10 variants patogèniques associades a la MAVD, un 90% de les quals són variants amb sentit(75). En tots els casos els portadors presentaven miopatia i herència autosòmica dominant. D'aquesta manera, en els casos d'absència de defectes en el múscul esquelètic, la probabilitat d'identificar una variant genètica en la *DES* associada a la MAVD és molt baixa(90).

#### **5.4.2.2 Factor de creixement transformant beta 3**

El gen que codifica pel factor de creixement transformant beta 3 (TGFb3) (ENSG00000119699) es troba situat al locus 14q24, té una llargada de 23.651 pb i consta de 7 exons. La proteïna TGFb3 és una proteïna involucrada en el desenvolupament del teixit i la diferenciació cel·lular, així com en la fibrogènesi(91). El gen *TGFb3* es va descriure en casos de MAVD l'any 2005, quan es van identificar dues variants en regions UTRs (*untranslated regions*) (92). Només s'han descrit aquestes dues variants en pacients afectats per MAVD, a les quals no se'ls van analitzar els gens desmosomals. Tot això fa que la relació entre aquest gen i la patologia sigui encara molt controvertida i motiu de discussió.

#### **5.4.2.3 Proteïna transmembrana 43**

*El gen TMEM43, que codifica per la proteïna transmembrana 43, es troba situat al locus 3p25.1, conté 12 exons i té una llargada de 18,7Kb. La funció d'aquesta proteïna encara no es coneix amb exactitud. S'ha suggerit que podria estar involucrada en la via d'adipogènesi perquè conté un element de resposta al factor*

de transcripció proliferador de peroxisoma (PPAR). Una alteració en la regulació d'aquesta via d'adipogènesi podria explicar la seva implicació en la substitució fibro-adiposa del miocardi característica de la MAVD. Actualment, s'han descrit només tres variants patogèniques(75), la primera de les quals la va descriure Merner *et al* l'any 2008(93). Estudis recents dels mateixos autors han identificat que una nova variant en aquest gen, recurrent en població del Regne Unit i Canadà, podria ser causant de la MAVD(94).

#### **5.4.2.4 Lamin A/C**

El gen *LMNA* (ENSG00000160789) es troba situat al locus 1q22, té una llargada de 25,420 pb i conté 12 exons. El gen *LMNA* codifica per la proteïna lamina A (ENSP00000357283) i per la lamina C (ENSP00000357284) degut a un procés de *splicing* alternatiu. La lamina A i C formen part dels filaments intermedis involucrats en la construcció de la lamina nuclear, un complex proteic que es troba a la membrana nuclear interna(95). Alteracions genètiques en el gen *LMNA* es van descriure a partir dels anys 90 en un grup heterogeni de desordres, anomenat laminopaties, que inclouen; distròfia muscular, diabetis, lipodistròfia, dermatopaties, neuropaties i, a més, alteracions cardíagues(96). Malgrat aquests precedents, no va ser fins l'any 2012 quan Quarta *et al* ho va associar per primera vegada a la MAVD(97) en un estudi dut a terme amb una població d'estudi de més de 100 individus.

#### **5.4.2.5 Titina**

El gen que codifica per la proteïna titina, *TTN*( ENSG00000160789), es troba situat al locus 2q31, té una llargada de 281.434 pb i conté 363 exons. La titina forma part del sarcòmer cardíac, juntament amb els filaments d'actina i miosina (veure secció miòcits contràctils, figura 3B). La funció principal és mantenir l'estructura del sarcòmer, així com modular-ne la tensió exercida en funció de la senyal(98). El gen *TTN* es va associar per primera vegada a la MAVD l'any 2011, quan Taylor *et al* van identificar 8 variants amb sentit en pacients afectats(99). Actualment s'han descrit 10 variants patogèniques associades a la patologia, tot i que existeixen més de 300 variants de significat incert en aquest gen(75).

#### **5.4.2.6 Fosfolamban**

El gen que codifica per la proteïna fosfolamban, *PLN*( ENSG00000198523), es troba situat al locus 1q22, té una llargada de 12.146 pb i conté 2 exons. La proteïna PLN és una fosfoproteïna que es troba íntimament associada al reticle sarcoplasmàtic. És un regulador de la bomba de  $Ca^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic (SERCA) dels cardiomiòcits, responsable de la translocació del  $Ca^{2+}$  des del citosol al lumen del reticle sarcoplasmàtic. Així doncs, té un paper clau en el manteniment de la homeòstasis del  $Ca^{2+}$ (100). D'aquesta manera, la proteïna PLN és un component determinant en la contracció i relaxació cardíaca(101). L'any 2012, es va associar per primera vegada el gen *PLN* amb la MAVD(102), quan es va

identificar una variant genètica patogènica en una família holandesa afectada per la patologia.

#### **5.4.2.7 $\alpha$ T-catenin**

El gen que codifica per la proteïna  $\alpha$ T-catenin, *CTNN3* (ENSG00000183230), es troba situat al locus 10q21.3 i conté 18 exons. La  $\alpha$ T-catenin és una molècula citoplasmàtica necessària pel manteniment de la integritat i morfogènesi del teixit, mitjançant la seva integració en el complex cadherina-catenina(103)(veure secció discos intercalars, figura 6B). El gen *CTNN3* va ser associat recentment a la MAVD per Hengel *et al* (104). El mecanisme subjacent a la MAVD en aquest gen podria involucrar a PKP2 i Cx43, tal com es mostrava en el model animal desenvolupat per Li *et al* (105). Fins avui, només dues variants han estat associades a la MAVD en aquest gen(75).

### **5.4.3 Controvèrsies en la Genètica de la MAVD**

#### **5.4.3.1 Fenocòpies**

L'any 2001 es va identificar una variant genètica patogènica en el gen que codifica pel receptor de rianodina (*RyR2*) en un pacient afectat per MAVD(106); tanmateix, recentment s'ha classificat com a un cas de fenocòpia(107). Per tant, actualment existeix consens a l'hora de considerar que el gen de *RyR2* no està associat a aquesta patologia.

### 5.4.3.2 Solapament en les miocardiopaties

La classificació de les miocardiopaties sovint és limitada, degut al gran solapament que existeix en alguns paràmetres clínics. La diferenciació entre la MCH, MCD i la MAVD té una gran importància en la pràctica clínica, determinant tant el diagnòstic com el tractament(108,109). Alguns dels gens associats a MAVD, tots ells no desmosomals, han estat associats també en altres cardiomiopaties. Els gens *DES*, *LMNA*, *TTN*, *PLN*, han estat associats a MCD, mentre el gen de la *TTN* i *PLN* també ho estan a la MCH(75). Estudis recents suggereixen el terme de miocardiopatia aritmogènica, un concepte que inclouria la DCM i la MAVD(110).

**Taula 5.** Gens associats a la MAVD

Gen	Locus	Proteïna	Tipus d'herència
<i>PKP2</i>	12p11	Placofilina	AD/AR
<i>DSP</i>	6p24	Desmoplaquina	AD/AR
<i>DSG2</i>	18q12.1	Desmogleïna-2	AD/AR
<i>DSC2</i>	18q21	Desmocolina-2	AD/AR
<i>JUP</i>	17q21	Placoglobina	AD/AR
<i>TTN</i>	2q31	Titina	AD
<i>TMEM43</i>	3p25.1	Proteïna transmembrana 43	AD
<i>PLN</i>	6q22.1	Fosfolamban	AD
<i>LMNA</i>	1q22	Lamina A/C	AD
<i>DES</i>	2q35	Desmina	AD
<i>TGFB3</i>	14q24	Factor de creixement transformant beta 3	AD
<i>CTNN3</i>	10q22.3	Alfa-T-catenina	AD

## 5.5 Fisiopatologia de la MAVD

La MAVD, tal i com s'ha descrit amb anterioritat, es causada majoritàriament per la presència de variants en els gens que codifiquen per proteïnes desmosòmiques. Els mecanismes moleculars responsables que es desencadenen com a

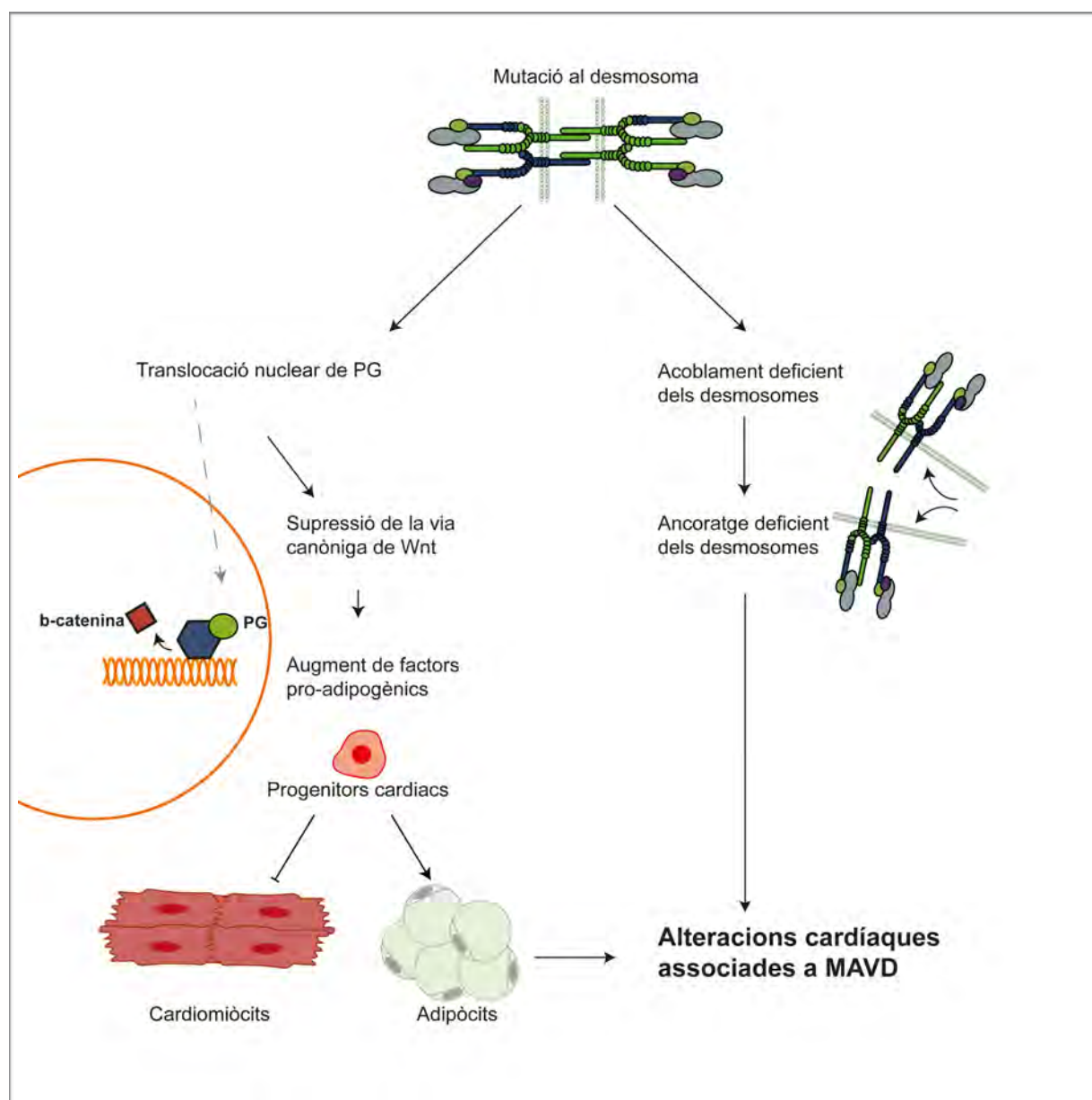
conseqüència d'aquestes variants són encara molt desconeguts. Així mateix, també cal donar resposta als mecanismes que promouen l'adipogènesi i fibrogènesi que donaran lloc al fenotip de infiltració fibroadiposa característic de la MAVD.

### **5.5.1 Origen dels adipòcits: possibles mecanismes**

L'origen dels adipòcits presents en el miocardi en la MAVD ha estat un enigma en els darrers anys. Estudis recents han demostrat que els adipòcits presents en el miocardi afectat per MAVD tenen el seu origen els progenitors cel·lulars cardíacs de camp secundari (SHF), situats a l'àpex del ventricle dret. Lombardi et al va realitzar un estudi de *linage tracing* en un model animal on es suprimia l'expressió de DSP de manera condicional i es marcaven simultàniament les cèl·lules amb una proteïna *reporter*. Els resultats van demostrar que els progenitors SHF n'eren l'origen, i es diferenciaven de manera preferencial en adipòcits degut a la supressió de la via canònica de senyalització de Wnt(111). Els progenitors cardíacs del SHF es diferenciaven els cardiomiòcits adults que formaran el ventricle dret, aquest procés és regulat via canònica de senyalització de Wnt dependent de beta-catenina(112). En el cas de la MAVD, una part d'aquests progenitors cardíacs SHF es diferenciaven a adipòcits com a conseqüència de la supressió de la via canònica de senyalització de Wnt(111). Aquests resultats també explicarien la major afectació del ventricle dret.



La inhibició de l'expressió de proteïnes desmosomals provoca la translocació d'una part de les molècules de PG al nucli(113). La localització nuclear de la PG s'ha descrit com a fonamental en la diferenciació dels progenitors cardíacs en adipòcits en la MAVD(114). La PG i la beta-catenina son proteïnes armadillo amb una elevada homologia en la seqüència(115). Funcionalment, la PG i la beta-catenina, en general són antagonistes(116), ambdues competeixen per la translocació nuclear, la unió al factor de transcripció Tcf/Lef, la degradació per ubiquitinació, la incorporació a les unions adherents i la formació dels desmosomes.



**Figura 10-** Mecanisme molecular proposat en l'adipogènesi en la MAVD. *Adaptada de Lombardi et al 2009 in Circulation Research.*

En la fisiopatologia de la MAVD, és especialment important la competència entre aquestes dues proteïnes per la unió al factor de transcripció de Tcf/Lef, ja que produeix efectes completament oposats. En el nucli, la PG interacciona amb Tcf/Lef, interferint en la correcta formació del complex proteic de la via de senyalització de Wnt, i suprimeix la l'expressió dels seus gens diana (figura 10). La supressió de la via de senyalització de Wnt reduirà, entre altres, els nivells d'expressió del factor

de creixement de teixit connectiu (CTGF), el qual inhibeix l'adipogènesi. El canvi transcripcional de la miogènesi a l'adiopogènesi promou la diferenciació d'una part dels progenitors cardíacs SHF a adipòcits.

D'aquesta manera, desvetllar quina és la successió d'esdeveniments a nivell cel·lular que es desencadenen com a conseqüència de les variants en els gens desmosomals i que tenen lloc que prèviament a la deficiència de la PG als discos intercalars, és encara el principal repte per tal d'entendre el mecanisme proposat.

### **5.5.2 Models animals**

L'ús de models animals ha estat clau en l'avenç en el coneixement de la fisiopatologia de la MAVD. Aquests models s'han centrat bàsicament en les proteïnes del desmosoma: PKP2, PG, DSP i DSG2 (taula 6). El primer model animal en MAVD va ser l'any 2004 per Grossmann *et al*, en el que es produïa una deleció específicament la *PKP2*(117). Els ratolins heterozigots, portadors d'una còpia de *PKP2*, eren completament viables sense cap alteració cardíaca. Els ratolins homozigots per la deleció de PKP2 morien durant el desenvolupament embrionari. Posteriorment, l'any 2006 el model animal de Kirchhof *et al*(58) va associar la progressió de la MAVD amb l'exercici esportiu (model PG 3), malgrat no presentava substitució fibrosa ni remodelació de les unions cel·lulars.

D'altra banda, l'any 2006, el model animal de *DSP* va permetre descriure que en els primers estadis del desenvolupament de la patologia no hi havia anomalies en el ECG basal ni evidències de substitució fibroadiposa, però sí presentaven un

increment del temps d'activació i arítmies induïbles (estudis realitzats amb la tècnica de Langerdorff)(118). Aquest fet suggeria, per primera vegada, que les anomalies electrofisiològiques es poden produir abans dels canvis estructurals, malgrat es van realitzar estudis en microscòpia electrònica per tal d'excloure la disrupció dels desmosomes a nivell ultra-estructural. Posteriorment, estudis en altres models de DSP (model DSP4) sí van demostrar anomalies a nivell ultra-estructural, amb una major distància en els discos intercalars com a conseqüència de la disrupció de la interacció entre DSP i PG.

L'any 2009, es va descriure per primera vegada que el procés patològic podia ser desencadenat per la necrosis dels miòcits seguida per la calcificació i substitució fibroadiposa (models de DSG2 1 i DSG2 2). Posteriorment, Kant *et al*, l'any 2012, va ser un estudi més va descriure que una major distància intercel·lular als discos intercalars i la pèrdua de l'estructura desmosòmica en les zones properes a les lesions visibles macroscòpicament(119).

Models animals més recents, han permès recapitular el fenotip de MAVD humà: MSC, dilatació progressiva i fibrosis en les parets cardíques (a partir dels dos mesos de vida). També es va descriure una disrupció d'altres proteïnes desmosomals als discos intercalars, així com una dissolució dels discos intercalars, a més d'una reducció de Cx43 en les unions GAP (PG 5 i PG6).

**Taula 6-** Models animals en la MAVD

Model	Proteïna	Gen	Mutació/ exons diana	Tipus de model	Referència
<b>PKP2</b>	Placofilina-2	<i>Pkp2</i>	Exó 1- intró 1	Deleció específica	Grossmann et al. (2004)
<b>PG 1</b>	Placoglobina	<i>Jup</i>	Exons 2–5	Deleció específica	Bierkamp et al. (1996)
<b>PG 2</b>	Placoglobina	<i>Jup</i>	Exó 34	Deleció específica	Ruiz et al. (1996)
<b>PG 3</b>	Placoglobina	<i>Jup</i>	Exó 34	Deleció específica	Kirchhof et al. (2006),
<b>PG 4</b>	Placoglobina	<i>Jup</i>	Exó 34	Deleció específica	Fabritz et al. (2011)
<b>PG 5</b>	Placoglobina	<i>Jup</i>	Exons 2–3	Deleció induïble	Li et al. (2011)
<b>PG 6</b>	Placoglobina $\beta$ -catenina	<i>Jup</i> <i>Ctnn1</i>	Exons 2–3 Exons 2–5	Doble deleció induïble	Swope et al. (2012)
<b>PG 7</b>	Placoglobina	<i>Jup</i>	Wild type	Transgènic	Lombardi et al. (2011)
<b>PG 8</b>	Placoglobina	<i>Jup</i>	23654 $\Delta$ 2	Transgènic	Lombardi et al. (2011)
<b>DSP 1</b>	Desmoplaquina	<i>Dsp</i>	$\Delta$ 281– 473	Deleció selectiva	Gallicano et al. (2001)

Model	Proteïna	Gen	Mutació/ exons diana	Tipus de model	Referència
<b>DSP 2</b>	Desmoplaquina	<i>Dsp</i>	Exon 2	Deleció induïble	Garcia-Gras et al. (2006), Gomes et al. (2012)
<b>DSP 3</b>	Desmoplaquina	<i>Dsp</i>	Wild type	Transgènic (promotor cardíac)	Yang et al. (2006)
<b>DSP 4</b>	Desmoplaquina	<i>Dsp</i>	R2834H	Transgènic (promotor cardíac)	Yang et al. (2006)
<b>DSP 5</b>	Desmoplaquina	<i>Dsp</i>	Q90R	Transgènic (promotor cardíac)	Yang et al. (2006)
<b>DSP 6</b>	Desmoplaquina	<i>Dsp</i>	V30M	Transgènic (promotor cardíac)	Yang et al. (2006)
<b>DSG2 1</b>	Desmogleïna -2	<i>Dsg2</i>	Wild type	Transgènic (promotor cardíac)	Pilichou et al. (2009)
<b>DSG2 2</b>	Desmogleïna- 2	<i>Dsg2</i>	N271S	(promotor cardíac)	Pilichou et al. (2009)
<b>DSG2 3</b>	Desmogleïna-2	<i>Dsg2</i>	Exon 4-6	Deleció específica	Krusche et al. (2011), Kant et al. (2012)

D'aquesta manera sembla que múltiples components dels discos intercalars estan involucrats en les bases de la MAVD, però la seqüència dels esdeveniments que acabaran conduint a la disrupció del complex macromolecular localitzat als discos intercalars és encara molt desconegut. D'altra banda, la MAVD és una

---

cardiomiopatia que presenta com a particularitat l'acumulació de teixit fibroadipós en el miocardi, no sempre ben representat en els models animals. Per aquest motiu, els treballs en mostres de miocardi humà tenen una elevada rellevància.

### 5.5.3 Alteracions tissulars del miocardi humà

L'any 2009, Asimaki *et al* van descriure per primera vegada una disminució en la immunoreactivitat de la PG en els discos intercalars en un estudi realitzat en biòpsies cardíques de pacients diagnosticats de MAVD. Es va descriure aquest fet en casos portadors de variants desmosomals, a *DSP*, *PKP2*, *DSG2* i *PG*, així com en casos sense variant genètica causal identificada. La senyal de PG es presentava reduïda no només en les regions del ventricle dret on s'observava la substitució fibroadiposa característica de la MAVD, sinó també en la paret lliure del ventricle esquerre i el sèptum intraventricular(53). En canvi, aquest fet no s'observava en els casos d'altres patologies cardíques, com ara isquèmia, MCD i MCH, essent per tant específic per la MAVD(53). Arrel d'aquesta observació es va proposar que la reducció de la immunoreactivitat de la PG als en biòpsies de cor podria ser útil en el diagnòstic de la MAVD.

L'any 2009, Fidler *et al*, va demostrar per primera vegada la remodelació de les unions GAP en miocardi de MAVD, tots ells portadors de variants patogèniques al gen *PKP2*, amb una clara disminució de la immunoreactivitat de la Cx43 als discos intercalars(120).Posteriorment, l'any 2012, Noorman *et al* van descriure que en la paret lliure de ventricle dret i esquerre també es podria una disminució de la

immunoreactivitat als discos intercalar; no només de PG sinó també de Cx43 i, per primera vegada, es va demostrar la disminució de Nav 1.5(121). D'aquesta manera sembla que la fisiopatologia de la MAVD dependria d'una conducció cardíaca normal dependrà d'una excitabilitat apropiada, facilitada a través del canal de sodi (Nav 1.5); de la conducció cèl·lula- cèl·lula, a través de les unions GAP (Cx43); i de la correcte geometria del teixit, és a dir sense una la presència massiva de infiltració fibroadiposa. Deficiències en els dos últims casos han estat àmpliament associats a la MAVD, mentre que la implicació de Nav 1.5 encara és objecte d'estudi.

Finalment, en l'estudi de la fisiopatologia de la MAVD, els factors que en determinen la seva manifestació i progressió són encara desconeguts. Tanmateix, s'ha postulat que el procés inflamatori podria actuar com a desencadenant. La presència de infiltrats inflamatoris de manera focal s'ha descrit en casos d'autòpsies i biòpsies miocardiàques. Així doncs, una de les troballes més comunes en teixit miocardiàc afectat per la MAVD és la presència de focal de mort cel·lular i infiltrats inflamatoris(122). Les cèl·lules inflamatòries reclutades en malalties inflamatòries són neutròfils, macròfags, i limfòcits. Aquest fet, va provocar que es proposés que la etiologia de la MAVD tenia un component infecció i inflamatori, que involucraria una miocarditis crònica primària, desencadenant un procés inflamatori, que acabaria provocant una substitució fibroadiposa i la pèrdua progressiva de miocardi de ventricle dret.



Alguns estudis suggereixen que diversos virus cardiotròpics podrien tenir un paper clau en la fisiopatologia de la MAVD, proposant que la predisposició genètica podria augmentar la susceptibilitat viral provocant una miocarditis(123). Tanmateix altres estudis postulen que la presència d'infiltrats inflamatoris no és causa sinó conseqüència del mecanisme del procés de mort cel·lular(122).

**HIPÒTESIS**

Al llarg de la introducció, s'han descrit els avenços en les bases clíniques, genètiques i moleculars de la MAVD. S'ha observat que el diagnòstic genètic de la MAVD pot tenir un paper important en la determinació del fenotip i l'estratificació del risc. Tanmateix, existeixen limitacions en dos aspectes principals:

### El diagnòstic:

- ◆ A nivell clínic, els criteris TF actualment utilitzats no permeten l'estratificació del risc ni el diagnòstic dels casos més incipients de la patologia. A més, en els estudis genètics la relació entre el genotip i el fenotip en la MAVD no és completament clara, ja que es caracteritza per una penetrància incompleta i expressivitat variable.
- ◆ L'anàlisi genètica en els casos post-mortem presenta, en moltes ocasions, degradació del DNA; fet que impossibilita la seqüenciació pel mètode de Sanger tradicional i noves tècniques de seqüenciació.

### Els mecanismes moleculars implicats:

- ◆ Els PTCs en gens associats a MAVD semblen estar associats a un mecanisme d'haploinsuficiència, tanmateix els efectes cel·lulars que poden comportar les proteïnes truncades són encara parcialment desconeguts.
- ◆ Les bases moleculars de la MAVD estan associades a una desorganització dels desmosomes, malgrat que encara roman per resoldre

com les variacions genètiques a les proteïnes desmosòmiques causen aquesta desorganització.

Tenint aquestes dades en compte i considerant les limitacions exposades, s'han formulat les següents **hipòtesis** que emmarquen la present tesi doctoral:

1. La utilització d'eines genètiques podrien ajudar en el diagnòstic i l'estratificació del risc, determinant diferències en la severitat i la progressió de la patologia.
2. La seqüenciació per MassARRAY Sequenom podria resoldre genèticament els casos que presentin degradació en el DNA.
3. Tenint en compte que en acabar la primera etapa d'anàlisi genètica, es descriu que les variants més freqüentment associades són els PTCs a PKP2 (PKP2<sup>TR</sup>), les PKP2<sup>TR</sup> podrien presentar un defecte en el seu transport cel·lular que comportarà un transport ineficient d'altres proteïnes desmosomals, desencadenant així la desorganització dels desmosomes.
4. Esperant que la desorganització dels desmosomes pugui comportar una disminució de senyal de placoglobina als discos intercalars del teixit miocardiàc, ens plantejarem que existeix una disminució de senyal de placoglobina en els discos intercalars, fent que l'anàlisi immunohistoquímic pugui ser utilitzat com a eina diagnòstica en casos post-mortem en la MAVD.



**OBJECTIUS**

## **Objectiu principal:**

L'objectiu general d'aquesta tesi és entendre les bases genètiques i els mecanismes moleculars implicats en la manifestació i progressió de la MAVD.

## **Objectius específics**

Per tal de comprovar si les hipòtesis són correctes s'han plantejat els següents

### **objectius específics:**

1. Caracteritzar la població afectada de MAVD, en termes de gènere, edat i característiques clíniques i predisposició genètica.
2. Valorar les eines genètiques i l'estratificació del risc.
3. Entendre els mecanismes cel·lulars implicats en les variants en la MAVD, en els casos de PKP2<sup>TR</sup>, especialment la seva implicació en la localització subcel·lular de les proteïnes desmosòmiques.
4. Avaluar les alteracions en el conjunt dels discos intercalars (desmosomes i unions GAP) en el teixit miocardiàc

# RESULTATS



## Resultats Globals

Tal i com s'ha introduït en aquesta tesi, el diagnòstic de la MAVD és complicat sovint posterior a l'aparició de símptomes, que en ocasions poden ser la MSC. Per aquest motiu l'anàlisi genètica per determinar-ne el risc és cabdal, especialment en aquelles persones amb antecedents familiars de MSC.

El diagnòstic genètic tradicional per Sanger dels gens associats a MAVD és un procediment eficient en molts casos, però requereix una bona integritat del DNA, que no sempre és possible obtenir a partir de mostres post-mortem incloses en parafina. Precisament degut a que en ocasions la MSC és el primer símptoma de la MAVD, una part important dels casos de MAVD són diagnosticats post-mortem. En aquesta tesi, es proposa la utilització de la seqüenciació per MassARRAY Sequenom en aquests casos, amb una eficiència similar en DNA degradat i amb bona integritat. La limitació principal d'aquest sistema és la incapacitat de detectar variacions noves, no incloses en el disseny, part molt important dels casos de MAVD (poden representar fins a un 30% del total de casos amb origen genètic). Malgrat tot, aquest sistema permet identificar la causa genètica, permetent l'anàlisi en familiars, en casos que d'altra manera romandrien sense resoldre. En els casos de pacients vius, on presumiblement s'obtindrà DNA íntegre i de bona qualitat, les opcions de seqüenciació són múltiples, incloent la seqüenciació per Sanger i la seqüenciació per NGS.

La relació entre la variant genètica i el fenotip de MAVD és encara molt desconeguda. L'estratificació del risc en portadors és una de les facetes més

importants en la pràctica clínica. En aquesta tesi, s'aporten noves dades que descriuen que més del 50% dels casos és degut a variants en els gens desmosomals, especialment a variants d'aturada a *PKP2* ( $PKP2^{TR}$ ); i estableixen una correlació amb l'edat de diagnòstic on els portadors de variants  $PKP2^{TR}$  presenten es diagnostiquen a una superior. Tal i com s'ha introduït amb anterioritat, existeixen mecanismes de vigilància de PTC que degraden el mRNA de manera que el treball realitzat en aquesta tesi proposa que l'edat superior de diagnòstic en portadors de  $PKP2^{TR}$  pot ser deguda a un mecanisme d'haploinsuficiència, mentre que les variants *missense* podrien actuar com dominants negatius, i per tant el seu efecte cel·lular podria ser més sever.

Amb l'objectiu determinar si les  $PKP2^{TR}$  podrien actuar com dominants negatius o no, en cas de superar els sistemes de vigilància, es planteja un estudi de localització de diferents  $PKP2^{TR}$ . Els resultats obtinguts, i recollits en aquesta tesi, suggereixen que  $PKP2^{TR}$  estan associats a un defecte de transport proteic que no només afecta a la *PKP2* sinó també *DSP*. D'aquesta manera, en alguns casos, les  $PKP2^{TR}$  no serien funcionals, encara que s'expressin; però en altres sí podrien actuar a través d'un mecanisme de dominància negativa, depenent de la longitud de la proteïna. Per últim, múltiples components dels discos intercalars semblen estar involucrats en les bases de la MAVD, però la seqüència dels esdeveniments que acabaran conduint a la disrupció del complex macromolecular localitzat als discos intercalars és encara molt desconegut. Els mecanismes pel qual les variants genètiques en proteïnes desmosòmiques provoquen alteracions en l'estructura

desmosòmica, i al conjunt del disc intercalar, així com acaben provocant el fenotip de la MAVD encara és molt desconegut. En aquesta tesi es suggereix que PKP2<sup>TR</sup> poden afectar el transport de DSP, i aquest fet podria contribuir al desamblatge dels desmosomes. D'altra banda, també s'ha descrit una disminució de la senyal de PG en els discos intercalars, especialment en mostres portadores de variants als gens desmosomals. Els resultats d'aquesta tesi contribueixen amb noves dades en el coneixement del paper que té aquesta disminució de la PG en els discos intercalars en el fenotip de la MAVD, suggerint que podria utilitzar-se com eina diagnòstica complementària en mostres de teixit.

Conjuntament, els resultats presentats en aquesta tesi aporten nous coneixements sobre la predisposició genètica, els mecanismes moleculars que poden estar implicats en la MAVD i l'efecte sobre el teixit del miocardi.

Els resultats d'aquesta tesi es presenten els següents tres blocs:

1. Estudi genètic i histològic d'una població post-mortem de Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret: implicacions clíniques i forenses

Alcalde M, Campuzano O, Allegue C, Torres M, Arbelo E, Partemi S, Iglesias A, Brugada J, Oliva A, Carracedo A, Brugada R. *Sequenom MassARRAY approach in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy post-mortem setting: clinical and forensic implications*. International Journal of Legal Medicine. 2015.Jan;129(1).

2. Estudi genètic en pacients de la Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret: Variants d'aturada a PKP2 s'associen a una edat de diagnòstic més avançada.

Alcalde M, Campuzano O, Berne P, García-Pavía P, Doltra A, Arbelo E, Sarquella-Brugada G, Iglesias A, Alonso-Pulpon L, Brugada J, Brugada R. *Stop-gain mutation in PKP2 are associated with a later age of onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy*. PloS One. 2014 Jun 26;9(6)

3. Estudi de l'efecte cel·lular de les variants PKP2<sup>TR</sup>: localització de DSP.

Alcalde M, Campuzano O, Beltran-Alvarez P, Pagans S, Vergés M, Brugada R. *Truncated plakophilin-2 mutations affect desmoplakin subcellular localization in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. Submitted as short communication



## Article 1

**Estudi genètic i histològic d'una població post-mortem de  
Miocardiopatia Aritmogènica de Ventricle Dret:  
implicacions clíniques i forenses.**

***“Sequenom MassARRAY approach in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy post-mortem setting: clinical and forensic implications”***

Publicat a: International Journal of Legal Medicine. 2015.Jan;129(1)

Autors: Alcalde M, Campuzano O, Allegue C, Torres M, Arbelo E, Partemi S, Iglesias A, Brugada J, Oliva A, Carracedo A, Brugada R.

## **Resum**

Tal i com s’ha introduït en aquesta tesi, el mecanisme pels quals les variants en proteïnes desmosòmiques provoquen el fenotip de la MAVD encara és molt desconegut, tanmateix s’ha descrit una disminució de la senyal de PG en els discos intercalars, especialment en mostres portadores de variants als gens desmosomals. L’objectiu d’aquest treball és contribuir amb noves dades al coneixement del paper que té aquesta disminució de la PG en els discos intercalars en el fenotip de la MAVD, ja que encara no està ben definit.

Per assolir aquest objectiu es va realitzar un estudi genètic de 42 casos post-mortem i una caracterització histològica de les mostres de miocardi, especialment s’estudien les possibles alteracions de les proteïnes desmosòmiques i les unions GAP. L’anàlisi genètica es va realitzar mitjançant el sistema de MassARRAY Sequenom, degut a l’elevat nivell de degradació del DNA, on es van incloure totes les variants associades a MAVD fins el moment. Es van identificar 3 variants

associades a MAVD en els 42 casos post-mortem (7,14%), tres individus presentaven una única variant genètica p.R811S PKP2, p.S824L DSC2 i p.T526M PKP2. També es van incloure 6 mostres de DNA procedent de mostres sanguínies de pacients diagnosticats per MAVD per tal d'avaluar les possibles diferències d'eficiència en el genotipat. En aquestes mostres, la seqüenciació MassARRAY Sequenom no va identificar cap variant genètica patogènica, malgrat que la posterior seqüenciació per Sanger va desvetllar tres variants (33,33%), no incloses en el disseny, en dos pacients. L'anàlisi immunohistoquímic de les mostres demostra una clara reducció de la senyal de PG als discos intercalars, així com que el marcatge de Cx43 no mostra diferències respecte el control, i per tant, que les unions GAP no es veu alterades.

D'aquesta manera de l'article se n'extreuen les següents conclusions: la seqüenciació per MassARRAY Sequenom és eficient en casos de MAVD amb DNA degradat; la reducció de senyal de PG als discos intercalars és una característica histològica de la MAVD, i per tant és un bon indicador diagnòstic; i finalment, les unions GAP no es veuen alterades en les mostres post-mortem de MAVD.



Alcalde M, Campuzano O, Allegue C, Torres M, Arbelo E, Partemi S, Iglesias A, Brugada J, Oliva A, Carracedo A, Brugada R. "Sequenom MassARRAY approach in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy post-mortem setting: clinical and forensic implications". *International Journal of Legal Medicine*. Vol. 129, Issue 1 (2015) : 1-10

<http://dx.doi.org/10.1007/s00414-014-0996-y>

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00414-014-0996-y>

Received: 8 February 2014, Accepted: 16 April 2014, Published online: 16 May 2014

Copyright © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

## Abstract

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a rare cardiac disease characterized by myocardial fibrofatty replacement, which can lead to sudden death. Previous studies have described a reduction of plakoglobin (PKG) protein at the level of intercalated disks as the hallmark of ARVC. The main objective of this study was to investigate the involvement of desmosome mutations in the histological phenotype of ARVC. We performed a genetic analysis of ARVC cases, and histological characterization of ARVC heart tissue samples. We genetically analyzed 48 ARVC cases distributed into two groups: 42 human tissue heart samples with conclusive diagnoses of ARVC after post-mortem examination; and six DNA samples from peripheral blood of living patients who were clinically diagnosed. Sequenom MassARRAY analysis revealed three ARVC-associated variants in three patients in 42 tissue samples (7.14 %). Three individuals carried one single pathogenic mutation, p.R811S\_PKP2, p.S824L\_DSC2, and p.T526M\_PKP2 in postmortem samples. In the living patients group, Sequenom MassARRAY revealed no mutation, however, later Sanger sequencing analysis identified three ARVC mutations in 2/6 patients not included in the Sequenom design. In post-mortem tissue samples we performed immunohistochemical labeling for desmosomal proteins and Connexin 43. This study revealed that PKP2 carriers present either absent or clearly reduced PKG immunolabeling, while the DSC2 carrier showed PKG immunolabeling similar to control samples. Immunolabeling for Cx43 did not show any differences compared to controls. The present Sequenom MassARRAY design is a useful tool for post-mortem genetic diagnosis of ARVC. Plakoglobin reduction occurs at intercalated disks, while other desmosome proteins and Cx43 remain unaltered.

## Keywords

Sudden cardiac death; ARVC; Genetics; Plakoglobin; Cx43



## Article 2

**Variants d'aturada a *PKP2* s'associen a una edat de  
diagnòstic més avançada en la Miocardiopatia  
Aritmogènica de Ventricle Dret.**

***Stop-gain mutation in PKP2 are associated with a later age of onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.***

Revista: Plosone. 2014. Jun 26;9(6)

Autors: Alcalde M, Campuzano O, Berne P, García-Pavía P, Doltra A, Arbelo E, Sarquella-Brugada G, Iglesias A, Alonso-Pulpon L, Brugada J, Brugada R.

## **Resum**

Tal i com s'ha descrit amb anterioritat, la MAVD està causada majoritàriament per variants en els gens que codifiquen per proteïnes desmosomals (*PKP2*, *DSP*, *PG*, *DSC2* i *DSG2*). Tanmateix, el paper que tenen aquestes variants en la manifestació i progressió de la MAVD és difícil de determinar. L'objectiu principal d'aquest estudi és establir una relació entre el genotip i el fenotip per determinar el valor diagnòstic de la genètica i estudiar el rol de les variants, en funció del tipus de variant genètica patogènica, en la penetrància de la MAVD (associada a l'edat).

Per tal d'assolir aquest objectiu, es van analitzar genèticament 30 pacients diagnosticats de MAVD. A més, es van analitzar un total de 70 familiars distribuïts en quatre famílies. S'han identificat 19 variants 13 a *PKP2*, 3 a *DSG2*, 2 a *DSP*, i 1 a *DSC2*). Nou d'aquestes variants provoquen la síntesi d'una proteïna truncada degut a la introducció d'un codó d'aturada.

L'anàlisi familiar ha identificat 28 portadors d'entre les 4 famílies estudiades. Aquest estudi ha demostrat que les variants d'aturada estan associades a una edat de diagnòstic superior de la MAVD, sense presentar diferències en la severitat de la patologia. Contràriament a estudis anteriors, aquest estudi mostra que la presència de variants que provoquen la síntesi d'una proteïna truncada no està associada a una major severitat, sinó a una major edat del diagnòstic. Aquest fet podria suggerir que les proteïnes truncades podrien ser compensades per l'al·lel normal mentre que les variants *missense* podrien actuar a través d'un mecanisme de dominància negativa competint amb l'al·lel normal.





# Stop-Gain Mutations in PKP2 Are Associated with a Later Age of Onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy

Mireia Alcalde<sup>1</sup>, Oscar Campuzano<sup>1</sup>, Paola Berne<sup>2</sup>, Pablo García-Pavía<sup>3</sup>, Ada Doltra<sup>2</sup>, Elena Arbelo<sup>2</sup>, Georgia Sarquella-Brugada<sup>4</sup>, Anna Iglesias<sup>1</sup>, Luis Alonso-Pulpon<sup>3</sup>, Josep Brugada<sup>2</sup>, Ramon Brugada<sup>1\*</sup>

**1** Cardiovascular Genetics Centre, University of Girona-IDIBGI, Girona, Spain, **2** Arrhythmia Section, Thorax Institute, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, **3** Cardiomyopathy Unit, Heart Failure and Heart Transplant Section, Department of Cardiology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain, **4** Arrhythmia Section, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

## Abstract

**Background:** Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a cardiac disease characterized by the presence of fibrofatty replacement of the right ventricular myocardium, which may cause ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. Pathogenic mutations in several genes encoding mainly desmosomal proteins have been reported. Our aim is to perform genotype-phenotype correlations to establish the diagnostic value of genetics and to assess the role of mutation type in age-related penetrance in ARVC.

**Methods and Results:** Thirty unrelated Spanish patients underwent a complete clinical evaluation. They all were screened for *PKP2*, *DSG2*, *DSC2*, *DSP*, *JUP* and *TMEM43* genes. A total of 70 relatives of four families were also studied. The 30 patients fulfilled definite disease diagnostic criteria. Genetic analysis revealed a pathogenic mutation in 19 patients (13 in *PKP2*, 3 in *DSG2*, 2 in *DSP*, and 1 in *DSC2*). Nine of these mutations created a truncated protein due to the generation of a stop codon. Familial assessment revealed 28 genetic carriers among family members. Stop-gain mutations were associated to a later age of onset of ARVC, without differences in the severity of the pathology.

**Conclusions:** Familial genetic analysis helps to identify the cause responsible for the pathology. In discrepancy with previous studies, the presence of a truncating protein does not confer a worse severity. This information could suggest that truncating proteins may be compensated by the normal allele and that missense mutations may act as poison peptides.

**Citation:** Alcalde M, Campuzano O, Berne P, García-Pavía P, Doltra A, et al. (2014) Stop-Gain Mutations in PKP2 Are Associated with a Later Age of Onset of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. PLOS ONE 9(6): e100560. doi:10.1371/journal.pone.0100560

**Editor:** Ali A. Sovari, University of Illinois at Chicago, United States of America

**Received:** January 9, 2014; **Accepted:** May 28, 2014; **Published:** June 26, 2014

**Copyright:** © 2014 Alcalde et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by CNIC-Translational 2008 (CNIC-03-2008), Obra Social "la Caixa," Fondo de Investigación Sanitaria (P111/00019), and RETICS (Red Investigación Cardiovascular. Instituto de Salud Carlos III). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: rbrugada@gencardio.com

## Introduction

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a rare cardiac pathology (ORPHA247) characterized by a progressive myocardial fibrofatty replacement, mainly of the right ventricle (RV), although up to 50% of cases also show a left ventricular (LV) involvement [1]. This abnormality in the myocardium disrupts electrical transmission causing ventricular arrhythmias, syncope and even sudden cardiac death (SCD) [2]. The National Centre for Biotechnology Information (NCBI) establishes a wide range of prevalence of the disease (1/2500–1/5000), depending on gender (3:1 in men) [3], and population origin. Sometimes SCD is the first symptom of the disease. In young athletes, ARVC is believed responsible for up to 15% of SCD cases [4]. Several studies have shown that around 60% of ARVC cases have a genetic origin [1,5]. Hence, the ARVC Task Force Criteria (TFC) has recently included genetic data as part of these criteria [6].

Typically, ARVC cases have an autosomal dominant pattern of inheritance. A recessive pattern has also been described, either associated to Naxos syndrome [7] or without this Naxos phenotype [8]. ARVC is mainly caused by pathogenic mutations in genes encoding desmosomal proteins: plakophilin-2 (*PKP2*), desmoplakin (*DSP*), desmocollin-2 (*DSC2*), desmoglein-2 (*DSG2*) and plakoglobin (PG), encoded by the *JUP* gene. Up to 60% of ARVC patients carry at least one mutation in one of these genes [9]. Genetic series have reported that 30%–40% carry a pathogenic mutation in the *PKP2* gene, followed by *DSP* (10%–15%) [10], *DSG2* (3%–8%) [11] and *DSC2* (1%–5%) [12]. In addition, non-desmosomal genes have also been identified as responsible for this pathology: transmembrane protein 43 (*TMEM43*), transforming growth factor beta 3 (*TGFB3*), Catenin alpha-3 (*CTNNA3*) desmin (*DES*), and recently described lamin A/C (*LMNA*), titin (*TTN*) and phospholamban (*PLN*) but with a lower incidence (so far <5% all together) [13].

Genotype-phenotype studies in families affected by ARVC show an incomplete penetrance and variable expressivity [1]. It remains unclear what are the triggering factors of the ARVC phenotype in genetic carriers. These have serious implications for the patient and for family members at risk. Thus comprehensive genotype-phenotype studies are required to better understand which asymptomatic carriers are at potential risk of developing the disease. This study aims to help address this question by assessing the prevalence of known ARVC-related genes in a Spanish population.

## Methods

### Study Population

All individuals included in our study were clinically evaluated at Hospital Clinic of Barcelona (Barcelona, Spain), Hospital Puerta de Hierro (Madrid, Spain), and Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona, Spain). The study was approved by the ethics committee of the Hospital Josep Trueta (Girona, Spain), followed the Helsinki II declaration and written informed consent was obtained from all participants.

All patients were Caucasian and native of Spain. They were identified after presenting clinical signs or symptoms of the disease. They were clinically evaluated and diagnosed according to the recently revised Task Force Criteria (TFC) of the European Society of Cardiology/International Society and Federation of Cardiology criteria for ARVC. Clinical data are shown in Table 1. Clinical evaluation of index cases and all available relatives included a complete physical examination, 12-lead electrocardiogram, 2-dimensional echocardiography, magnetic resonance imaging, exercise stress test, 24-hour Holter and genetic testing.

### Genetic analysis

Genetic testing was performed at the Cardiovascular Genetics Centre (Girona, Spain). Genomic DNA was extracted using commercial protocols (PUREGENE DNA, QIAGEN) from blood samples. After, DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR), purified by ExoSAP-IT (ISOGEN), and sequenced (Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystems). The analysis of the exonic and intron-exon regions was performed by SeqScape software (SeqScape, Applied Biosystems). Patient's DNA was screened for *PKP2* (ENST00000070846), *DSP* (ENST00000379802), *DSC2* (ENST00000280904), *DSG2* (ENST00000261590), *JUP* (ENST00000310706) and *TMEM43* (ENST00000306077).

In order to name and analyze each identified variation, and to consider their potentially relation with ARVC, we consulted public genetic databases (<http://browser.1000genomes.org/>) [14]. Identified variation were consulted in different databases to study their possible association with this pathology ARVD/C Genetic Variants Database ([www.arvcdatabase.info](http://www.arvcdatabase.info)) and Human Gene Mutation database ([www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)). However, since new exome data are questioning the pathogenicity of previously ARVC-associated genetic variants, we studied the variant frequency in general population using the Exome Sequencing Project [15], [16]. To identify potentially ARVC associated genetic variants, we selected all identified variants with a minor allele frequency lower than 1%. (MAF <0.01). All these low frequency variants and missense novel variants were accurately analyzed by Condel (CONsensus DELeteriousness score of missense SNVs data base) *in silico* platform to predict their potential pathogenicity [17]. Additionally, to analyse the potential pathogenic role of novel variants, genetic analysis was performed in 300 Spanish control subjects (600 control alleles) (non-related individuals with Spanish

ancestors). To associate a novel variation with the pathology we performed a cosegregation study.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS package. We analysed differences in ARVC phenotype severity using T test for independent samples: we took diagnostic score and age of the diagnosis as dependent variables, comparing groups of males and females, carriers and non-carriers and stop-gain and missense carriers. We also performed one-way ANOVA to analysed differences among affected genes (*PKP2*, *DSC2*, *DSG2* and *DSP*). A P value of <0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Study population

This ARVC Spanish cohort consisted of 30 unrelated index cases who fulfilled ARVC Task Force Criteria (table 1). The average age of our cohort was 36±12 years, with only two underage patients (11 years of age both). Of the 30 index cases, 19 (65%) were male. All index cases showed involvement of the RV and had either syncope, palpitations or dizziness. There were no significant gender differences in clinical presentation (p>0.05). Additionally, 14 cases (46,7%) had a family history of SCD. Unfortunately, familial evaluation was available only in 9 of our index cases. Electrocardiograms of these 9 index cases are shown in figures S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, and S11 in File S1. A total of 70 relatives of 9 families were also included in our study.

### ARVC related genetic variants

We identified 17 potentially ARVC associated genetic variants in 19 of 30 index cases (63%) after screening the ARVC-related desmosome genes (figure 1A): 43% in *PKP2*, 10% in *DSC2*, 6.5% in *DSP* and 3.5% in *DSG2*. We did not find any mutation neither in *JUP* nor *TMEM43*. Eighteen patients carried the heterozygote mutations, while only one individual carried the variation (*DSG2* c.2440T>C, p.C814R) in homozygosity. There were 17 different ARVC-related variants present in 19 patients, since two individuals (13 and 28, table 2) carried the same nonsense genetic variation (*PKP2* c.275T>A, p.L92\*), and two other individuals (26 and 28, table 2) carried the same deletion c.1643delG, V548fsX562 in *PKP2* gene. Of all genetic variations identified, 6 (35,3%) were novel (2 in the *DSP*, 3 in *PKP2* and 1 in *DSG2*). None of them were previously identified in genetic databases (table 2).

Of the 70 relatives screened, 28 were mutation carriers and 11 of them showed ARVC phenotype, positive Task Force Criteria (Table S3 in File S1) defining incomplete penetrance. None of the individuals without the genetic variation showed any symptoms or cardiac structural abnormalities related to ARVC.

### Higher relative percentatge of stop-gain mutations in *PKP2*

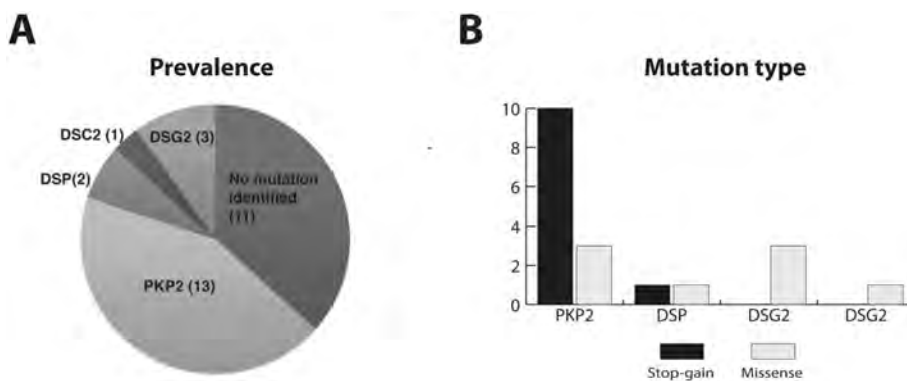
We identified 13 individuals who carried a potentially pathogenic mutation in the *PKP2* gene. Three of them carried a missense mutation, two previously described (p.R388W and p.D460N) and one novel (c.2060T>C-p.L687P-). Variation p.D460N in *PKP2* was previously reported as a genetic variant of unknown significance [5]. The remaining ten mutations were truncating *PKP2* variations (*PKP2*<sup>TR</sup>). Then, *PKP2*<sup>TR</sup> mutations represent a 52.5% of total genetically identified cases in our cohort. This *PKP2* truncating group includes four *indels* -three deletion and one insertion- (c.2013delC p.P671Pfs12\*, c.1643delG p.G548Vfs\*14, c.604-605insG p.V202Vfs\*13 and c.2576delA p.K859Rfs\*881ext\*48-), and four nonsense variations (c.2203C>



**Table 1.** Clinical characteristics for Task Force Criteria (TFC) score.

Index case	Age	Gender	Symptoms	I.RV size/function		II.RV Histology		III. Repolarization abnormalities		IV. Depolarization/Conduction abnormalities		V. Arrhythmias		VI. Family History SCD		Diagnostic Score
				Maj	Min	Maj	Min	Maj	Min	Maj	Min	Maj	Min			
1	50	F	Syncope	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2/0
2	33	F	Palpitations	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	2/2
3	52	F	Syncope	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	3/1
4	46	F	Dizziness	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	3/2
5	33	M	Palpitations	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	4/1
6	37	F	Palpitations	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	4/2
7	33	M	Palpitations	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	4/2
8	38	F	Palpitations	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	4/0
9	34	M	Dizziness	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	3/1
10	54	F	Palpitations	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	0/4
11	47	M	Palpitations	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	1/3
12	20	M	Palpitations	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	2/1
13	11	M	Palpitations	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	4/0
14	11	M	Syncope	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	4/1
15	30	M	Palpitations	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	2/2
16	28	M	Palpitations	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	3/1
17	28	M	Palpitations	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	4/1
18	29	M	Palpitations	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	2/1
19	38	F	Syncope	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	3/1
20	24	F	Syncope	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3/1
21	22	F	Sudden death	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	2/1
22	23	F	Syncope	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	4/0
23	42	M	Syncope	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	5/0
24	45	M	Palpitations	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	4/1
25	47	M	Palpitations	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	3/2
26	38	M	Palpitations	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2/1
27	58	M	Palpitations	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	2/0
28	37	M	Syncope	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	4/2
29	19	M	Palpitations	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3/1
30	41	M	Sudden death	Post mortem diagnosis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

doi:10.1371/journal.pone.0100560.t001



**Figure 1. Representation of genetic results.** **A-** Prevalence of mutations in desmosomal genes. **B-** Prevalence of truncating protein mutations (black) and missense mutations (grey). doi:10.1371/journal.pone.0100560.g001

G p.R735\*, c.1912C>T p.Q638\*, c.1237C>T p.R413\*, c.275T>A p.L92\*). Seven of these eight variations cause shorter proteins, inducing a partially or completely lost of the armadillo repeats domain (figure 2). Additionally, the variation c.2576delA p.K859Rfs\*881ext\*48 causes a frameshift with a final stop codon in the 3' UTR region, and adds an extra 48 aminoacid to the protein.

In the remaining analyzed genes, we identified three missense genetic variations (10%) in the *DSG2* gene (p.R46Q, p.C814R and p.V56M). Only one of them, p.R46Q, was previously reported as pathogenic while p.V56M was classified as genetic variant of unknown significance [5]. The variation p.C814R was a novel genetic variation. Two of our 30 probands (6,7%) carried a genetic variant in the *DSP* gene (p.Q986\* and p.A2019S). We found one genetic variant (3,3%) in the *DSC2* gene. The *missense* variation (p.L732V) was previously described as genetic variant of unknown significance [5]. All novel missense variations were predicted *in silico* by Condel as deleterious (table 2) and the altered aminoacid was conserved among species (figure S1 in File S1).

In summary, the relative percentage of truncating versus missense mutations in *PKP2* are significantly higher than in any other desmosomal gene (figure 1B). In fact, truncating mutations in *PKP2* gene represent 73% of the *PKP2* variations identified, while the relative percentage is 50% in *DSP*, and zero in the remaining genes.

#### Later age of onset in stop-gain mutation carriers

We identified significant differences in the age of diagnosis according to the type of mutation. Carriers with missense variations were diagnosed with ARVC at an early age (27 years old) than carriers with stop-gain mutations (39 years old) ( $p < 0.05$ , T test independent samples. Table S1 in File S1). We also specifically identified a later age of onset in *PKP2*<sup>TR</sup> than missense carriers ( $p < 0.05$ , T test independent samples, excluding stop-gain in *DSP*), since all stop-gain mutations were in *PKP2*, beside one in *DSP*. Besides index cases, we also found significant differences in the age of onset when analysing 30 individuals mutation carriers already showing ARVC phenotype, fulfilling TFC (19 index cases and 11 relatives) from families; we found very similar results than in index cases, thus stop-gain carriers were diagnosed with ARVC at 38 years old and missense carriers at 27 years old (table S2 in File S1).

The Kaplan–Meier graph for freedom of ARVC phenotype for groups missense and stop-gain carriers was performed taking all genetic carries 47 mutation carriers (19 index cases and 28

relatives). The graph (figure 3) showed that symptom-free rate was lower in missense carriers group than missense carriers group, i.e stop-gain group has a higher percentage of free of symptoms individuals, until 50 years-old. There were 17 carriers who remain still asymptomatic with a wide range of age (9–80).

#### No difference in TFC score

Task Force criteria score was not significantly different between in index cases (carriers and non-carriers, table S1 in File S1). We did not identify significant differences in the clinical manifestations of patients according to gene affected nor according to the type of mutation.

#### Familial cosegregation

The 5 most relevant families, with at least three carriers in the family (table S3 in File S1), are explained in detail below. In family A (figure 4A) index case is III.4. Two out of the five siblings carry the mutation. In the third-generation we identified 3 carriers; one of them showed ARVC phenotype (IV.5), the other two (IV.4 and IV.7) did not show any clinical symptoms of the disease at an early age (27 and 20). In family B (figure 4B), the ARVC causing variation is *PKP2* c.2013delC (p.P671Pfs12\*). Index case is III.2. This family showed one case of SCD (II.1) in the father's branch. Only the index case's father carried the variation c.2013delC (p.P671Pfs12\*). This variation was identified in two relatives (II.3 and III.3), but only one of them showed an ARVC phenotype (II.3).

In family C (figure 4C), the ARVC causing variation is *PKP2* c.1912C>T (p.Q638\*). Index case is II.5. Only two (II.5 I II.6) of five carriers (I.2, II.2, II.5, II.6 and III.1) showed ARVC symptoms.

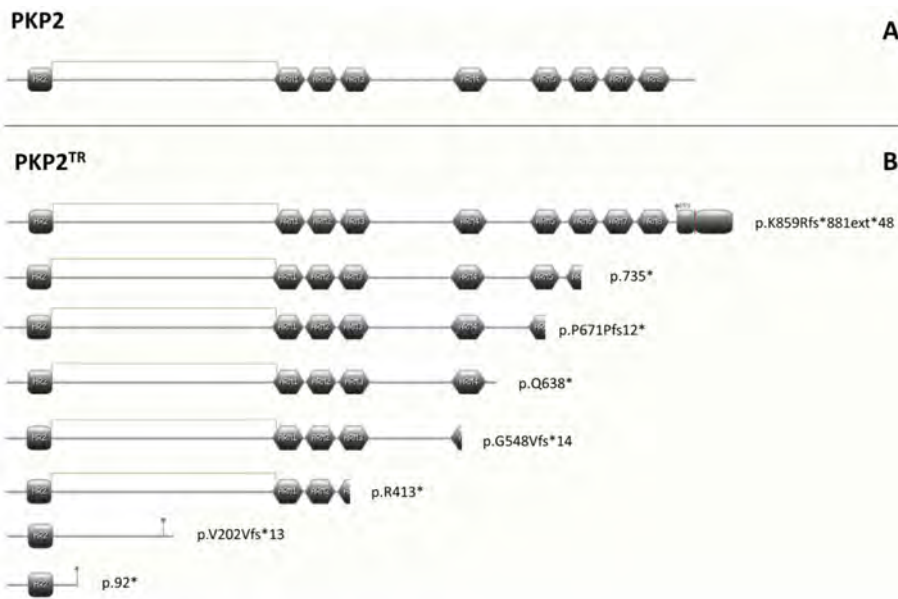
In family D (figure 4D) the ARVC causing variation is *PKP2* c.1237C>T (p.R413\*). Index case is II.2. In this family the identified variation showed complete penetrance, since all mutation carriers showed clinical ARVC phenotype (II.3, II.4, II.6 and III.2,) and there have even been two cases of sudden death (I.1 and II.3).

Family E (figure 4E) included evaluation of 4 members. The index case is III.2, who carries a homozygous c.2440T>C (p.C814R) variation in the *DSG2* gene. The proband showed ARVC phenotype at the age of 20 years while the heterozygous carriers (II.5, II.6 and III.1) are clinically unaffected. Electrocardiogram of index case is shown in figure S2 in File S1.

**Table 2.** Mutations identified in index cases.

Index case	Gene	Nucleotide change	Genotype	MAF (EA)	HGMD	Predicted protein change	Condel Prediction	Reported association with ARVC
1	DSP	c.2956C>T	HT	N/I	Novel	p.Q986*	-	-
2	PKP2	c.2013delC	HT	N/I	CD061457	p.P671Pfs12*	-	Pathogenic
3	PKP2	c.2203C>G	HT	N/I	CM043061	p.R735*	-	Pathogenic
4	PKP2	c.1237C>T	HT	N/I	CM060431	p.R413*	-	Pathogenic
6	PKP2	c.1912C>T	HT	N/I	CM043056	p.Q638*	-	Pathogenic
7	PKP2	c.604-605insG	HT	N/I	Novel	p.V202Vfs*13	-	-
8	DSG2	c.137G>A	HT	N/I	CM061701	p.R46Q	Deleterious	Pathogenic
12	DSG2	c.2440 T>C	HM	N/I	Novel	p.C814R	Deleterious	Pathogenic
13/27	PKP2	c.275T>A	HT	N/I	CM102825	p.L92*	-	-
14	DSP	c.6055 G>T	HT	N/I	Novel	p.A2019S	Deleterious	Pathogenic
16	PKP2	c.1162 C>T	HT	N/I	CM097906	p.R388W	Deleterious	Pathogenic
17	DSG2	c.166G>A	HT	0.003	CM070918	p.V56M	Deleterious	Unknown significance
18	PKP2	c.1378 G>A	HT	N/I	*Cox et al 2011	p.D460N	-	Unknown significance
23	P2	c.2576delA	HT	N/I	Novel	p.X859Rfs*88ext*48	-	-
24	PKP2	c.2060 T>C	HT	N/I	Novel	p.L687P	Deleterious	-
26/28	PKP2	c.1643delG	HT	N/I	CD043194	p.G548Vfs*14	-	Pathogenic
29	DSC2	c.2194 T>G	HT	0.001	CM091021	p.L732V	Deleterious	Unknown significance

MAF = minor allele frequency consulted in European American (EA) individuals in exome sequencing project. N/I = variation not previously identified in general population. Genotype: HT = Heterozygous/HM = Homozygous. Predicted protein changed is named following Human genome variation society recommendations. \*Not available in public databases but already described as pathogenic mutation. doi:10.1371/journal.pone.0100560.t002



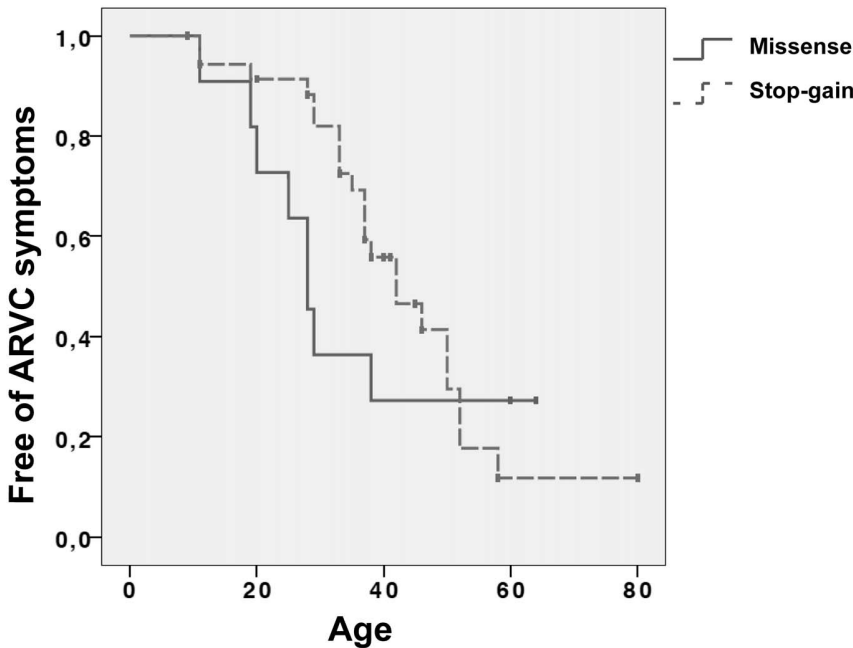
**Figure 2. Representation of PKP2 domains.** **A-** Representation of wild type PKP2. It has HR2 domain and armadillo repeats domain (8 armadillo repeats, ARM). **B-** Representation of truncated PKP2 (PKP2<sup>TR</sup>) and their domains. PKP2<sup>TR</sup> p.92\* and p.V202Vfs215\* only have HR2 domain but not any of ARM repeats, p.R413\* loses partially ARM 3 to C-terminus, and p.548fs562\* loses partially ARM 4, p.Q638\* conserve completely ARM 4 but loses the rest of protein until to C-terminus and p.R735\* loses partially ARM6 to C-terminus. PKP2<sup>TR</sup> p.K859V\*881ent\*48 extends their length to 930 amino acids.

doi:10.1371/journal.pone.0100560.g002

**Discussion**

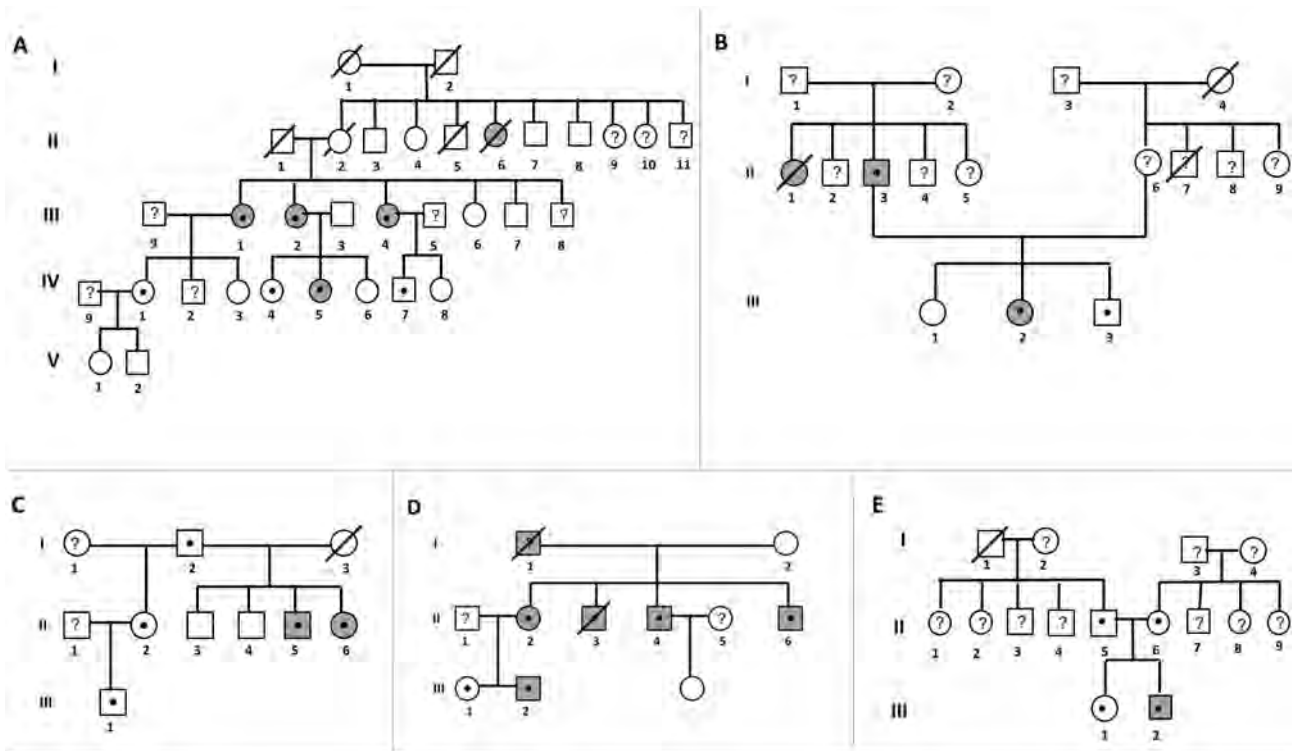
The present work aims to assess the prevalence of known ARVC-related genes in a Spanish population, to establish the diagnostic value of genetics and to assess the role of mutation type in age-related penetrance in ARVC.

Several data are in accordance with previous studies. Namely, average age of presentation, 36±12 years [18]; low incidence of ARVC in children (only two of our index cases were children, 11 years-old) [19,20]; as well as similar prevalence of ARVC in men (65% in our cohort) [3,21]. In addition, we identified a potential disease-causing variation in 63% of cases; with 40% of ARVC



**Figure 3. Symptom-free Kaplan-Meier graph.** Kaplan–Meier graph shows percentage of free of symptoms in carriers based on age. A cross represents carriers with no ARVC phenotype by the time of the study (censored cases).

doi:10.1371/journal.pone.0100560.g003



**Figure 4. Pedigrees from 5 families.** ARVC clinically affected individuals (grey round/square) and genetic carriers (black point inside round/square), not evaluated (question mark inside round/square), death (round/square with slash) and sudden death (grey round/square with slash). **A-** Family A. Index case is III.4 and carries c.2203 C>G (p.R735\*) in *PKP2*. **B-** Family B. Index case is III.2 and carries c.2013delC (p.P671Pfs12\*) in *PKP2*. **C-** Family C. Index case is II.4 and carries c.1912C>T (p.Q638\*) in *PKP2*. **D-** Family D. Index case is II.1 and carries c.1237C>T (p.R413\*) in *PKP2*. **E-** Family E. Index case is III.2, who carries a homozygous c.2440T>C (p.C814R) variation in the *DSG2* gene. doi:10.1371/journal.pone.0100560.g004

cases carrying a pathogenic mutation in the *PKP2* gene, supporting this as the main gene responsible for ARVC. These genetic data are also similar to previously published data on Western ARVC cohorts [22–25].

Compound genetic variations have been reported in some ARVC studies, representing nearly 30% of the total ARVC cases [18,26]. In our study we did not identify any index case carrying more than one mutation, despite that we analysed all the most prevalent ARVC genes. On the other hand, we identified six novel mutations in known genes, highlighting that the investigation for only known ARVC mutations may miss some cases of genetic ARVC.

ARVC is an autosomal dominant genetic disease although there are some reported cases with a recessive pattern [8]. We identified one homozygous case, variation in the *DSG2* gene, who clearly showed an ARVC phenotype (family E), suggesting recessive pattern for this variant in this family. This fact supports that ARVC may also be present in its recessive form without associated palmoplantar keratoderma and woolly hair, in concordance to previous reported studies [27,28]. There is always a possibility that both heterozygous carriers present a minimal form of the disease, which escapes present diagnostic technologies. The presence of double mutants in other diseases has been linked to more severe phenotypes [29].

**Type of mutation**

*PKP2*<sup>TR</sup> mutations are the most common ARVC-related genetic variations, representing 52.5% of the total ARVC variants.

They are responsible for 33.5% of the total ARVC cases included in this study. These results are according with previous genetics studies in ARVC patients. In our study, all families carrying *PKP2*<sup>TR</sup> showed incomplete penetrance, except family D carrying p.R413\* where all carriers were symptomatic. This incomplete penetrance and variable expressivity in *PKP2*<sup>TR</sup> was already described in previous studies [30].

The synthesis of *PKP2* is crucial for protein interactions in myocytes, considered key point to developing the disease [31]. Likewise, nuclear localization of plakoglobin is essential for progenitor cardiac cells differentiation into adipocytes, triggering suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling [32,33].

The pathogenicity of missense and truncating variations in cardiac diseases is a matter of intense debate at present, especially in structural diseases like cardiomyopathies [34]. Stop-codon mutations in *PKP2* have been considered more pathogenic because they alter protein length. Truncating *PKP2* proteins may lead to haploinsufficiency because of their instability [31]. This would be the most likely cause for the genesis of dominant ARVC associated with mutations in *PKP2*. In addition, while the process of degradation remains unclear, some previous studies have shown diminished protein levels of *PKP2* in immunoblot and immunohistochemical analyses [25,35]. Thus, the presence of truncating *PKP2* mutations would confer a worse phenotype, with a symptom presentation at a younger age. This was shown in a recent study in a Japanese cohort which found that truncating *PKP2* mutations are associated with the development of the disease at a significantly younger age than other mutation carriers [16]. However, in contrast with this study, our work shows that

stop-gain variations in *PKP2* are associated with a later age of onset ARVC. Stop-gain carriers showed a mean age of diagnosis 36–37 years old while missense carriers have a significantly earlier age of onset (27 years old). This raises an important alternative hypothesis as to the pathogenicity of missense and truncated proteins and their role in phenotype.

We hypothesize that PKP2<sup>TR</sup> is associated with haploinsufficiency, but this can be compensated by the normal allele. On the other hand missense variation may act through a dominant negative effect, disrupting the normal functioning of the wild type protein. Further studies in cellular models will be necessary to understand the role of PKP2<sup>TR</sup> and missense variations in the pathophysiological ARVC process, but the data indicate that the severity of truncated proteins are not as clear as previously believed. This has important implications for the genetic diagnostic field in structural cardiomyopathies.

In conclusion, this study reports a detailed genetic analysis of desmosomal ARVC-associated genes in a Spanish cohort. Genetic analysis revealed truncating PKP2 mutation as the most frequent ARVC related genetic variation. However, in contrast to previous studies, we show that missense mutations have a worse clinical presentation, pointing towards the possible role of mutations as causing a dominant-negative effect on the normal allele. Future genotype-phenotype studies in larger cohorts will either confirm or refute this observation. However, at present this has important implications for clinical decision making, in which truncated proteins are believed of worse functional severity, and therefore are considered responsible for the pathological phenotype [34].

### Study limitations

We believe that this study provides a general overview of the clinical and genetic profile of an ARVC cohort from Spain. However, some limitations should be noted. First, in any genetic study there is a concern of biased patient selection. Patients included in this study were clinically evaluated after symptom presentation, and age of this clinical diagnosis has been taken as age of ARVC onset. The possible bias due to the selected sample should be taken into account when applying genetic testing for the diagnosis in other populations. A second limitation is the mutation distribution; stop-gain mutations are mostly in *PKP2* gene, while missense mutations are distributed in all genes. More studies are needed to clarify the definitive role of stop-gain mutations. The third limitation is the reduced number of patients due to the low prevalence of the disease. Further genotype-phenotype studies of Spanish cohorts are needed, including a larger number of patients and relatives to support the data obtained. In addition, we cannot discard that patients without identified genetic variation could carry a pathogenic mutation in a known gene with minor

prevalence or in an unknown gene, so far, or other genetic defects such as copy number variations (CNV) could be also responsible for negative ARVC cases in our cohort, accordingly to recent published studies [36,37]. Finally, studies in cellular models were not performed, which would complement these results to fully understand the role of PKP2<sup>TR</sup> and missense variations in the pathophysiological ARVC process.

### Supporting Information

**File S1 Figure S1.** Conservation of the altered aminoacids in novel mutations. Aminoacids are represented by standard abbreviation. (\*) Indicates conserved aminoacid among species. Rectangle indicates the position of the mutation. A- Amino acid alignment for PKP2 p.L687. B- Amino acid alignment for DSP p.A2019. C- Amino acid alignment for DSG2 p.C814. **Figure S2-** Electrocardiogram of index case 12 carrying c.2440 T>C p.C814R variation in *DSG2*. **Figure S3-** Electrocardiogram of index case 16 carrying c. 1162 C>T p.R388W variation in *PKP2* gene. **Figure S4-** Electrocardiogram of index case 8 carrying c.137G>A p.R46Q variation in *DSG2* gene. **Figure S5-** Electrocardiogram of index case 4 carrying c.1237C>T p.R413\* variation in *PKP2* gene. **Figure S6-** Electrocardiogram of index case 6 carrying c.1912C>T p.Q638\* variation in *PKP2* gene. **Figure S7-** Electrocardiogram of index case 13 carrying c.275T>A p.L92\* variation in *PKP2* gene. **Figure S8-** Electrocardiogram of index case 3 carrying c.2203C>G p.R735\*variation in *PKP2* gene. **Figure S9-** Electrocardiogram of index case 1 carrying c.2956C>T p.Q986\* variation in *DSP* gene. **Figure S10-** Electrocardiogram of index case 2 carrying c.2013delC p.P671Pfs12\* variation in *PKP2* gene. **Figure S11.** Electrocardiogram of index case 29 carrying c.2194 T>G p.L732V in *DSC2* gene. **Table S1. Comparison table of index cases and statistics results.** Evaluated variables for statistical analysis were Task Force Criteria score (giving two points for major criteria and one point for minor criteria) and age at the diagnosis. **Table S2. Comparison table of all genetic carriers and statistics results.** **Table S3. Clinical information of relatives carriers included in the study.** N/S - not shown. N/E - Not evaluated. N/A - Not available. (DOC)

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MA OC RB. Performed the experiments: MA. Analyzed the data: MA OC PB PGP AD EA RB. Contributed reagents/materials/analysis tools: GSB AI LAP JB RB. Wrote the paper: MA OC PB PGP AD EA JB RB.

### References

- Herren T, Gerber PA, Duru F (2009) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a not so rare “disease of the desmosome” with multiple clinical presentations. *Clin Res Cardiol* 98: 141–158.
- Marcus FI, Zareba W, Calkins H, Towbin JA, Basso C, et al. (2009) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia clinical presentation and diagnostic evaluation: results from the North American Multidisciplinary Study. *Heart Rhythm* 6: 984–992.
- Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, et al. (2007) Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. *Circulation* 115: 1710–1720.
- Corrado D, Fontaine G, Marcus FI, McKenna WJ, Nava A, et al. (2000) Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: need for an international registry. Study Group on Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy of the Working Groups on Myocardial and Pericardial Disease and Arrhythmias of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the World Heart Federation. *Circulation* 101: E101–106.
- Cox MG, van der Zwaag PA, van der Werf C, van der Smagt JJ, Noorman M, et al. (2011) Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: pathogenic desmosome mutations in index-patients predict outcome of family screening: Dutch arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy genotype-phenotype follow-up study. *Circulation* 123: 2690–2700.
- Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Baucé B, et al. (2010) Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J* 31: 806–814.
- Rampazzo A (2006) Genetic bases of arrhythmogenic right ventricular Cardiomyopathy. *Heart Int* 2: 17.
- Awad MM, Dalal D, Cho E, Amat-Alarcon N, James C, et al. (2006) DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 79: 136–142.

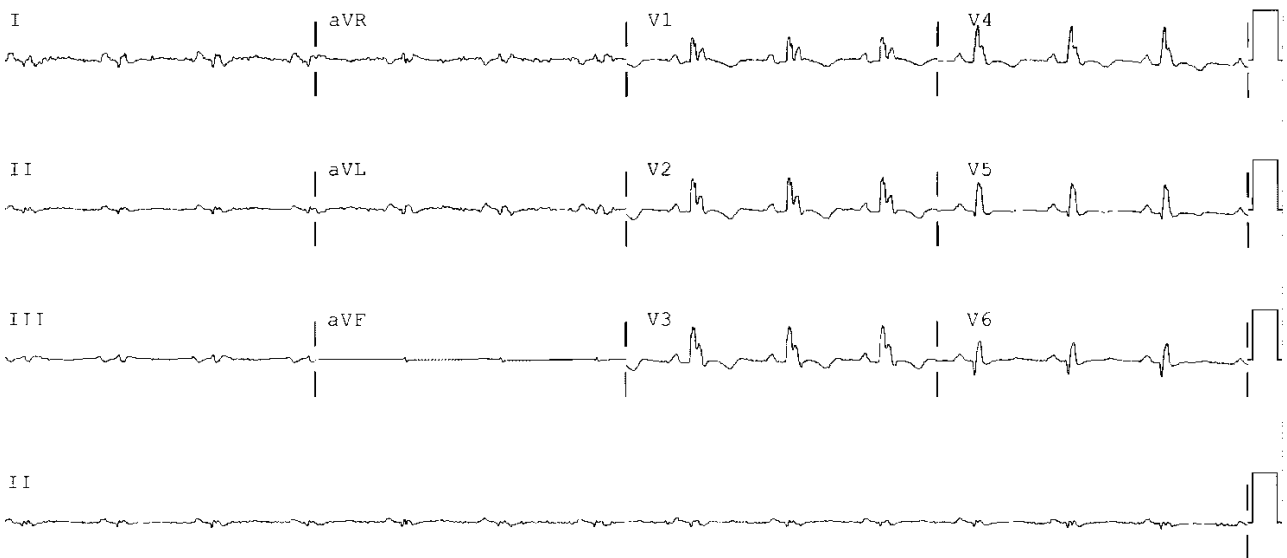
9. Barahona-Dussault C, Benito B, Campuzano O, Iglesias A, Leung TL, et al. Role of genetic testing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Clin Genet* 77: 37–48.
10. Rampazzo A, Nava A, Danieli GA, Buja G, Daliento L, et al. (1994) The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24. *Hum Mol Genet* 3: 959–962.
11. Christensen AH, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Haunso S, Svendsen JH (2010) Missense variants in plakophilin-2 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy patients—disease-causing or innocent bystanders? *Cardiology* 115: 148–154.
12. Saffitz JE, Asimaki A, Huang H (2009) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: new insights into disease mechanisms and diagnosis. *J Investig Med* 57: 861–864.
13. Campuzano O, Alcalde M, Allegue C, Iglesias A, Garcia-Pavia P, et al. (2013) Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Med Genet* 50: 280–289.
14. 1000 Genomes Project Consortium AG, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurler ME, McVean GA. (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061–1073.
15. ExomeVariantServer. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (June 2012)
16. Andreasen C, Nielsen JB, Refsgaard L, Holst AG, Christensen AH, et al. (2013) New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants. *Eur J Hum Genet*.
17. Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N (2011) Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score. *Condel. Am J Hum Genet* 88: 440–449.
18. Dalal D, Molin LH, Piccini J, Tichnell C, James C, et al. (2006) Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2. *Circulation* 113: 1641–1649.
19. Pedra SR, Hornberger LK, Leal SM, Taylor GP, Smallhorn JF (2005) Cardiac function assessment in patients with family history of nonhypertrophic cardiomyopathy: a prenatal and postnatal study. *Pediatr Cardiol* 26: 543–552.
20. Taylor M, Graw S, Sinagra G, Barnes C, Slavov D, et al. (2011) Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation* 124: 876–885.
21. Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ (2007) Role of genetic analysis in the management of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 50: 1813–1821.
22. Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Boffagna G, Bauce B, et al. (2002) Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 71: 1200–1206.
23. Yang Z, Bowles NE, Scherer SE, Taylor MD, Kearney DL, et al. (2006) Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Res* 99: 646–655.
24. Aad G, Abbott B, Abdallah J, Abdelalim AA, Abdesslem A, et al. (2011) Search for dilepton resonances in pp collisions at  $\sqrt{s}=7$  TeV with the ATLAS detector. *Phys Rev Lett* 107: 272002.
25. Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, et al. (2004) Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 36: 1162–1164.
26. Dalal D, James C, Devanagondi R, Tichnell C, Tucker A, et al. (2006) Penetrance of mutations in plakophilin-2 among families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 48: 1416–1424.
27. Sato T, Nishio H, Suzuki K (2011) Sudden death during exercise in a juvenile with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and desmoglein-2 gene substitution: a case report. *Leg Med (Tokyo)* 13: 298–300.
28. Rasmussen TB, Palmfeldt J, Nissen PH, Magnoni R, Dalager S, et al. (2013) Mutated desmoglein-2 proteins are incorporated into desmosomes and exhibit dominant-negative effects in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Mutat* 34: 697–705.
29. Nakajima T, Kaneko Y, Irie T, Takahashi R, Kato T, et al. (2012) Compound and digenic heterozygosity in desmosome genes as a cause of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in Japanese patients. *Circ J* 76: 737–743.
30. Kannankeril PJ, Bhuiyan ZA, Darbar D, Mannens MM, Wilde AA, et al. (2006) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a novel plakophilin 2 mutation: wide spectrum of disease in mutation carriers within a family. *Heart Rhythm* 3: 939–944.
31. Joshi-Mukherjee R, Coombs W, Musa H, Oxford E, Taffet S, et al. (2008) Characterization of the molecular phenotype of two arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)-related plakophilin-2 (PKP2) mutations. *Heart Rhythm* 5: 1715–1723.
32. Lombardi R, Marian AJ (2010) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy is a disease of cardiac stem cells. *Curr Opin Cardiol* 25: 222–228.
33. Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, et al. (2006) Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest* 116: 2012–2021.
34. Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, et al. (2012) Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 366: 619–628.
35. Asimaki A, Tandri H, Huang H, Halushka MK, Gautam S, et al. (2009) A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med* 360: 1075–1084.
36. Roberts JD, Herkert JC, Rutberg J, Nikkel SM, Wiesfeld AC, et al. (2013) Detection of genomic deletions of PKP2 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Clin Genet* 83: 452–456.
37. Li Mura IE, Bauce B, Nava A, Fanciulli M, Vazza G, et al. (2013) Identification of a PKP2 gene deletion in a family with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet*.

# Supplemental Material

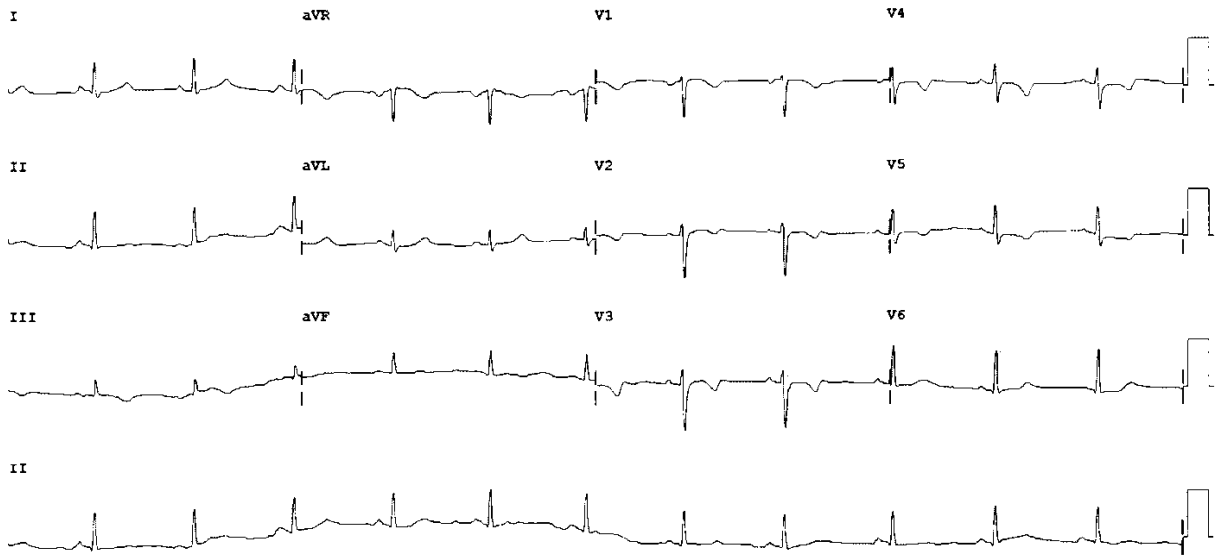


<b>A</b>	598	RSRKVKEQYQDMPMPEEKSNPKGVLEWLWHSIVIRMYLSLIAKSVRNYTQEASLGALQNL	657	<i>Bos taurus</i>
	653	RSRKIKEQYQDMPMPEEKSNPKGVLEWLWHSIVIRMYLSLIAKSVRNYTQEASLGALQNL	712	<i>Canis familiaris</i>
	651	RSRKVKEQYQDVPMPPEEKSNPKGVLEWLWHSIVIRMYLSLIAKSVRNYTQEASLGALQNL	710	<i>Homo sapiens</i>
	565	RSRKLKEQYQDLQMPPEERSNPHGIEWLWHSIVIRMYLSLIAKSTRNYTQEASLGALQNL	624	<i>Mus musculus</i>
	640	RSRKVKEQYQDMPMPEEKSNPKGVLEWLWHSIVIRMYLSLIAKSVRNYTQEASLGALQNL	699	<i>Macaca mulatta</i>
	148	RSRKVKEQYQDTPMPEERSSPRGIEWLWHSIVIRMYLSLIAKSSRNYTQEASLGALQNL	207	<i>Rattus norvegicus</i>
	569	RSRKVKEQYQDMPMPEEKSNPKGVLEWLWHSIVIRMYLSLIAKSARNYTQEASLGALQNL	628	<i>Sus scrofa</i>
	****:***** ***:*.*:*:*****:*****:*****:*****:*****			
<b>B</b>	1984	QLIDKTTLDKLLKGGKKSVEEVASEIQPFLRGAGSINGASASPKKYSIVEAKRKKLI	2043	<i>Homo sapiens</i>
	1996	QLIDKTTLDKLLKGGKKSVEEVASEIQPFLRGAGAIAGASASPKKYSIVEAKRKKFIT	2055	<i>Mus musculus</i>
	1994	QLIDKATLDKLLKGGKKSVEEVASEIQPFLRGAGAIAGASASPKKYSIVEAKRKKLIT	2053	<i>Bos taurus</i>
	1977	QLIDKTTLDKLLKGGKKSVEEVASEIQPFLRGAGAIAGASASPKKYSIVEAKRKKLIT	2036	<i>Canis familiaris</i>
	1439	QLIDKTTLDKLLKGGKKSVEEVASEIQPFLRGAGAIAGASASPKDKYSIVEAKRKKLIT	1498	<i>Sus scrofa</i>
	1991	QLIDKTTLDKLLKGGKKSVEEVASEIQPFLRGAGAIAGASASPKKYSIVEAKRKKFIT	2050	<i>Rattus norvegicus</i>
	1980	QLIDKTTLDKLLKGGKKSVEEVASEIQPFLRGAGSINGASASPKKYSIVEAKRKKLIT	2039	<i>Gorilla gorilla</i>
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****			
<b>C</b>	773	RNYFTDKAASYTEEDENHTAKDCLLVYSQEETESLNASIGCCSFIEGELDDRFLDDLGLK	832	<i>Homo sapiens</i>
	777	RSYFTEKAASYNGEDDLHMAKDCCLLVYSQEDTASLRGSGVCCSFIEGELDDLFLDDLGLK	836	<i>Mus musculus</i>
	768	RSYFTEKAASYIGEDDMHTAKDCLLVYSQEDTESLRGSIIGCCSFIEGELDDRFLDDLGLK	827	<i>Bos taurus</i>
	773	RNYFSDKAASYTEEDENHTAKDCLLVYSQEETESLNASIGCCSFIEGELDDRFLDDLGLK	832	<i>Macaca mulatta</i>
	754	RNYFTEKAASYTEEDDVHLGKDCCLLVYSQEETESLHGSIGCCSFIEGELDDGFLDDLGIK	813	<i>Equus Caballus</i>
	759	RSYFTEKAASYAGEDDFHLAKDCCLLVYSQEDTDSLRSVGGCCSFIEGELDDLFLDDLGPK	818	<i>Rattus norvegicus</i>
	772	RNYFTDKVASYTEEDENYHTAKDCLLVYSQEETESLNASIGCCSFIEGELDDRFLDDLGLK	831	<i>Gorilla gorilla</i>
	*.***:*.*** ***: : .*****:*.***:*.***:*****:*****:*****			

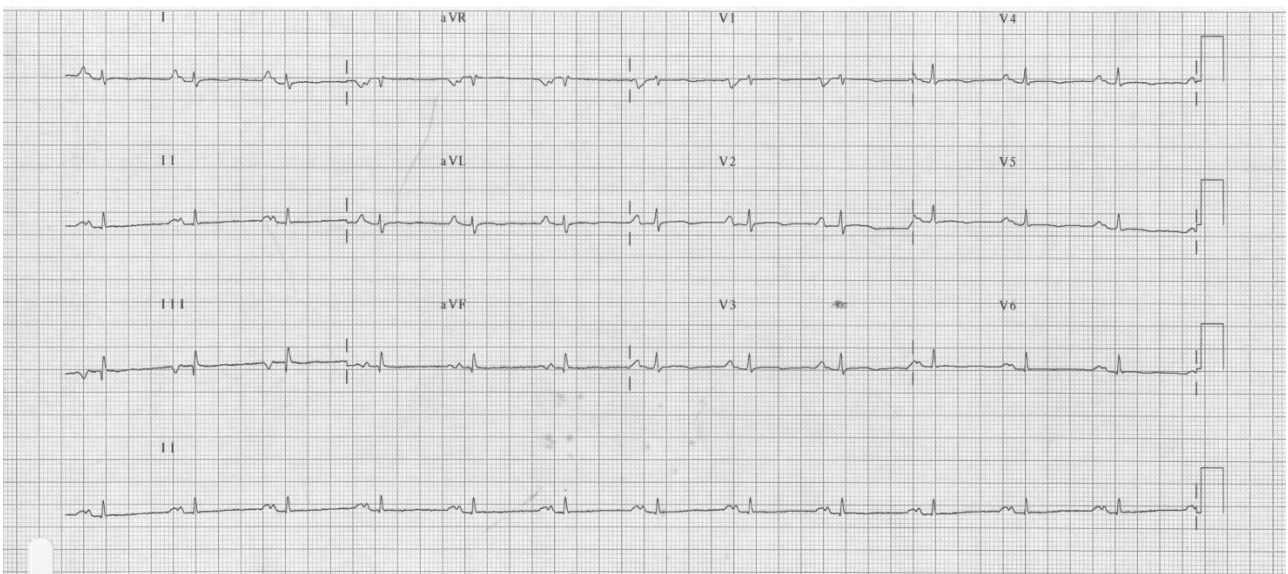
**Figure S1.** Conservation of the altered aminoacids in novel mutations. Aminoacids are represented by standard abbreviation. (\*) Indicates conserved aminoacid among species. Rectangle indicates the position of the mutation. A- Amino acid alignment for PKP2 p.L687. B- Amino acid alignment for DSP p.A2019. C- Amino acid alignment for DSG2 p.C814.



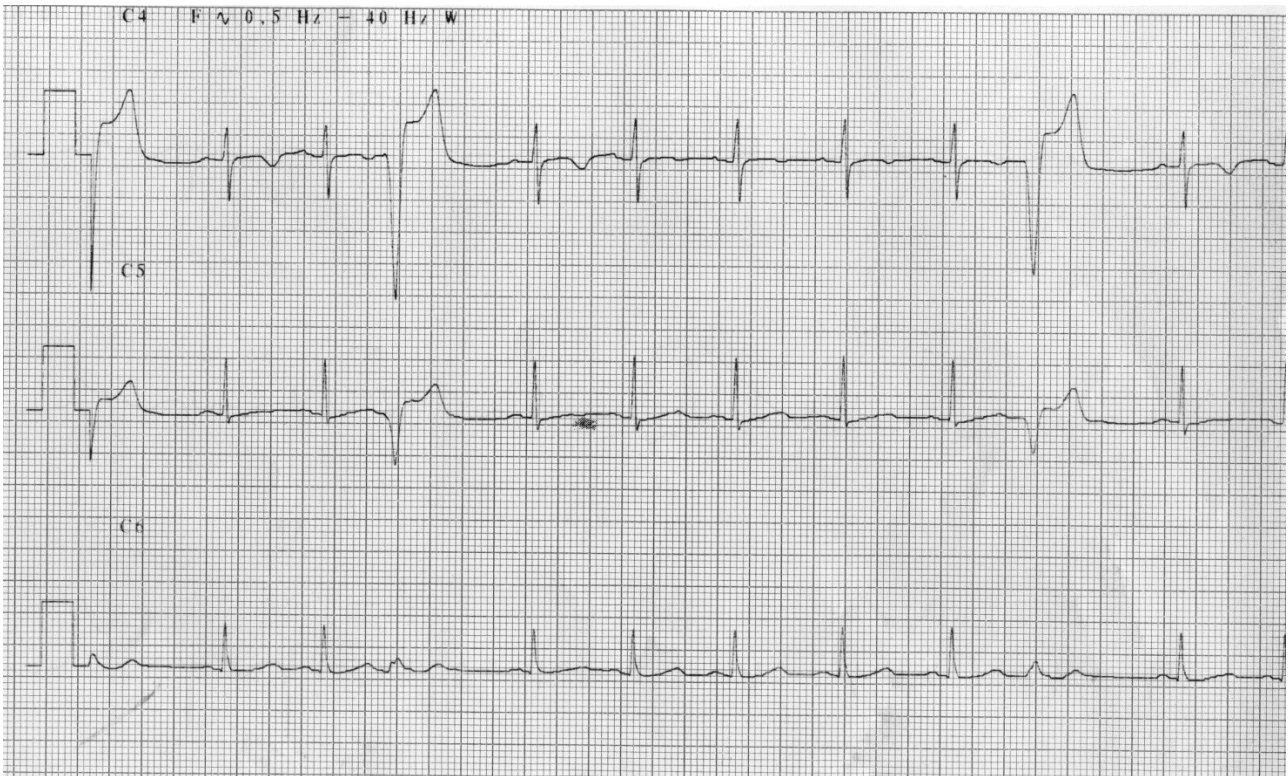
**Figure S2-** Electrocardiogram of index case 12 carrying c.2440 T>C p.C814R variation in *DSG2*.



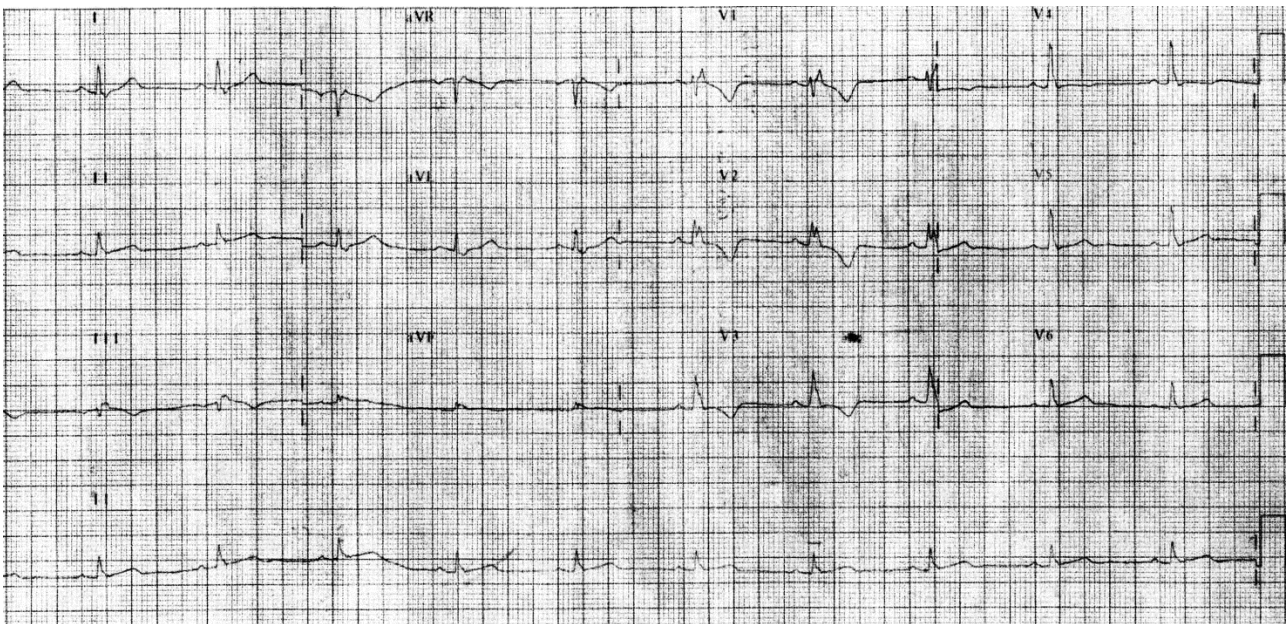
**Figure S3-** Electrocardiogram of index case 16 carrying c. 1162 C>T p.R388W variation in *PKP2* gene.



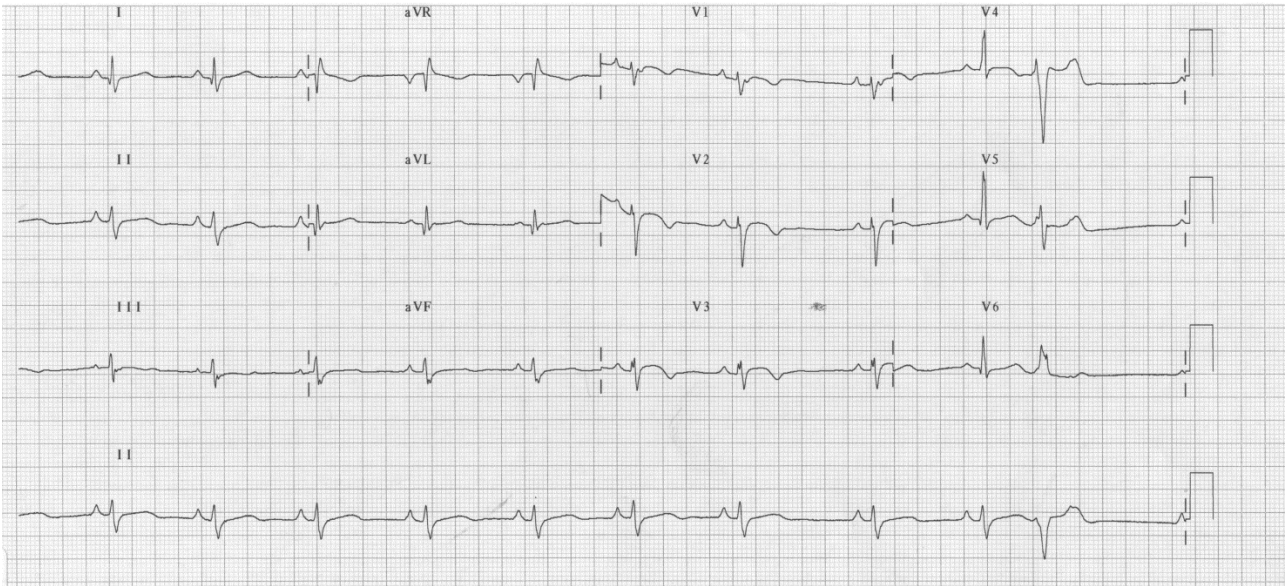
**Figure S4-** Electrocardiogram of index case 8 carrying c.137G>A p.R46Q variation in *DSG2* gene.



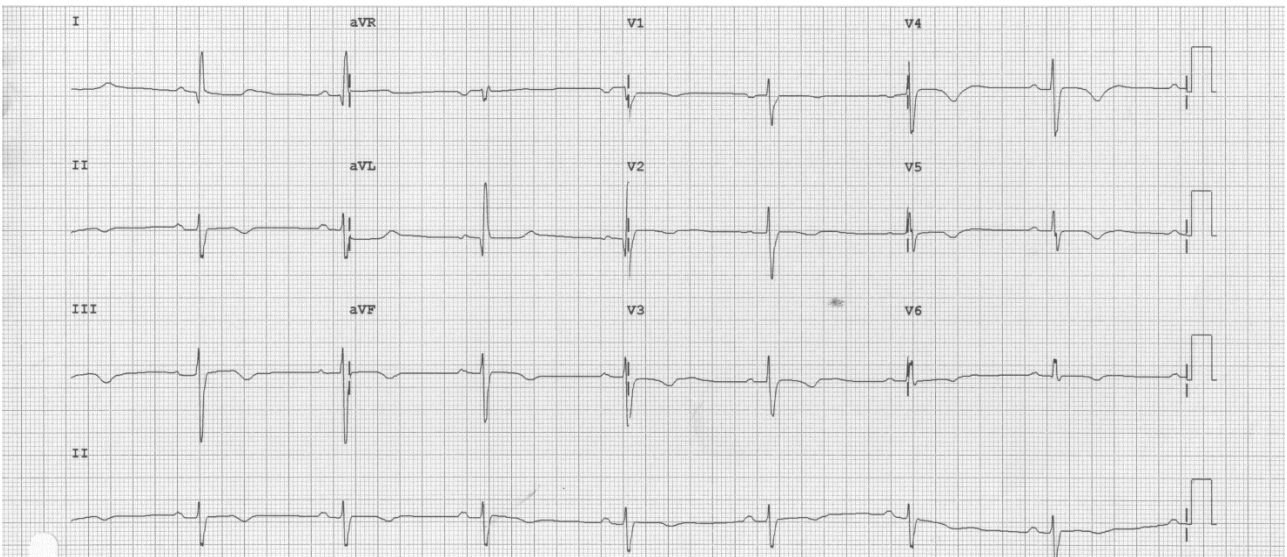
**Figure S5-** Electrocardiogram of index case 4 carrying c.1237C>T p.R413\* variation in *PKP2* gene.



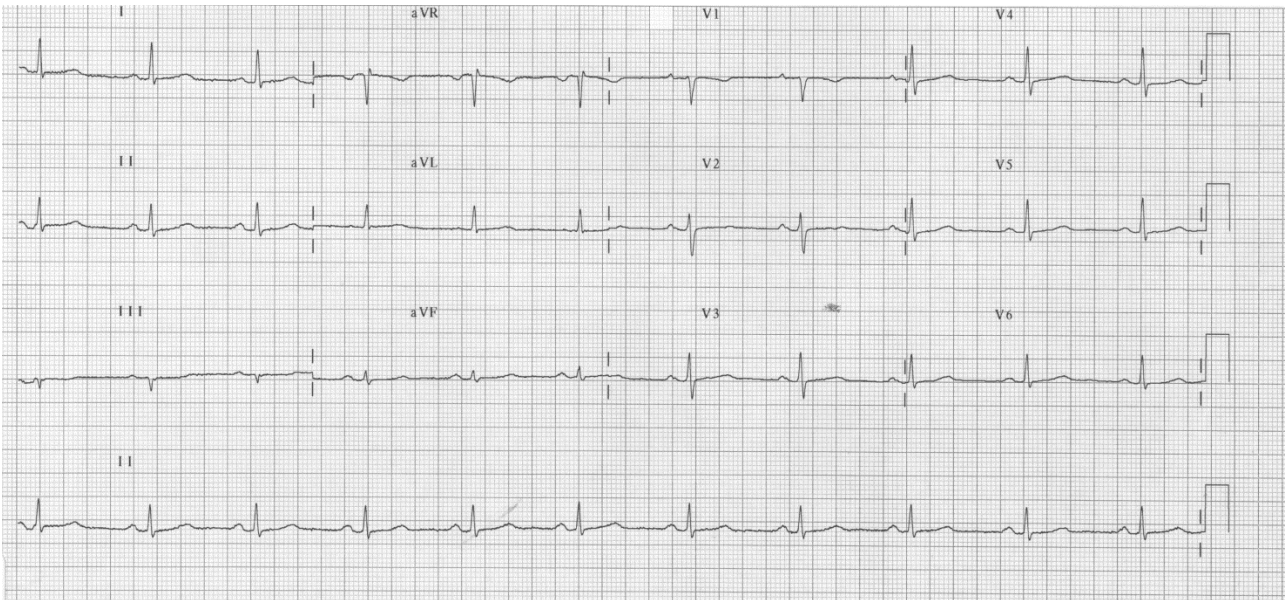
**Figure S6-** Electrocardiogram of index case 6 carrying c.1912C>T p.Q638\* variation in *PKP2* gene.



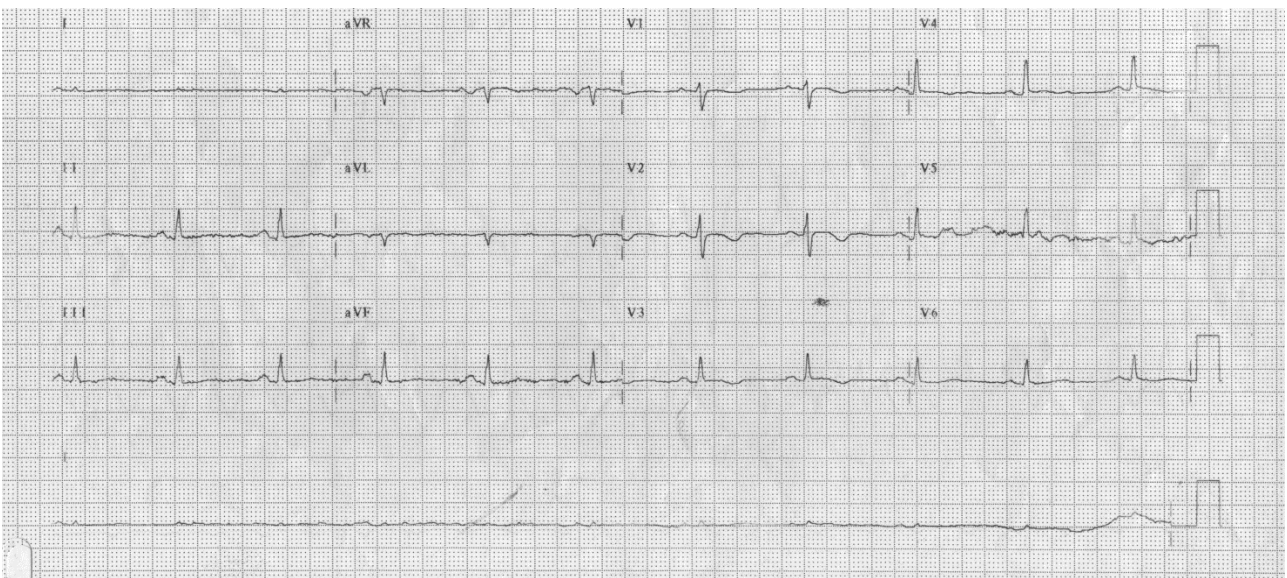
**Figure S7-** Electrocardiogram of index case 13 carrying c.275T>A p.L92\* variation in *PKP2* gene.



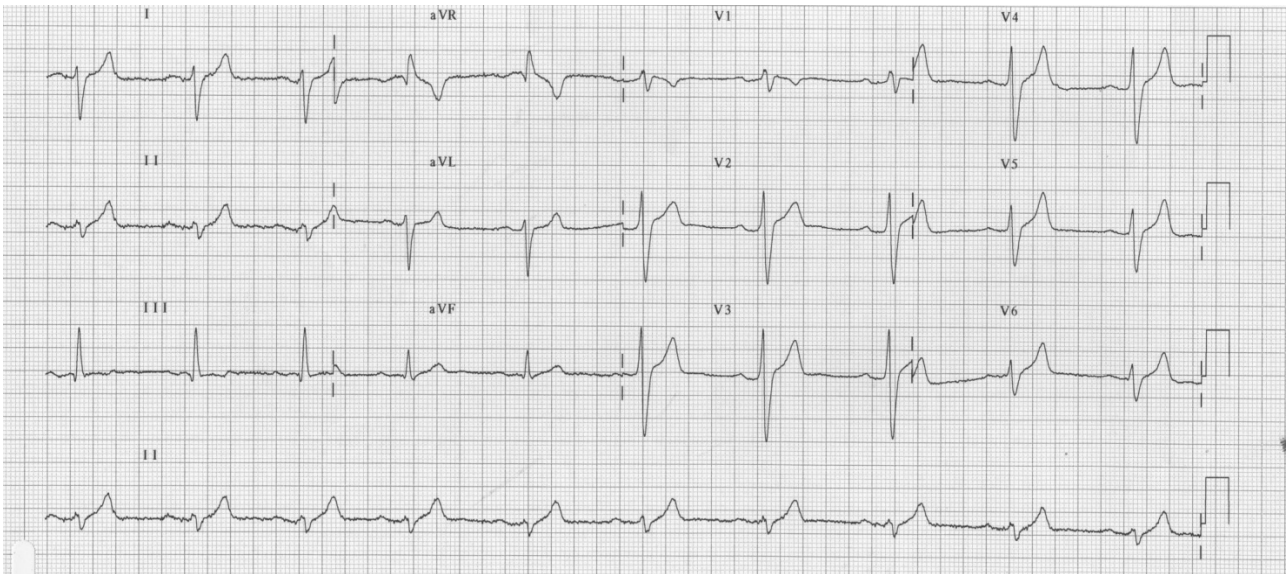
**Figure S8-** Electrocardiogram of index case 3 carrying c.2203C>G p.R735\*variation in *PKP2* gene.



**Figure S9-** Electrocardiogram of index case 1 carrying c.2956C>T p.Q986\* variation in *DSP* gene.



**Figure S10-** Electrocardiogram of index case 2 carrying c.2013delC p.P671Pfs12\* variation in *PKP2* gene.



**Figure S11.** Electrocardiogram of index case 29 carrying c.2194 T>G p.L732V in *DSC2* gene.

**Table S1.** Comparison table of index cases and statistics results.

		Task Force Criteria					
Factor	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Statistical test	Sig
<b>Mutation</b>	Not identified mutation	10	6,60	1,578	,499	T-test	>0.05
	Identified mutation	19	7,42	2,090	,479		
<b>Mutation type</b>	Missense	8	7,38	1,685	,596	T-test	>0.05
	Stop-gained	11	7,45	2,423	,731		
<b>Affected Gene</b>	PKP2	13	7,62	2,142	,594	One-Way ANOVA	>0.05
	DSP	2	6,50	3,536	2,500		
	DSG2	3	7,33	2,082	1,202		
	DSC2	1	7	-	-		
<b>Gender</b>	Male	18	7,39	2,004	,472		

	Female	11	6,73	1,849	,557	T-test	>0.05
<b>Age of diagnosis</b>							
<b>Factor</b>	<b>Group</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>Std. Deviation</b>	<b>Std. Error Mean</b>	<b>Statistical test</b>	<b>Sig</b>
<b>Mutation</b>	Not identified mutation	11	35.73	10.734	3.236	T-test	>0.05
	Not identified mutation	19	34.47	13.142	3.015		
<b>Mutation type</b>	Missense	8	27.25	10.820	3.825	T-test	<0.05
	Stop-gained	11	39.73	12.523	3.776		
<b>Affected Gene</b>	PKP2	13	37.62	11.850	3.287	One-Way ANOVA	>0.05
	DSP	2	30.50	27.577	19.5		
	DSG2	3	28.67	9.018	5.207		
	DSC2	1	19	-	-		
<b>Gender</b>	Male	19	33,21	12,372	2,838	T-test	>0.05
	Female	11	37,91	11,674	3,520		

Evaluated variables for statistical analysis were Task Force Criteria score (giving two points for major criteria and one point for minor criteria) and age at the diagnosis.

**Table S2. Comparison table of all genetic carriers and statistics results.**

<b>Diagnosis Age</b>							
<b>Factor</b>	<b>Group</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>Std. Deviation</b>	<b>Std. Error Mean</b>	<b>Statistical test</b>	<b>Sig</b>
<b>Mutation type</b>	Missense	8	27.25	10.820	3.825	T-test	<0.05
	Stop-gained	22	38.73	12.519	2.299		

<b>Gender</b>	Male	18	29,17	8,670	2,503	T-test	>0.05
	Female	12	36.58	13,165	3,103		



**Table S3. Clinical information of relatives carriers included in the study.**

<b>Fami ly</b>	<b>Pedi gree posit ion</b>	<b>Muta tions Genot ype</b>	<b>ARV C TFC +</b>	<b>A ge</b>	<b>Gen der</b>	<b>Sympto ms</b>	<b>I.RV size/ functio n</b>	<b>II.RV Histol ogy</b>	<b>III. Repolar ization</b>	<b>IV Dep olar izat ion</b>	<b>V. Arrhyt hmias</b>	<b>VI. SCD History</b>	<b>Diagn ostic Score</b>
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	Yes	15	F	No	Major	-	-	Min or	-	Major	5
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	Yes	53	F	Syncope	Minor	-	Major	-	Major	Major	5
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	No	46	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	No	42	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	No	16	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	No	82	M	No	NE	NE	NE	NE	NE	Major	2
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	No	10	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	DSP p.Q98 6*	No	11	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
B	II.3	PKP2 p.P67 1Pfs1 2*	Yes	58	M	Syncope	Major	-	Minor	-	Minor	Major	6
B	III.3	PKP2 p.P67 1Pfs1 2*	No	27	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
A	IV.7	PKP2 p.R73 5*	No	20	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
A	III.3	PKP2 p.R73 5*	Yes	58	F	No	Major/ Minor	-	Major	-	-	Major	7
A	IV.5	PKP2 p.R73 5*	Yes	25	F	No	Major/ Minor	-	Major	-	-	Major	7
A	III.2	PKP2 p.R73 5*	Yes	55	F	No	Minor	-	Minor	-	-	Major	4

A	IV.6	PKP2 p.R73 5*	No	36	F	-	-	-	-	-	-	Major	2
A	IV.4	PKP2 p.R73 5*	No	27	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
D	II.4	PKP2 p.R41 3*	Yes	35	M	No	Major / Minor	-	Minor	-	-	Major	6
D	III.2	PKP2 p.R41 3*	Yes	15	M	Palpitati ons	Major	-	Minor	-	-	Major	5
D	II.6	PKP2 p.R41 3*	Yes	29	M	Arrhyth mic storm	Major	-	Minor	-	Major	Major	7
D	II.3	PKP2 p.R41 3*	Yes	16	M	Sudden death	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-
C	I.2	PKP2 p.Q63 8*	No	80	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
C	II.2	PKP2 p.Q63 8*	No	41	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
C	III.1	PKP2 p.Q63 8*	No	9	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
C	II.6	PKP2 p.Q63 8*	Yes	35	F	No	Minor	-	Major/ Minor	-	-	Major	6
E	II.5	DSG2 p.C81 4R	No	-	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
E	II.6	DSG2 p.C81 4R	No	-	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
E	III.1	DSG2 p.C81 4R	No	-	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	DSG2 p.R46 Q	No	64	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	PKP2 p.L92 *	No	40	F	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	PKP2 p.R38 8W	No	64	M	No	-	-	-	-	-	Major	2
N/S	N/S	DSC2 p.L73 2V	No	60	M	No	-	-	-	-	-	Major	2

N/S- not shown. N/E-Not evaluated. N/A- Not available

## Article 3

**PKP2 truncada provoca una localització subcel·lular  
deficient de DSP**

## **Truncated plakophilin-2 mutations affect desmoplakin subcellular localization in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy**

Revista: *Unpublished data*

Autors: A: Alcalde M, Campuzano O, Beltran-Alvarez P, Pagans S, Vergés M, Brugada R

### **Resum**

Tal com es descriu en l'article anterior, la MAVD està causada majoritàriament per mutacions en gens que codifiquen per gens desmosomals, especialment mutacions que provoquen una aturada en PKP2 (PKP2<sup>TR</sup>). Tanmateix, els mecanismes involucrats en l'expressió del fenotip de MAVD com a conseqüència d'aquesta variants genètiques és encara parcialment desconegut. En aquest article es descriu com les PKP2<sup>TR</sup> presenten un defecte la seva localització subcel·lular, associada també a un defecte en la localització subcel·lular de DSP. En concret, en aquest article s'estudia la localització subcel·lular de tres PKP2<sup>TR</sup>, descrites en l'article anterior, en cèl·lules HL-1, així com l'efecte que tenen sobre la localització de DSP. Els nostres resultats suggereixen que les formes curtes de PKP2<sup>TR</sup> presenten una deficiència en la localització cel·lular i retenció en el reticle endoplasmàtic, indicant que el domini armadillo podria ser necessari pel transport

de PKP2 a la membrana plasmàtica. A més, PKP2<sup>TR</sup> provoca una deficiència en la localització de DSP. Les nostres dades suggereixen que el mecanisme subjacent a les variants PKP2<sup>TR</sup> implica una deficiència en la localització de DSP, indicant que la desorganització del desmosoma podria ser un mecanisme pel qual actuen aquestes variants.



Embargoed until publication

Alcalde M, Campunzano O, Beltran-Alvarez P, Pagans S, Brugada R. "Truncated plakophilin-2 mutations affect desmoplakin subcellular localization in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy". Unpublished data. Submitted

### **Abstract**

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a rare cardiac disease characterized by fibrofatty replacement in the myocardium. ARVC is caused by mutations in genes encoding desmosomal proteins, especially by nonsense mutations in plakophilin-2 (PKP2). However, the molecular mechanisms underlying ARVC phenotype by PKP2 mutations are poorly understood. Here, we studied, by immunofluorescence studies in HL-1 cells, whether three truncated PKP2 proteins (PKP2TR), associated with ARVC, affect DSP subcellular localization. Our results show that short truncations of PKP2 present deficient subcellular location and retention in the endoplasmic reticulum (ER), indicating that the armadillo domain is required for PKP2 trafficking to plasma membrane. Strikingly, PKP2TR cause deficient DSP subcellular location, whilst full length PKP2 was required for proper DSP localization at plasma membrane. Our data suggests a mechanism whereby nonsense genetic mutations in PKP2 affect DSP subcellular localization and thus lead to ARVC.

### **Keywords**

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; Genetics; Truncated plakophilin-2; Desmoplakin; Desmosome; Sudden cardiac death





# DISCUSSIÓ

En els darrers anys s'ha avançat en el coneixement de la MAVD, tant en la pràctica clínica com en les seves bases genètiques i moleculars. Tanmateix, encara existeixen preguntes per esclarir. D'una banda, en el diagnòstic, ja que els TF actualment utilitzats no permeten l'estratificació del risc ni el diagnòstic dels casos més incipients de la patologia. I d'altra banda en les bases biològiques de la MAVD.

Els resultats obtinguts en els tres articles que emmarquen la present tesi

es poden dividir en cinc blocs de discussió:

### **1. Caracterització de la població**

En els dos primers articles s'ha realitzat una anàlisi genètica de casos de MAVD en una població post-mortem (article 1), i en un grup de pacients vius diagnosticats (article 2). En aquest primer bloc es discutiran els resultats obtinguts en el primer i segon article en termes de característiques de la població, corresponent al primer objectiu de la tesi .

### **2. Utilitat de les eines genètiques, predisposició genètica i l'estratificació del risc**

D'altra banda, els dos primers articles també contribueixen a valorar la predisposició genètica a la MAVD. En aquest bloc es discutiran els resultats obtinguts en termes de freqüència dels gens responsables i tipus de variant associades, així com utilitats de les eines de seqüenciació utilitzades i correlació amb el fenotip, corresponent al segon objectiu de la tesi.

---

### **3. Mecanismes moleculars implicats els casos de PKP2<sup>TR</sup>**

En el tercer article es descriu que les variacions PKP2<sup>TR</sup> presenten un defecte en la seva localització subcel·lular així com el seu efecte sobre altres proteïnes del desmosoma. En aquest apartat es discutiran els resultats corresponents al tercer objectiu de la tesi.

### **4. Alteracions en els discos intercalars en el teixit miocardiàc**

El segon article també contribueix en l'estudi de les alteracions en el conjunt dels discos intercalars, desmosomes i unions GAP. En aquest bloc es discutiran els resultats en termes d'alteracions presents en el miocardi i la seva possible utilitat en el diagnòstic de la MAVD, corresponents al quart objectiu de la tesi.

### **5. Perspectives de futur**

El cinquè i últim bloc de la discussió es centrarà en avaluar les diferents perspectives i reptes: en el diagnòstic, en termes de l'anàlisi genètica i estudis immunohistolquímics; i en l'estudi de les bases moleculars de la patologia. Finalment, també inclou una proposta en l'estudi de noves estratègies terapèutiques en el cas de les variacions d'aturada (PTC) que s'està realitzant actualment a la Universitat de San Diego Califòrnia (UCSD), tot i que els resultats no estan inclosos en aquesta tesi.

---

## I. Caracterització de la població de MAVD

### 1. La població de MAVD

La MAVD es caracteritza per manifestar-se clínicament al voltant dels 35 anys, en algunes ocasions provocant fins i tot la MSC com a primer símptoma. La seva aparició després d'aquesta edat és menys freqüent. Tanmateix, establir els factors que determinen la manifestació de la MAVD, l'edat d'aparició dels símptomes o una major severitat és encara un dels focus d'estudi en la patologia.

La població d'estudi de MAVD en aquesta tesi es compon per una primera població 40 casos post-mortem i 6 casos de pacients diagnosticats, mitjançant els criteris TF (presentada en l'article 1); i una segona població formada exclusivament per 30 casos de pacients diagnosticats mitjançant els criteris TF (presentada en l'article 2).

En la primera població d'estudi (article 1) s'ha identificat la variant genètica patogènica responsable de la MAVD: d'una banda, a partir de mostres de teixit post-mortem inclòs en parafina (FFPE); i de l'altra, en pacients vius diagnosticats mitjançant els criteris TF. Dins del grup de MAVD diagnosticats post-mortem, s'ha observat que el 70% dels casos corresponen a individus amb una edat inferior a 35 anys, majoritàriament homes amb una edat mitjana de diagnòstic de 28 anys(124). Dins el grup de pacients vius de MAVD, el 83% eren homes, amb una edat mitjana de diagnòstic de 40 anys similar al observat en la segona població (article 2), amb una edat mitjana de diagnòstic de 36 anys, també majoritàriament homes (65%).

Així doncs, l'edat de diagnòstic és l'esperada en la MAVD entre 35-40 anys i similar a d'altres sèries de MAVD prèviament publicades(125).

La segona població de MAVD estudiada (corresponent a l'article 2) presenta una edat de diagnòstic mitjana de  $36 \pm 12$  anys i baixa incidència en edat infantil (només dos casos índex presenten una edat de 11 anys), de manera que es situa en els paràmetres comuns per la MAVD(99,125,126). D'altra banda, la MAVD presenta una major prevalença en homes que en dones en un proporció al voltant de 2:1. La nostra població és manté dins aquests paràmetres amb un 65% d'homes(45,127).

La MAVD és una malaltia progressiva que presenta una expressivitat variable, és a dir, existeixen des de casos on el primer símptoma és una arítmia, que permetrà diagnosticar de MAVD, fins a casos molt severos on el primer símptoma pot ser la MSC. En aquest context, la menor edat de diagnòstic en la població post-mortem podria ser explicada perquè aquesta estaria formada pels casos més severos, amb alteracions estructurals evidents, com és una clara substitució fibroadiposa i en els que el primer símptoma de la patologia és la pròpia mort sobtada

Els resultats d'aquesta tesi aporten una visió general del perfil genètic i clínic en les poblacions de MAVD. Tanmateix, existeixen limitacions en aquests estudis. En primer lloc, existeix una possible desviació en la selecció dels pacients. Els pacients inclosos en l'estudi han estat clínicament avaluats després de presentar símptomes, i l'edat de diagnòstic s'ha utilitzat com a edat de manifestació de la MAVD. En segon lloc, la mida mostral és una limitació clara, especialment a l'hora

---

de tractar estadísticament les dades, ja que no permet descartar error de tipus II. Tanmateix, s'ha de tenir en compte que la MAVD és una malaltia amb una baixa incidència en la població, de manera que sovint és complicat realitzar estudis amb una mida mostral més gran.

## **II. Utilitat de les eines genètiques, predisposició genètica i l'estratificació del risc**

### ***2. Utilitat de la seqüenciació per MassARRAY en DNA degradat.***

El diagnòstic dels casos post-mortem en la MAVD és en ocasions complicat, i l'anàlisi genètica pot ser molt valuosa per resoldre aquests casos. Tanmateix, l'aplicació de moltes tècniques de seqüenciació per determinar-ne la causa genètica és sovint difícil degut a l'estat del DNA, especialment en aquells casos en els no se n'extreu una mostra amb aquest objectiu en concret, i s'utilitza el teixit inclòs en parafina.

En el nostre treball, el DNA procedent del teixit miocardiàc inclòs en parafina, tant en controls com en afectats per MAVD, presentava una fragmentació massiva, probablement degut als processos de fixació als que han estat sotmeses les mostres(128). Així doncs, la baixa integritat i qualitat del DNA feia impossible la seva seqüenciació a través del mètode tradicional de Sanger o plataformes de *Next Generation Sequencing* (NGS), de manera que eren casos que quedaven sense resoldre. Estudis prèviament publicats en població post-mortem de MCH o de la síndrome de QT llarg (LQTS) també presentaven degradació en el DNA en els que també es va utilitzar MassARRAY Sequenom(129). Així doncs, el treball

presentat en aquesta tesi és el primer en el que s'utilitza aquesta tecnologia per resoldre genèticament casos post-mortem de MAVD.

El disseny de MassARRAY Sequenom conté 304 variants associades a la MAVD, totes les variants que en el moment de l'estudi s'havien descrit per la patologia (any 2011). Es va identificar la variant genètica causal en el 7,5% del total de mostres, percentatge molt inferior a l'esperat per la MAVD, on un 60% presenta origen genètic(130,131). Aquest fet pot ser degut a que en la MAVD existeix un elevat percentatge de les variants noves, és a dir, que no estan descrites en població general ni en altres pacients afectats per MAVD sinó que es descriuen per primera vegada. En el segon treball presentat en aquesta tesi, podem observar com el 35% de les variants identificades corresponen a variants noves. Aquest fet subratlla la importància de seqüenciar els gens associats a MAVD per complet, i no només estudiar les variants ja descrites. La principal limitació de MassARRAY Sequenom és que s'han d'incloure les variants que es volen estudiar en el disseny, i per tant no s'identificaran variants noves. Tanmateix, cal dir que en el cas dels casos post-mortem és una eina de gran utilitat, ja que la degradació del DNA no permet la seqüenciació convencional per Sanger i presentava moltes dificultats per NGS (en el moment de l'estudi), de manera romandrien sense resoldre.

En aquest mateix treball, les mostres procedents de sang amb una bona qualitat i integritat, van romandre sense resoldre després de l'anàlisi de MassARRAY Sequenom. Posteriorment, s'han analitzat per seqüenciació Sanger i s'ha identificat la variant genètica causal en un 33,3% dels casos, percentatge més similar a

l'esperat. Així doncs, el disseny per la MAVD de MassARRAY Sequenom pot subestimar els casos de MAVD amb origen genètic. Si el DNA es troba en bones condicions, la seqüenciació per NGS o la seqüenciació directa per Sanger són les millors opcions per tal de realitzar un anàlisi exhaustiu de tots els gens associats a la MAVD. Estudis recents descriuen que aproximadament entre un 5-25% dels casos corresponents al mort sobtada inexplicada amb autòpsia negativa (SUDNA) podrien ser deguts a variants associades a MAVD(124,132). Així doncs, considerem que el disseny realitzat per a l'aplicació MassARRAY Sequenom a l'estudi de MAVD, seria també una bona eina pels casos de SUDNA amb una baixa integritat de les mostres de DNA. D'aquesta manera, aquesta tècnica seria útil en el camp clínic i forense per tal d'identificar variants patogèniques en mostres on el DNA estigui degradat. Actualment també, les la seqüenciació per NGS presenta bons resultats per NGS, de manera que ja no és un factor tant limitant com en el moment de l'estudi(133).

### **3. Predisposició genètica i estratificació del risc**

#### 3.1 Prevalença dels gens desmosomals

En estudis prèviament publicats en poblacions de MAVD s'observa com fins a un 40% de casos són portadors d'una variant genètica patogènica a *PKP2*(130) establint aquest gen com el més prevalent associat a MAVD. En l'estudi en població post-mortem (presentat en l'article 2) el 80% dels casos amb variant genètica patogènica identificada la presenten a *PKP2* (3 post-mortem FFPE i 2



---

mostres de pacients analitzats per Sanger). S'ha identificat un cas d'una doble variant genètica patogènica digènica, a *PKP2* i *DSG2*, de manera similar al ja descrit en MAVD(134). Les variants identificades per Sanger en mostres de DNA provinent de pacients de MAVD eren variants noves o bé no incloses en el disseny de MassARRAY degut a dificultats tècniques (p.L92\* *PKP2*). La variant nova p.R279C *DSG2* s'ha considerat potencialment associada a MAVD ja que no es troba en població general i és considerada patogènica segons dues plataformes de predicció *in silico* (Condel i Provean).

D'altra banda, en la població de pacients vius afectats per la patologia (presentat en l'article 1) s'ha identificat un variant genètica potencialment associada a MAVD en el 63% dels casos; amb un 40% dels casos amb un variant genètica a *PKP2*. D'aquesta manera, els resultats recolzen estudis previs en població occidental on s'hi identifica *PKP2* com a gen majoritari en la MAVD(76,135,136). En el nostre estudi no s'ha identificat en cap cas la presència de més d'una variant genètica patogènica, malgrat haver-se analitzat tots els gens desmosomals. Tanmateix, la presència de més d'una variant genètica patogènica en individus afectats per MAVD és comú, aproximadament un 30% del total dels casos(125,134).

És important destacar que s'han identificat 6 variants noves, és a dir, aproximadament un 30% del total, subratllant la importància de seqüenciar per complet els gens associats a la MAVD. D'aquesta manera, l'anàlisi només de les variants prèviament associades podria provocar la subestimació del total de les variants responsables de la patologia. Aquest és segurament el cas de la població

---

post-mortem, on només un 7,5% del casos presenten una variant genètica patogènica.

### 3.2 Tipus de variant genètiques i estratificació del risc

Les variants que incorporen un codó d'aturada a PKP2 (*nonsense* o *frameshift*) i que per tant, provocaran PKP2 truncada (PKP2<sup>TR</sup>) són les més comunes en la MAVD. En aquest estudi, les variants PKP2<sup>TR</sup> representen un 52,5% del total de les variants identificades potencialment associades a MAVD.

La síntesi de PKP2 és crucial per les interaccions proteiques en els cardiomiòcits, considerat un punt clau en el desenvolupament de la patologia(9). Igualment, la localització nuclear de la PG és essencial perquè es desencadeni la supressió de la via de senyalització canònica de Wnt/beta-catenina, promovent que els progenitors cardíacs cel·lulars es diferenciïn en adipòcits(113,137). La patogenicitat de les variants *missense* i d'aturada en malalties cardíques és motiu de debat en aquests moments, especialment en les cardiomiopaties(138). Les variants d'aturada són considerades probablement patogèniques ja que alteren la longitud de la proteïna, i per tant possiblement la seva funció. S'ha postulat que les PKP2<sup>TR</sup> provocarien haploinsuficiència degut a la inestabilitat del mRNA i/o de la pròpia proteïna inestabilitat(9). D'aquesta manera, l'haploinsuficiència seria la causa més probable de la dominància en MAVD associada a PKP2(139). A més, de manera consistent amb aquesta teoria, alguns estudis mostres una disminució en els nivells d'expressió de PKP2 en immunoblots i estudis immunohistoquímics (53,76). Un estudi recent en població japonesa mostra que la presència PKP2<sup>TR</sup>

podria conferir un fenotip més sever amb una manifestació dels símptomes a una menor edat(140). Tanmateix, el treball realitzat en aquesta tesi (presentat en l'article 2) descriu una associació entre les variants PKP2<sup>TR</sup> i una major edat de diagnòstic, ja que s'observa una edat de diagnòstic al voltant dels 36-37 en els portadors de PKP2<sup>TR</sup> mentre que els portadors de variants *missense* és de 27 anys. Aquesta troballa planteja una hipòtesis alternativa en la patogenicitat de les variants *missense* i variants que provoquen una proteïna truncada: les primeres podrien ser més severes degut al seu possible efecte de dominància negativa, mentre que les PKP2<sup>TR</sup> podrien estar associades a una haploinsuficiència(139), definint així diferències en el fenotip de MAVD.

### III. Mecanismes moleculars implicats en la MAVD:

#### 4. Efecte cel·lular de les PKP2<sup>TR</sup>

Les variants PKP2<sup>TR</sup> són les variants responsables d'un major nombre de casos en la MAVD, a més d'estar associats a un edat major de diagnòstic, segons els resultats obtinguts en aquesta tesi.

En cèl·lules eucariotes, l'expressió gènica consta d'una sèrie de passos, incloent la transcripció, la formació del CAP 5', el procés d'*splicing*, la poliadenilació, l'exportació del mRNA, la traducció i la degradació del mRNA. Aquests processos es troben integrats l'un amb l'altra per tal d'augmentar-ne l'eficiència i la fidelitat(141,142). Per tal de millorar-ne la fidelitat, diferents mecanismes de control han evolucionat (143). Un d'aquests mecanismes és el *non-sense mediated mRNA*

*decay* (NMD), una ruta de vigilància que identifica els mRNAs portadors de codons *nonsense*, és a dir, identificaran els codons d'aturada prematura per la seva posterior degradació(144). Aquesta ruta és important per tal d'evitar que es sintetitzin les proteïnes truncades, ja que podrien ser potencialment deletèries o actuar com a dominants negatius. Tanmateix, aquest mecanisme no té una eficiència del 100%. Per aquest motiu, ens hem plantejar si les diferents PKP2<sup>TR</sup> són proteïnes funcionals, és a dir, si es localitzen correctament a la membrana plasmàtica, i per tant podrien actuar com a dominants negatius; o bé si pel contrari no són funcionals i per tant recolzarien la hipòtesi de l'haploinsuficiència com a gènesi de la MAVD, també quan escapen al mecanisme de control NMD i són sintetitzades.

Aquest segon cas està recolzat en estudis que mostren que les PKP2<sup>TR</sup> presenten un defecte en el seu tràfic cap a la membrana plasmàtica(9,145). Per aquest motiu, ens hem plantejat determinar quina part de la proteïna és responsable de l'adreçament a la membrana plasmàtica, i per tant quines PKP2<sup>TR</sup> presentarien un defecte en el transport.

De l'estudi genètic en pacients de MAVD, presentat en aquesta tesi (article 1), s'han seleccionat 3 variants PKP2<sup>TR</sup> de 91, 412, i 734 aminoàcids respectivament. PKP2<sup>TR-91</sup> presenta només la regió N-terminal mentre que la PKP2<sup>TR-412</sup> conserva completament el head domain, i finalment, la PKP2<sup>TR-734</sup> presenta pràcticament el domini armadillo complert ( 5 repeticions armadillo). En primer lloc, s'ha mostrat que PKP2<sup>WT</sup> es situa correctament a la membrana cel·lular, co-localitzant amb

l'expressió de PKP2 endògena. Per contra, les PKP2<sup>TR</sup> es troben majoritàriament al citoplasma, especialment les formes més curtes (PKP2<sup>TR-91</sup> i PKP2<sup>TR-412</sup>), mentre que PKP2<sup>TR-734</sup> presenta una fracció a la membrana plasmàtica. D'aquesta manera, PKP2<sup>TR-91</sup> es troba en el citosol amb un patró difús de manera similar al que ja s'havia demostrat amb la proteïna PKP2<sup>TR</sup> de 79 aa(9), mentre que PKP2<sup>TR-412</sup>, també al citosol, presenta un patró puntejat. En ambdós casos amb una co-localització alta amb el marcador de reticle endoplasmàtic (calnexina). En canvi, PKP2<sup>TR-734</sup> presenta una localització parcial a la membrana però amb la presència d'una fracció citosòlica. Aquesta fracció citosòlica podria ser explicada per una major susceptibilitat a la degradació de PKP2<sup>TR-734</sup> respecte a de PKP2<sup>WT</sup>, de manera similar al demostrat en algunes variants *missense* de PKP2(146). Estudis previs havien suggerit que el *head domain* era responsable del transport de PKP2 a la membrana plasmàtica(8). A més d'aquest fet, els nostres resultats mostren que el *head domain* no és suficient per PKP2 per sortir del reticle endoplasmàtic, i el domini armadillo és necessari perquè PKP2 es localitzi a la membrana plasmàtica.

Les variants *missense* a PKP2 en canvi, plantegen el dubte de si el canvi d'aminoàcid seria neutral o bé causal en la MAVD, actuant probablement a través d'un efecte dominant negatiu, és a dir, proteïnes mutants estables que exerceixen un efecte advers sobre els processos cel·lulars, a més d'una pèrdua potencial de la funció. Els mecanismes genètics subjacents, les potencials conseqüències i els mecanismes de control en el procés de la patologia, encara no estan definits. Els mecanismes de control proteic són essencials en la regulació del *turnover* de les

---

proteïnes (cicle de síntesi-degradació), així com la degradació de les proteïnes defectuoses(147). La degradació de les proteïnes aberrants es produeix a través del sistema de ubiquitina-proteasoma o bé a través del sistema d'autofàgia controlat per lisosomes. A més a més, existeixen altres mecanismes proteolítics com són les calpaïnes (tiolproteases, no lisosomals, amb activitat depenent de calci) (148).

En diversos estudis en teixit cardíac humà s'observa que la quantitat de proteïna PKP2 varia entre les mostres de MAVD, però especialment en portadors de variants PKP2<sup>TR</sup> que presenten uns nivells proteics inferiors en immunoblots i anàlisi immunohistoquímics(53,76). Estudis recents en una variant genètica *missense* (c.2386T>C, p.C796R) demostren que, en aquest cas, la variant genètica *missense* a PKP2 provoca inestabilitat proteica i la seva posterior degradació (en sistemes *in vitro*), suggerint que l'haploinsuficiència és la causa més probable en la gènesi de la MAVD, també en variants *missense*.

### **5. Alteració de la localització subcel·lular de la desmoplaquina**

La localització subcel·lular deficient de les PKP2<sup>TR</sup> ha estat observat en diferents estudis, incloent el nostre. Tanmateix, l'efecte que les PKP2<sup>TR</sup> poden provocar en la localització subcel·lular d'altres proteïnes desmosòmiques és encara desconegut. Estudis previs demostren que la presència de PKP2 és crítica pel correcte transport i localització de DSP(149). Per aquest motiu, ens hem plantejat la

---

possible implicació de DSP en el mecanisme molecular derivat de la presència de PKP2<sup>TR</sup>.

El nostre treball (article 3) mostra una localització subcel·lular de DSP, concretament retenció vesicular, quan aquesta sobreexpressa en cèl·lules HL-1 i HEK 293T. Tanmateix, la co-expressió de DSP juntament amb PKP2<sup>WT</sup> provoca la localització a membrana plasmàtica de ambdues proteïnes, reforçant la idea que la PKP2 té un paper clau en el transport de la DSP(149). Després d'aquests resultats, es va avaluar l'efecte de les PKP2<sup>TR</sup> en la localització de DSP. Els nostres resultats suggerèixen que la DSP presenta retenció vesicular al citoplasma quan és co-expressada amb PKP2<sup>TR-91</sup>, és a dir, presenta el mateix fenotip cel·lular que quan PKP2 no està sobreexpressada. Probablement aquest fet és degut a una falta de interacció entre PKP2-DSP, ja descrita en el *head domain* de PKP2(8). D'altra banda, PKP2<sup>TR-412</sup> provoca una localització cel·lular diferent de DSP que s'observa en el citoplasma amb una altra co-localització amb PKP2<sup>TR-412</sup>, suggerint que el *head domain* complet és suficient per la interacció PKP2-DSP mentre que la falta del domini armadillo impediria la correcta localització de les dues proteïnes a la membrana plasmàtica. Finalment, en el cas de PKP2<sup>TR-734</sup> s'observa com DSP es troba correctament localitzada a la membrana plasmàtica, de igual manera que s'hi troba parcialment PKP2<sup>TR-734</sup>. Així doncs, la translocació de PKP2-DSP seria possible, almenys parcialment en el cas de PKP2<sup>TR-734</sup>. Aquests resultats indiquen que la localització de DSP estaria supeditada a la localització de PKP2, reforçant el model en el que el *head domain* de PKP2 és crític per la interacció de PKP2-DSP, i

---

el domini armadillo és clau per la localització no només de PKP2 sinó també de DSP.

Paradoxalment, aquest model suggereix que les variants que provoquen una pèrdua del domini armadillo, però conserven completament el *head domain* (ex. PKP2<sup>TR-412</sup>) estarien associades a un efecte més sever sobre la localització subcel·lular de DSP que les PKP2<sup>TR</sup> més curtes (ex. PKP2<sup>TR-91</sup>). És interessant ressaltar que aquest fet podria tenir efectes en la manifestació clínica de la MAVD, ja que aquest model està reforçat per l'estudi en familiars dels portadors de PKP2<sup>TR-91</sup>, <sup>TR-412</sup> i <sup>TR-734</sup> (presentat en l'article 2, figura 4). Efectivament, aquestes tres variants presenten una penetrància diferent en les famílies en les que s'han identificat; observem una penetrància del 50% en PKP2<sup>TR-91</sup> (1 of 2 portadors presenten fenotip de MAVD), un penetrància del 100% en PKP2<sup>TR-412</sup> (5/5) i una penetrància del 62,5% en el cas de PKP2<sup>TR-734</sup> (5/8). En aquest context, suggerim que la translocació de DSP pot tenir un paper important en la patogènesi de la MAVD. Així doncs, creiem que PKP2<sup>TR-91</sup> actua a través d'un mecanisme d'haploinsuficiència, prèviament descrit en PKP2<sup>TR</sup> en MAVD(139), però no associat a DSP, que seria translocada per l'al·lel *wild-type* de PKP2. Contràriament, PKP2<sup>TR-412</sup>, la variant genètica més severa de les estudiades, afecta directament a la localització subcel·lular de DSP, i proposem que PKP2<sup>TR-412</sup> podria actuar a través d'un mecanisme de dominància negativa competint amb PKP2<sup>WT</sup> per la interacció amb DSP. Finalment, PKP2<sup>TR-734</sup> actuaria també a través d'un mecanisme de dominància negativa, competint amb la PKP2<sup>WT</sup>, però seria capaç



de translocar parcialment la proteïna DSP. PKP2<sup>TR-734</sup> presenta una gran co-localització amb DSP a la membrana plasmàtica, de manera que el fenotip cel·lular seria menys sever que en el cas de PKP2<sup>TR-412</sup>, consistent amb la penetrància incompleta observada en la família portadora de PKP2<sup>TR-734</sup>.

Així doncs, proposem que les PKP2<sup>TR</sup> poden actuar a través d'un mecanisme d'haploinsuficiència en els casos de les PKP2<sup>TR</sup> més curtes (amb el *head domain* afectat), mentre que les PKP2<sup>TR</sup> més llargues afecten directament la localització de DSP, actuant com a dominants negatius. A més a més, aquests resultats suggereixen que la translocació o no de DSP podria tenir una implicació en la manifestació clínica de la MAVD. Tenint en compte aquests resultats i, per tal d'aprofundir en la idea seria interessant estudiar els efectes de les PKP2<sup>TR</sup> en condicions de no sobreexpressió, és a dir, es podrien introduir les variants a partir de CRISPR/Cas 9 en línies cel·lulars cardíques (HL-1) o en cardiomiòcits derivats d'iPSCs per tal d'estudiar si s'expressen els mRNA de PKP2<sup>TR</sup> sintetitzant una proteïna truncada funcional, que podria actuar sobre la translocació de DSP (seguint el model presentat en l'article 3) o bé si es degrada per complet i s'associen a és un mecanisme d'haploinsuficiència.

## **IV. Alteracions en els discos intercalars en el teixit miocardiàc**

L'alteració de la localització subcel·lular de DSP, com a conseqüència de la presència de PKP2<sup>TR</sup>, suggereix que el transport de DSP requereix PKP2, i que aquest transport es veu afectat en el cas de PKP2<sup>TR</sup>. Aquest fet suggereix PKP2<sup>TR</sup>

podria estar afectant també el transport de altres proteïnes del desmosoma, especialment de DSC2 i PG, que necessiten de PKP2 per ser transportades en vesícules dirigides per la quinesina-2(13) durant la fase de d'acoblament del complex transmembrana en la formació dels desmosomes. Així doncs, podria existir un defecte en el transport, no només de DSP, sinó també de DSC2 i PG, desencadenat per PKP2<sup>TR</sup>, important en la gènesi de la MAVD. Per tal de determinar la implicació d'aquest mecanisme s'haurien de realitzar estudis *in vitro* i estudiar-ne la localització subcel·lular de DSC2 i PG.

D'aquesta manera, un transport incorrecte de les proteïnes desmosomals, afavoriria la desestructuració dels desmosomes i per tant de les unions cel·lulars; característiques pròpies de la MAVD, en alguns models animals s'observa una major distància entre els cardiomiòcits(119,136) i fins i tot la dissolució dels discos intercalars(150). Seria especialment important estudiar l'efecte de PKP2<sup>TR</sup> sobre la localització cel·lular de la PG, ja que la seva translocació al nucli és clau per desencadenar el procés d'adipogènesi en els progenitors cardíacs cel·lular que donaran lloc als adipòcits en la MAVD(114).

### **6. Disminució de la senyal de PG als discos intercalars**

La disminució en la senyal de PG en els discos intercalars, detectable per tècniques immunohistoquímiques, ha estat considerada un marca específica de la MAVD des de 2009. Per aquest motiu, ha estat proposada com a eina diagnòstica en biòpsies(53). En la nostra població (article 1), el 80% del les mostres

analitzades presentaven una disminució de la senyal de PG en comparació a les mostres control, posant de manifest que es tracta d'un indicador específic de la MAVD. D'entre els teixits portadors de variant genètica patològica, només un mutant (p.T526M\_*PKP2* i p.R811S\_*PKP2*) presentava una disminució en la senyal de PG, mentre que p.S824L\_*DSC2* presentava uns nivells similars al control.

L'aplicació del marcatge immunohistoquímic de la PG com a test diagnòstic en la MAVD sembla associada a una alta sensibilitat i especificitat per la MAVD, tot i que existeixen casos on s'observa una disminució de la senyal de PG sense fenotip de MAVD(151). D'aquesta manera, en un futur es podria plantejar com a eina d'ajuda en el diagnòstic de la MAVD, identificant canvis en la distribució de les proteïnes desmosòmiques en mostres de biòpsies de la regió septal de ventricle dret que encara no mostrarien degeneració dels miòcits ni substitució fibroadiposa. És important recordar que la causa de la MAVD és desconeguda en més d'un 50% dels casos on els pacients no presenten variants als gens desmosomals. En quina fase de la progressió de la MAVD s'observa la disminució de la senyal de la PG en els discos intercalars és encara desconegut. D'altra banda, no hi han estudis sistemàtics en individus asimptomàtics o familiars perquè no existeix indicació mèdica per una biòpsia.

Tanmateix, la PG té un paper clau en la MAVD, la seva absència en els discos intercalars suggereix una deficiència en el seu transport, i no descarta una translocació nuclear que desencadenés l'adipogènesi, com la descrita en models animals. Tot i això, la localització nuclear en de la PG en mostres de miocardi de

---

teixit humà afectat per MAVD encara no s'ha demostrat, probablement degut a que les mostres corresponen a les etapes finals de la patologia quan la substitució fibroadiposa ja s'ha produït.

## **7. Unions GAP en la MAVD**

La proteïna Cx43 és la proteïna majoritària en les unions GAP involucrades en la transmissió de la senyal elèctrica a través dels miòcits. Els resultats derivats de l'estudi en teixit post-mortem del miocardi afectat per MAVD (article 2) mostren que el marcatge de Cx43 als discos intercalars és comparable al control, en consonància amb alguns estudis previs(152). Tanmateix, aquest és encara un punt controvertit en l'estudi de la MAVD, ja que altres autors mostren una disminució en la senyal de Cx43 en teixits portadors de variants en *PKP2*, *DSG2* i *PG*; i fins i tot en casos sense variant genètica patogènica identificada(53). Cal destacar però, que aquests estudis estan realitzats mitjançant l'immunomarcatge directament sobre el teixit de manera que podria existir una disminució dels nivells d'expressió de Cx43 no detectable per immunomarcatge. S'ha postulat que la reducció de la PG als discos intercalars podria comportar la seva substitució per  $\gamma$ -catenina (113). Com a conseqüència, es reduirien el seus nivell nuclears i, per tant, disminuirien també els nivells de transcripció de Cx43, descrita com a diana de la via de senyalització de Wnt regulada  $\gamma$ -catenina(153). En aquest sentit, s'ha descrit una disminució de l'expressió i una localització deficient de Cx43 en teixit miocardiàc de individus portadors de variants a *PKP2*, variants *missense* i *PKP2<sup>TR</sup>*(120). Aquests

resultats suggereixen que les variants a PKP2 podrien estar associades a una disminució de l'expressió de Cx43, com a conseqüència de la supressió de la via de senyalització de Wnt. Tanmateix, no existeix consens en la bibliografia respecte els altres casos de MAVD. Cal recordar que en el nostre estudi només es van identificar dos casos de variants *missense* a PKP2 (p. T526M i p.R811S) en els quals no es van observar anomalies en la localització de Cx43. Els nivells d'expressió de Cx43 no es van poder estudiar mitjançant tècniques de Western Blot o Real-time PCR, degut al nivell de degradació de proteïnes i RNA de les mostres. Per aquest motiu, considerem que la MAVD no està associada de manera general a una deficiència en la localització de la Cx43 als discos intercalars, però sí poden existir alteracions en els nivells d'expressió, especialment en els casos de variants a PKP2.

## V. Perspectives de futur en l'estudi de la MAVD

### 8. Diagnòstic genètic en la MAVD

En els darrers anys s'ha avançat molt en el camp de la diagnosi genètica. El fet de que cada vegada sigui més accessible econòmicament, tant a través de la seqüenciació tradicional com de les tecnologies de seqüenciació massiva o NGS, ha facilitat que cada vegada es trobi més integrada dins de la pràctica clínica.

D'altra banda però, aquest fet ha permès que s'obtingui més informació genètica, sovint d'interpretació complexa. Per aquest motiu és necessari disposar d'eines de predicció de la patogenicitat de les mutacions per poder prendre

decisions en la pràctica clínica. En aquest sentit, el desenvolupament de les eines *in silico* ja existents o noves que incorporin els canvis conformationals de l'estructura 3D de les proteïnes, i estudis com el projecte ESP/EVS, ExAC i altres, contribuiran a poder ser més acurats en la predicció de la patogenicitat i a disminuir el nombre de variants de significat incert. En el segon article es posa de manifest la conveniència de disposar de familiars, ja que ens ajudar a l'hora de saber si les variants identificades en el cas índex són o no les causants de la patologia, en funció de la segregació familiar.

Malgrat els avanços en les diferents tecnologies de seqüenciació i la constant millora en el camp, encara es troben més d'un 50% de casos diagnosticats clínicament amb MAVD que no presenten variants genètiques potencialment responsables de la patologia en els gens associats fins ara.

En aquesta tesi s'han identificat diferents variants PKP2<sup>TR</sup> que sovint s'han associat a un haploinsuficiència, és a dir, la proteïna mutada és degradada a nivell de mRNA i/o proteïna i el nivell d'expressió de la proteïna disminueix a la meitat. És per aquest motiu que seria important identificar variants en zones no codificants dels genoma que regula el processament, transcripció i l'estabilitat de les proteïnes desmosòmiques. En aquest sentit s'han descrit variants en regions UTR (no codificants) en els gens *DSC2*, *DSG2*, *JUP*, *LMNA*, *PKP2*, *DSP*, *PLN* i *TGFb3(40)*. Tot i que només en l'últim cas de *TGFb3* han demostrat ser patogèniques(92). Així doncs, encara és un camp en el que es pot aprofundir molt i que segurament permetria explicar part dels pacients negatius.

---

D'altra banda, una de les limitacions d'aquesta tesi és la degradació massiva observada en el DNA obtingut a partir de parafina (article 1), on el percentatge de portadors identificats és inferior a l'esperat. Seria interessant proposar un segon disseny amb MassARRAY incloent totes les possibles variants *nonsense* a *PKP2*, ja que són les que expliquen un major nombre de casos. Cal tenir en compte també, que en moltes ocasions són les variants genètiques en la MAVD són privades. Actualment però existeixen diferents plataformes de NGS que admeten DNA degradat. De manera que la millor estratègia, sempre que fos possible, seria seqüenciar les mostres negatives utilitzant alguna d'aquestes plataformes.

### **9. Estratègies terapèutiques per PTC en MAVD**

Tal i com es descriu en aquesta tesi (article 2), així com en els diferents estudis genètics realitzats en MAVD, les variants *nonsense* són de manera molt freqüent les principals responsables de la patologia, especialment a *PKP2*. L'estudi de *PKP2*<sup>TR</sup> ha estat un dels principals aspectes objectes d'estudi en aquesta tesi.

Un estudi, realitzat l'any 2008, va utilitzar la base de dades Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org>) per tal de realitzar un meta-anàlisi de més de 7.500 variants *nonsense* en 995 diferents gens associades a malalties hereditàries. Aquests resultats mostren que les variants *nonsense* que provoquen un codó d'aturada prematur (PTC) sense canvi en la pauta de lectura (*in-frame*) són responsables de fins a un 11% del tota de variacions genètiques causants de malalties hereditàries en humans(154). Aquesta elevada incidència de les

variacions *nonsense* en malalties hereditàries humanes ens suggereix que les estratègies terapèutiques dirigides a suprimir les variacions *nonsense* (anomenades *nonsense suppression therapies*) tenen el potencial d'aportar un benefici en aquest tipus de pacients, dins d'un ventall ampli de malalties genètiques.

En els últims 10 anys hi ha hagut un interès considerable i creixent en l'estudi dels PTCs com a diana per al tractament amb diferents drogues. Es coneix que el final de la traducció no és un procés eficient al 100%, sinó que l'eficiència depèn de la competició entre el reconeixement del PTC, per part dels *release factors* de classe I i la descodificació del codó d'aturada per part del que s'anomena un *near-cognate tRNA* (és a dir, un tRNA que s'unirà al codó per correspondència de les 2 primeres bases de 3 de les que consta el codó). Aquest procés de descodificació presenta una supressió natural del codó d'aturada en alguns dels codons d'aturada, prematurs o no, dels diferents mRNAs a la cèl·lula(155). Estudis recents descriuen, en cultius cel·lular i models animals, que diferents drogues com els aminoglicòsids, el compost G418 o Ataluren permeten el mecanisme de *readthrough* en PTC, mitjançant la unió directa al RNA ribosomal. D'aquesta manera, promouen la síntesi de la proteïna completa. Aquestes drogues s'han estudiat especialment en el cas de la distròfia muscular de Duchenne (DMD), una malaltia hereditària lligada al cromosoma X i que afecta a 1 entre cada 3.500-6.000 nens nous. En el cas de la DMD, una d'aquestes drogues, Ataluren, es troba en *clinical trials* (156).



### 8.1 Proposta

Les variants *nonsense* són considerades probablement patogèniques ja que alteren la longitud de la proteïna, i per tant possiblement la seva funció. S'ha postulat que les PKP2<sup>TR</sup> provocarien haploinsuficiència degut a la seva inestabilitat(9), descrivint aquesta haploinsuficiència com a la causa més probable de gènesi de la MAVD(146).

Per aquest motiu, proposem l'estudi de diferents drogues que provoquen *readthrough* en les variacions *nonsense* descrites a PKP2 en pacients de MAVD, per tal de afavorir una major síntesi de proteïna completa. S'ha de tenir en compte que actualment la MAVD és considerada una malaltia genètica hereditària sense cura. És a dir, es tracta d'una malaltia amb tractament i prevenció de símptomes. Per aquest motiu, considerem que aquest estudi seria de gran impacte i que, en un futur, podria ser la base per a un tractament en la MAVD.

La hipòtesi sobre la que es fonamentaria aquest estudi és: les drogues provocarien el *readthrough*, i per tant la síntesi de la proteïna completa en l'al·lel mutant. D'aquesta manera, l'augment de la proteïna *wild-type* disponible en la cèl·lula permetria potencialment una major eficiència en la interacció i transport d'altres proteïnes desmosòmiques, afavorint una formació correcta dels desmosomes. I per tant, podria presumiblement revertir el fenotip cel·lular.

D'aquesta manera, l'objectiu principal seria determinar si l'aplicació de les drogues podria revertir el fenotip cel·lular, especialment l'acoblament dels desmosomes i els discos intercalars.

Els objectius específics de l'estudi serien:

- Determinar l'eficiència en el *readthrough* de diferents drogues sobre variants *nonsense* a *PKP2*
- Determinar l'augment en la quantitat de proteïna total
- Estudiar la localització i transport de proteïnes desmosomals per tal de determinar el correcte acoblament dels desmosomes

### *8.2 Disseny experimental*

El disseny experimental consistiria en dos parts principals: (1) La generació d'una línia cel·lular humana que contingui diferents variants *nonsense* a *PKP2* per tal d'analitzar simultàniament el *readthrough* després de ser tractades amb les diferents drogues; i (2) la generació de cardiomiòcits a partir de iPSC de pacients afectats de MAVD i portadors de variants *nonsense*, per tal d'aplicar el tractament amb la droga més eficient i estudiar-ne les conseqüències a nivell cel·lular, és a dir, transport, interacció amb altres proteïnes desmosòmiques i finalment l'acoblament dels desmosomes i integritat dels discos intercalars.

Concretament,

(1) En primer lloc, s'introduirien les diferents variants mitjançant la tècnica de CRISPR-Cas 9. Es confirmaria la introducció de la variant genètica patogènica

---

per seqüenciació Sanger, i l'expressió de la forma truncada per Western Blot. Posteriorment, i després del tractament amb drogues es confirmaria l'augment de la proteïna completa també per Western Blot. D'aquesta manera, seria el primer model que permetria estudiar múltiples variants *nonsense* associades a MAVD al mateix temps i en context del genoma. D'aquesta manera, s'espera que sigui una eina especialment potent en l'estudi del *readthrough* provocat per drogues en les diferents variacions *nonsense* a MAVD. Aquest primer model serviria per determinar l'eficiència de les diferents drogues en cadascuna de les variants.

(2) Es seleccionarien les variants *nonsense* a *PKP2* segons eficiència en el primer estudi i disponibilitat de mostres, i es generarien cardiomiòcits a partir de iPSCs. Es confirmaria la introducció de la variant genètica per seqüenciació Sanger, i l'expressió de la forma truncada per Western Blot. Posteriorment, i després del tractament amb drogues es confirmaria l'augment de la proteïna completa també per Western Blot. Posteriorment, s'estudiaria per immunofluorescència i microscòpia confocal la localització subcel·lular de les diferents proteïnes desmosòmiques en els cardiomiòcits, tractats i no tractats amb la droga que provoca *readthrough*, per tal de determinar, finalment, si existeix o no una reversió del fenotip cel·lular característic de la MAVD .

### 8.3. Aportació al coneixement i impacte en el camp

En l'estudi de la MAVD existeix un cert consens en descriure la haploinsuficiència com a la causa més probable de gènesi de la MAVD(146).

---

Tanmateix, diferents estudis i els resultats presentats en aquesta tesi (article 3), demostren que les PKP2<sup>TR</sup>, en cas de ser estables, podrien actuar com a dominants negatius, ja que afectarien la localització d'altres proteïnes desmosòmiques. Així doncs, l'efecte cel·lular del tractament amb les drogues que promouen el *readthrough* vindria determinat pel compromís entre tres aspectes: (1) la major estabilitat del mRNA PKP2<sup>TR</sup>, (2) l'augment de proteïna PKP2<sup>TR</sup> i (3) l'augment de proteïna PKP2 completa.

Concretament, les drogues que promouen el *readthrough*, Ataluren o G418 entre altres, tenen efecte sobre la via de vigilància de PTC, és a dir, sobre el mecanisme del NMD. D'aquesta manera provocarien que es degradés una menor quantitat de mRNA PKP2<sup>TR</sup> provocant un major *pool* de mRNA PKP2<sup>TR</sup> disponible per ser traduït. D'aquesta manera una quantitat de mRNA PKP2<sup>TR</sup> estable, a priori, podria provocar un augment de quantitat de proteïna PKP2<sup>TR</sup> total. Aquest fet estarà influenciat també per l'eficiència en el mecanisme de degradació per calpaïnes al que es trobarà sotmesa la PKP2<sup>TR</sup>. Així doncs el balanç entre la traducció de mRNA PKP2<sup>TR</sup> estable i la degradació de la proteïna PKP2<sup>TR</sup> sintetitzada, determinarà la quantitat de proteïna PKP2<sup>TR</sup> disponible per la cèl·lula. I finalment, el fenomen de *readthrough* provocarà un augment de la proteïna completa.

Finalment, l'estudi de la localització subcel·lular de les proteïnes desmosòmiques en cardiomiòcits derivats de cèl·lules iPSC portadores de variants *nonsense*, després de tractar-los amb les drogues, permetria determinar la capacitat de revertir el fenotip cel·lular. En concret permetria saber si les proteïnes

---

desmosòmiques es troben correctament localitzades als desmosomes, principalment si es produeix un augment de la senyal de PG als discos intercalars, característica tissular de la MAVD.

Aquest estudia permetria fer una anàlisi de les diferents drogues sobre les variants de PKP2<sup>TR</sup> descrites a MAVD, per tal de saber quina n'és la possible eficiència. D'aquesta manera, en cas d'èxit, s'obriria la porta a un possible posterior estudi amb models animals per estudiar-les com a possible tractament per la malaltia. Es podria plantejar un estudi més exhaustiu de la integritat dels discos intercalars en el teixit, l'efecte sobre el procés d'adipogènesi o les vies d'administració. Així, es podria postular com a tractament en algunes de les variants. És important recordar que durant el mecanisme del *readthrough*, la descodificació del codó d'aturada és produïda per part del que s'anomena un *near-cognate tRNA* (és a dir, un tRNA que s'unirà al codó per correspondència de les 2 primeres bases de 3 de les que consta el codó). D'aquesta manera, en alguns casos la proteïna completa sintetitzada a partir del mRNA mutant, pot donar lloc a una proteïna amb una variant *missense*. Per aquest motiu, i tot i que presumiblement una variació *missense* seria menys severa que una *nonsense*, és important valorar l'impacte del possible canvi aminoacídic. Existeixen diferents escenaris al respecte: (1) variacions *nonsense* en les dues primeres bases del codó i (2) variacions en la última base del codó.

En el primer cas, les variacions *nonsense* presumiblement comportarien un canvi d'aminoàcids. Tanmateix, les possibilitats no són il·limitades i es poden predir amb

---

anterioritat. És a dir, un codó d'aturada TAA o TAG, a priori, sempre comportaria un canvi per una tirosina (Tyr), ja que els codons TAC i TAT codifiquen per una Tyr. Mentre que un codó d'aturada TGA, a priori, provocaria un canvi per una cisteïna (Cys) o un triptòfan (Trp). D'aquesta manera, depenent de la seqüència inicial del codó, i mitjançant les diferents eines de predicció *in silico*, es pot valor l'efecte del canvi. En el segon cas, on la variació *nonsense* es troba en la tercera base del codó, no es produiria un canvi d'aminoàcid, i per tant, aquests serien els candidats perfectes pel tractament amb les drogues que provoquen *readthrough*.

Així doncs, aquest estudi significaria un avanç significatiu en el coneixement de la MAVD. D'una banda, permetria estudiar amb profunditat els efectes de *readthrough* de les drogues sobre cadascuna de les variants descrites a PKP2<sup>TR</sup>, aportant coneixement sobre l'efecte concret en cadascuna de les variants. D'altra banda, l'estudi dels diferents components dels discos intercalars en cardiomiòcits derivats de iPSCs de pacients afectats per MAVD permetria determinar l'efecte cel·lular d'aquestes drogues i si reverteixen o no el fenotip. Finalment, l'hipotètic estudi en models animals permetria, a més, caracteritzar l'impacte de les drogues en l'acumulació de teixit fibroadipós en el miocardi, així com en l'efecte a nivell tissular.

Per últim, i més important, l'estudi en global proposa per primera vegada un estudi enfocat a un possible tractament que actuaria directament sobre l'efecte de la variant genètica causant de la malaltia. I per tant, suggereix un nou camp d'estudi en la cura de la MAVD

# **CONCLUSIONS**

1. Els nostres resultats en una població de MAVD suggereixen que existeix un origen genètic en un 60% dels casos, amb una major prevalença de les variants d'aturada o *nonsense* a PKP2 (PKP2<sup>TR</sup>), així com descriuen per primera vegada que aquestes variants determinen una major edat en el diagnòstic
2. Els nostres estudis proposen per primera vegada un disseny de MassARRAY Sequenom que permet resoldre genèticament casos post-mortem amb DNA degradat, principal limitació en l'anàlisi genètica d'aquests casos, i de gran importància en el seu diagnòstic.
3. Els nostres resultats indiquen que les variants PKP2<sup>TR</sup> un defecte de transport; suggerint que la proteïna PKP2 necessita el domini armadillo per ser alliberada del reticle endoplasmàtic i localitzar-se a la membrana plasmàtica. D'aquesta manera, les variants PKP2<sup>TR</sup> presenten un defecte en el transport cel·lular que no només afecta a PKP2 sinó també a altres proteïnes desmosòmiques com DSP, fent que les PKP2<sup>TR</sup> puguin actuar com a dominants negatius, provocant una alteració en l'acoblament dels desmosomes
4. Els nostres estudis demostren, per tècniques immunohistoquímiques, que un 80% dels casos post-mortem MAVD presenta una disminució específica de la senyal de placoglobina als discos intercalars del miocardi, sense alteració d'altres proteïnes del desmosoma o de les unions GAP.



# **BIBLIOGRAFIA**

1. **Marban, E.** Cardiac Channelopathies. *Nature* **415**, 213-8 (2002).
2. **Nerbonne, J.M. & Kass, R.S.** Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev* **85**, 1205-53 (2005).
3. **Amin, A.S., Tan, H.L. & Wilde, A.A.** Cardiac Ion Channels in Health and Disease. *Heart Rhythm* **7**, 117-26 (2010).
4. **Marcus, F.I., McKenna, W.J., Sherrill, D., Basso, C. et al.** Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Proposed Modification of the Task Force Criteria. *Circulation* **121**, 1533-41 (2010).
5. **Zipes DP, J.J.** Cardiac Electrophysiology. (2013).
6. **Nekrasova, O. & Green, K.J.** Desmosome Assembly and Dynamics. *Trends Cell Biol* **23**, 537-46 (2013).
7. **Bonne, S., van Hengel, J., Nollet, F., Kools, P. et al.** Plakophilin-3, a Novel Armadillo-Like Protein Present in Nuclei and Desmosomes of Epithelial Cells. *J Cell Sci* **112 ( Pt 14)**, 2265-76 (1999).
8. **Chen, X., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F. et al.** Protein Binding and Functional Characterization of Plakophilin 2. Evidence for Its Diverse Roles in Desmosomes and Beta -Catenin Signaling. *J Biol Chem* **277**, 10512-22 (2002).
9. **Joshi-Mukherjee, R., Coombs, W., Musa, H., Oxford, E. et al.** Characterization of the Molecular Phenotype of Two Arrhythmogenic Right

---

Ventricular Cardiomyopathy (Arvc)-Related Plakophilin-2 (Pkp2) Mutations. *Heart Rhythm* **5**, 1715-23 (2008).

10. **Hall, C., Li, S., Li, H., Creason, V. et al.** Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Plakophilin-2 Mutations Disrupt Desmosome Assembly and Stability. *Cell Commun Adhes* **16**, 15-27 (2009).

11. **Peifer, M., Berg, S. & Reynolds, A.B.** A Repeating Amino Acid Motif Shared by Proteins with Diverse Cellular Roles. *Cell* **76**, 789-91 (1994).

12. **Garrod, D. & Chidgey, M.** Desmosome Structure, Composition and Function. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 572-87 (2008).

13. **Nekrasova, O.E., Amargo, E.V., Smith, W.O., Chen, J. et al.** Desmosomal Cadherins Utilize Distinct Kinesins for Assembly into Desmosomes. *J Cell Biol* **195**, 1185-203 (2011).

14. **Andersen, N.J. & Yeaman, C.** Sec3-Containing Exocyst Complex Is Required for Desmosome Assembly in Mammalian Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* **21**, 152-64 (2010).

15. **Bass-Zubek, A.E., Hobbs, R.P., Amargo, E.V., Garcia, N.J. et al.** Plakophilin 2: A Critical Scaffold for Pkc Alpha That Regulates Intercellular Junction Assembly. *J Cell Biol* **181**, 605-13 (2008).

16. **Godsel, L.M., Dubash, A.D., Bass-Zubek, A.E., Amargo, E.V. et al.** Plakophilin 2 Couples Actomyosin Remodeling to Desmosomal Plaque Assembly Via Rhoa. *Mol Biol Cell* **21**, 2844-59 (2010).

- 
17. **Fishman, G.I., Chugh, S.S., Dimarco, J.P., Albert, C.M. et al.** Sudden Cardiac Death Prediction and Prevention: Report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation* **122**, 2335-48 (2010).
18. **Deo, R. & Albert, C.M.** Epidemiology and Genetics of Sudden Cardiac Death. *Circulation* **125**, 620-37 (2012).
19. **Centers for Disease, C. & Prevention.** State-Specific Mortality from Sudden Cardiac Death--United States, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **51**, 123-6 (2002).
20. **Eckart, R.E., Scoville, S.L., Campbell, C.L., Shry, E.A. et al.** Sudden Death in Young Adults: A 25-Year Review of Autopsies in Military Recruits. *Ann Intern Med* **141**, 829-34 (2004).
21. **Chugh, S.S., Kelly, K.L. & Titus, J.L.** Sudden Cardiac Death with Apparently Normal Heart. *Circulation* **102**, 649-54 (2000).
22. **Zipes, D.P.** The Long Qt Interval Syndrome. A Rosetta Stone for Sympathetic Related Ventricular Tachyarrhythmias. *Circulation* **84**, 1414-9 (1991).
23. **Roden, D.M.** Clinical Practice. Long-Qt Syndrome. *N Engl J Med* **358**, 169-76 (2008).
24. **Brugada, P. & Brugada, J.** Right Bundle Branch Block, Persistent ST Segment Elevation and Sudden Cardiac Death: A Distinct Clinical and Electrocardiographic Syndrome. A Multicenter Report. *J Am Coll Cardiol* **20**, 1391-6 (1992).

- 
25. **Schott, J.J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V. et al.** Cardiac Conduction Defects Associate with Mutations in Scn5a. *Nat Genet* **23**, 20-1 (1999).
26. **Remme, C.A., Verkerk, A.O., Nuyens, D., van Ginneken, A.C. et al.** Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human Scn5a-1795insd. *Circulation* **114**, 2584-94 (2006).
27. **Brink, P.A., Ferreira, A., Moolman, J.C., Weymar, H.W. et al.** Gene for Progressive Familial Heart Block Type I Maps to Chromosome 19q13. *Circulation* **91**, 1633-40 (1995).
28. **Morita, H., Wu, J. & Zipes, D.P.** The Qt Syndromes: Long and Short. *Lancet* **372**, 750-63 (2008).
29. **Brugada, R., Tapscott, T., Czernuszewicz, G.Z., Marian, A.J. et al.** Identification of a Genetic Locus for Familial Atrial Fibrillation. *N Engl J Med* **336**, 905-11 (1997).
30. **Tsai, C.T., Lai, L.P., Hwang, J.J., Lin, J.L. et al.** Molecular Genetics of Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol* **52**, 241-50 (2008).
31. **Mohamed, U., Napolitano, C. & Priori, S.G.** Molecular and Electrophysiological Bases of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol* **18**, 791-7 (2007).
32. **Priori, S.G., Napolitano, C., Tiso, N., Memmi, M. et al.** Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (Hryr2) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation* **103**, 196-200 (2001).

- 
33. **Kass, S.MacRae, C.Grabber, H.L.Sparks, E.A. et al.** A Gene Defect That Causes Conduction System Disease and Dilated Cardiomyopathy Maps to Chromosome 1p1-1q1. *Nat Genet* **7**, 546-51 (1994).
34. Towbin, J.A. & Bowles, N.E. The Failing Heart. *Nature* **415**, 227-33 (2002).
35. **Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C. et al.** Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
36. **Hwang, J. & Kim, Y.K.** When a Ribosome Encounters a Premature Termination Codon. *BMB Rep* **46**, 9-16 (2013).
37. 1000 Genomes Project Consortium, A.G., Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A Map of Human Genome Variation from Population-Scale Sequencing. *Nature* **467**, 1061-73 (2010).
38. ExomeVariantServer. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), S., WA. Nhlbi Exome Sequencing Project (Esp), Seattle, Wa. (June 2012).
39. **Cooper, D.N., Stenson, P.D. & Chuzhanova, N.A.** The Human Gene Mutation Database (Hgmdb) and Its Exploitation in the Study of Mutational Mechanisms. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 1**, Unit 1 13 (2006).
40. **van der Zwaag, P.A., Jongbloed, J.D., van den Berg, M.P., van der Smagt, J.J. et al.** A Genetic Variants Database for Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Hum Mutat* **30**, 1278-83 (2009).

- 
41. **Frank, R., Fontaine, G., Vedel, J., Mialet, G. et al.** [Electrocardiology of 4 Cases of Right Ventricular Dysplasia Inducing Arrhythmia]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **71**, 963-72 (1978).
42. **Marcus, F.I., Fontaine, G.H., Guiraudon, G., Frank, R. et al.** Right Ventricular Dysplasia: A Report of 24 Adult Cases. *Circulation* **65**, 384-98 (1982).
43. **Aad, G., Abbott, B., Abdallah, J., Abdelalim, A.A. et al.** Search for a Standard Model Higgs Boson in the  $H \rightarrow Z\gamma \rightarrow L^{(+)}L^{(-)}\nu\nu$  Decay Channel with the Atlas Detector. *Phys Rev Lett* **107**, 221802 (2011).
44. **Bauce, B., Frigo, G., Marcus, F.I., Basso, C. et al.** Comparison of Clinical Features of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Men Versus Women. *Am J Cardiol* **102**, 1252-7 (2008).
45. **Sen-Chowdhry, S., Syrris, P., Ward, D., Asimaki, A. et al.** Clinical and Genetic Characterization of Families with Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Provides Novel Insights into Patterns of Disease Expression. *Circulation* **115**, 1710-20 (2007).
46. **Marcus, F.I., Zareba, W., Calkins, H., Towbin, J.A. et al.** Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia Clinical Presentation and Diagnostic Evaluation: Results from the North American Multidisciplinary Study. *Heart Rhythm* **6**, 984-92 (2009).
47. **Rossi, P.A.** Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia--Clinical Features. *Eur Heart J* **10 Suppl D**, 7-9 (1989).

- 
48. **El Demellawy, D., Nasr, A. & Alowami, S.** An Updated Review on the Clinicopathologic Aspects of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Forensic Med Pathol* **30**, 78-83 (2009).
49. **Nava, A.Thiene, G.Canciani, B.Scognamiglio, R. et al.** Familial Occurrence of Right Ventricular Dysplasia: A Study Involving Nine Families. *J Am Coll Cardiol* **12**, 1222-8 (1988).
50. **Corrado, D., Fontaine, G., Marcus, F.I., McKenna, W.J. et al.** Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: Need for an International Registry. Study Group on Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy of the Working Groups on Myocardial and Pericardial Disease and Arrhythmias of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the World Heart Federation. *Circulation* **101**, E101-6 (2000).
51. **McKenna, W.J., Thiene, G., Nava, A., Fontaliran, F. et al.** Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J* **71**, 215-8 (1994).
52. **Marcus, F.I.McKenna, W.J.Sherrill, D.Basso, C. et al.** Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Proposed Modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J* **31**, 806-14.



- 
53. **Asimaki, A.Tandri, H.Huang, H.Halushka, M.K. et al.** A New Diagnostic Test for Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *N Engl J Med* **360**, 1075-84 (2009).
54. **Nasir, K.Bomma, C.Tandri, H.Roguin, A. et al.** Electrocardiographic Features of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy According to Disease Severity: A Need to Broaden Diagnostic Criteria. *Circulation* **110**, 1527-34 (2004).
55. **Jain, R.Dalal, D.Daly, A.Tichnell, C. et al.** Electrocardiographic Features of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia. *Circulation* **120**, 477-87 (2009).
56. **Bomma, C.Rutberg, J.Tandri, H.Nasir, K. et al.** Misdiagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol* **15**, 300-6 (2004).
57. **Tedford, R.J.James, C.Judge, D.P.Tichnell, C. et al.** Cardiac Transplantation in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **59**, 289-90 (2012).
58. **Kirchhof, P.Fabritz, L.Zwiener, M.Witt, H. et al.** Age- and Training-Dependent Development of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Heterozygous Plakoglobin-Deficient Mice. *Circulation* **114**, 1799-806 (2006).
59. **Oliva, A., Brugada, R., D'Aloja, E., Boschi, I. et al.** State of the Art in Forensic Investigation of Sudden Cardiac Death. *Am J Forensic Med Pathol* **32**, 1-16 (2011).

- 
60. **Thiene, G., Nava, A., Corrado, D., Rossi, L. et al.** Right Ventricular Cardiomyopathy and Sudden Death in Young People. *N Engl J Med* **318**, 129-33 (1988).
61. **Fontaine, G., Fontaliran, F., Zenati, O., Guzman, C.E. et al.** Fat in the Heart. A Feature Unique to the Human Species? Observational Reflections on an Unsolved Problem. *Acta Cardiol* **54**, 189-94 (1999).
62. **Fontaine, G. & Chen, H.S.** Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Back in Force. *Am J Cardiol* **113**, 1735-9 (2014).
63. Basso C, T.G. Autopsy and Endomyocardial Biopsy Findings. in *Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia* (ed. Marcus FI, N., Thiene G) (2007).
64. **Burke, A.P., Farb, A., Tashko, G. & Virmani, R.** Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and Fatty Replacement of the Right Ventricular Myocardium: Are They Different Diseases? *Circulation* **97**, 1571-80 (1998).
65. **Tansey, D.K., Aly, Z. & Sheppard, M.N.** Fat in the Right Ventricle of the Normal Heart. *Histopathology* **46**, 98-104 (2005).
66. **Fontaliran, F., Fontaine, G., Fillette, F., Aouate, P. et al.** [Nosologic Frontiers of Arrhythmogenic Dysplasia. Quantitative Variations of Normal Adipose Tissue of the Right Heart Ventricle]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **84**, 33-8 (1991).

- 
67. **Basso, C. & Thiene, G.** Adipositas Cordis, Fatty Infiltration of the Right Ventricle, and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. Just a Matter of Fat? *Cardiovasc Pathol* **14**, 37-41 (2005).
68. **Davies, M.J.** The Investigation of Sudden Cardiac Death. *Histopathology* **34**, 93-8 (1999).
69. **Tabib, A.Loire, R.Chalabreysse, L.Meyronnet, D. et al.** Circumstances of Death and Gross and Microscopic Observations in a Series of 200 Cases of Sudden Death Associated with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and/or Dysplasia. *Circulation* **108**, 3000-5 (2003).
70. **Sen-Chowdhry, S., Syrris, P., Pantazis, A., Quarta, G. et al.** Mutational Heterogeneity, Modifier Genes, and Environmental Influences Contribute to Phenotypic Diversity of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* **3**, 323-30 (2010).
71. **Awad, M.M.Dalal, D.Tichnell, C.James, C. et al.** Recessive Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Due to Novel Cryptic Splice Mutation in Pkp2. *Hum Mutat* **27**, 1157 (2006).
72. **Awad, M.M.Dalal, D.Cho, E.Amat-Alarcon, N. et al.** Dsg2 Mutations Contribute to Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **79**, 136-42 (2006).
73. **McKoy, G.Protonotarios, N.Crosby, A.Tsatsopoulou, A. et al.** Identification of a Deletion in Plakoglobin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy

---

with Palmoplantar Keratoderma and Woolly Hair (Naxos Disease). *Lancet* **355**, 2119-24 (2000).

74. **Norgett, E.E.Hatsell, S.J.Carvajal-Huerta, L.Cabezas, J.C. et al.** Recessive Mutation in Desmoplakin Disrupts Desmoplakin-Intermediate Filament Interactions and Causes Dilated Cardiomyopathy, Woolly Hair and Keratoderma. *Hum Mol Genet* **9**, 2761-6 (2000).

75. Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Howells, K. et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 Update. *Genome Med* **1**, 13 (2009).

76. **Gerull, B.Heuser, A.Wichter, T.Paul, M. et al.** Mutations in the Desmosomal Protein Plakophilin-2 Are Common in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Nat Genet* **36**, 1162-4 (2004).

77. **Kapplinger, J.D.Landstrom, A.P.Salisbury, B.A.Callis, T.E. et al.** Distinguishing Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia-Associated Mutations from Background Genetic Noise. *J Am Coll Cardiol* **57**, 2317-27 (2011).

78. **Cox, M.G.van der Zwaag, P.A.van der Werf, C.van der Smagt, J.J. et al.** Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: Pathogenic Desmosome Mutations in Index-Patients Predict Outcome of Family Screening: Dutch Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Genotype-Phenotype Follow-up Study. *Circulation* **123**, 2690-700 (2011).

- 
79. **Roberts, J.Herkert, J.Rutberg, J.Nikkel, S. et al.** Detection of Genomic Deletions of Pkp2 in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Clin Genet* (2012).
80. **Li Mura, I.E.Bauce, B.Nava, A.Fanciulli, M. et al.** Identification of a Pkp2 Gene Deletion in a Family with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* (2013).
81. **Heuser, A.Plovie, E.R.Ellinor, P.T.Grossmann, K.S. et al.** Mutant Desmocollin-2 Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **79**, 1081-8 (2006).
82. **Pilichou, K.Nava, A.Basso, C.Beffagna, G. et al.** Mutations in Desmoglein-2 Gene Are Associated with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation* **113**, 1171-9 (2006).
83. Protonotarios, N., Tsatsopoulou, A., Patsourakos, P., Alexopoulos, D. et al. Cardiac Abnormalities in Familial Palmoplantar Keratosis. *Br Heart J* **56**, 321-6 (1986).
84. **Protonotarios, N. & Tsatsopoulou, A.** Naxos Disease: Cardiocutaneous Syndrome Due to Cell Adhesion Defect. *Orphanet J Rare Dis* **1**, 4 (2006).
85. **Kaplan, S.R.Gard, J.J.Protonotarios, N.Tsatsopoulou, A. et al.** Remodeling of Myocyte Gap Junctions in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Due to a Deletion in Plakoglobin (Naxos Disease). *Heart Rhythm* **1**, 3-11 (2004).

- 
86. Rampazzo, A.Nava, A.Malacrida, S.Beffagna, G. *et al.* Mutation in Human Desmoplakin Domain Binding to Plakoglobin Causes a Dominant Form of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **71**, 1200-6 (2002).
87. Chalabreysse, L., Senni, F., Bruyere, P., Aime, B. *et al.* A New Hypo/Oligodontia Syndrome: Carvajal/Naxos Syndrome Secondary to Desmoplakin-Dominant Mutations. *J Dent Res* **90**, 58-64 (2011).
88. Keller, D.I.Stepowski, D.Balmer, C.Simon, F. *et al.* De Novo Heterozygous Desmoplakin Mutations Leading to Naxos-Carvajal Disease. *Swiss Med Wkly* **142**, w13670 (2012).
89. van Tintelen, J.P.Van Gelder, I.C.Asimaki, A.Suurmeijer, A.J. *et al.* Severe Cardiac Phenotype with Right Ventricular Predominance in a Large Cohort of Patients with a Single Missense Mutation in the Des Gene. *Heart Rhythm* **6**, 1574-83 (2009).
90. Lorenzon, A.Beffagna, G.Bauce, B.De Bortoli, M. *et al.* Desmin Mutations and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **111**, 400-5 (2013).
91. Vanderschuren, K.L., Sieverink, T. & Wilders, R. Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Type 1: A Light on Molecular Mechanisms. *Genet Res Int* **2013**, 460805 (2013).

92. **Beffagna, G.Occhi, G.Nava, A.Vitiello, L. et al.** Regulatory Mutations in Transforming Growth Factor-Beta3 Gene Cause Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 1. *Cardiovasc Res* **65**, 366-73 (2005).
93. **Merner, N.D.Hodgkinson, K.A.Haywood, A.F.Connors, S. et al.** Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 5 Is a Fully Penetrant, Lethal Arrhythmic Disorder Caused by a Missense Mutation in the Tmem43 Gene. *Am J Hum Genet* **82**, 809-21 (2008).
94. **Haywood, A.F.Merner, N.D.Hodgkinson, K.A.Houston, J. et al.** Recurrent Missense Mutations in Tmem43 (Arvd5) Due to Founder Effects Cause Arrhythmogenic Cardiomyopathies in the Uk and Canada. *Eur Heart J* **34**, 1002-11 (2013).
95. **Burke, B. & Stewart, C.L.** Life at the Edge: The Nuclear Envelope and Human Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 575-85 (2002).
96. **Carboni, N.Sardu, C.Cocco, E.Marrosu, G. et al.** Cardiac Involvement in Patients with Lamin a/C Gene Mutations: A Cohort Observation. *Muscle Nerve* **46**, 187-92 (2012).
97. **Quarta, G.Syrris, P.Ashworth, M.Jenkins, S. et al.** Mutations in the Lamin a/C Gene Mimic Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Eur Heart J* **33**, 1128-36 (2012).

- 
98. **Anderson, B.R. & Granzier, H.L.** Titin-Based Tension in the Cardiac Sarcomere: Molecular Origin and Physiological Adaptations. *Prog Biophys Mol Biol* **110**, 204-17 (2012).
99. **Taylor, M.Graw, S.Sinagra, G.Barnes, C. et al.** Genetic Variation in Titin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy-Overlap Syndromes. *Circulation* **124**, 876-85 (2011).
100. **MacLennan, D.H., Asahi, M. & Tupling, A.R.** The Regulation of Serca-Type Pumps by Phospholamban and Sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci* **986**, 472-80 (2003).
101. **Cerra, M.C. & Imbrogno, S.** Phospholamban and Cardiac Function: A Comparative Perspective in Vertebrates. *Acta Physiol (Oxf)* **205**, 9-25 (2012).
102. **van der Zwaag, P.A.van Rijsingen, I.A.Asimaki, A.Jongbloed, J.D. et al.** Phospholamban R14del Mutation in Patients Diagnosed with Dilated Cardiomyopathy or Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Evidence Supporting the Concept of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* **14**, 1199-207 (2012).
103. **Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I. et al.** Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell* **123**, 889-901 (2005).
104. **van Hengel, J.Calore, M.Bauce, B.Dazzo, E. et al.** Mutations in the Area Composita Protein Alphas-Catenin Are Associated with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Eur Heart J* **34**, 201-10 (2013).



- 
105. **Li, J.Goossens, S.van Hengel, J.Gao, E. et al.** Loss of Alphas-Catenin Alters the Hybrid Adhering Junctions in the Heart and Leads to Dilated Cardiomyopathy and Ventricular Arrhythmia Following Acute Ischemia. *J Cell Sci* **125**, 1058-67 (2012).
106. **Tiso, N.Stephan, D.A.Nava, A.Bagattin, A. et al.** Identification of Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene in Families Affected with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 2 (Arvd2). *Hum Mol Genet* **10**, 189-94 (2001).
107. **Basso, C., Bauce, B., Corrado, D. & Thiene, G.** Pathophysiology of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* **9**, 223-33 (2012).
108. **Maron, B.J.Towbin, J.A.Thiene, G.Antzelevitch, C. et al.** Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* **113**, 1807-16 (2006).
109. **Elliott, P.Andersson, B.Arbustini, E.Bilinska, Z. et al.** Classification of the Cardiomyopathies: A Position Statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* **29**, 270-6 (2008).

- 
110. **Saffitz, J.E.** The Pathobiology of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Annu Rev Pathol* **6**, 299-321 (2011).
111. **Lombardi, R., Dong, J., Rodriguez, G., Bell, A. et al.** Genetic Fate Mapping Identifies Second Heart Field Progenitor Cells as a Source of Adipocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circ Res* **104**, 1076-84 (2009).
112. **Ai, D., Fu, X., Wang, J., Lu, M.F. et al.** Canonical Wnt Signaling Functions in Second Heart Field to Promote Right Ventricular Growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9319-24 (2007).
113. **Garcia-Gras, E., Lombardi, R., Giocondo, M.J., Willerson, J.T. et al.** Suppression of Canonical Wnt/Beta-Catenin Signaling by Nuclear Plakoglobin Recapitulates Phenotype of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Clin Invest* **116**, 2012-21 (2006).
114. **Lombardi, R., da Graca Cabreira-Hansen, M., Bell, A., Fromm, R.R. et al.** Nuclear Plakoglobin Is Essential for Differentiation of Cardiac Progenitor Cells to Adipocytes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circ Res* **109**, 1342-53 (2011).
115. **Maeda, O., Usami, N., Kondo, M., Takahashi, M. et al.** Plakoglobin (Gamma-Catenin) Has Tcf/Lef Family-Dependent Transcriptional Activity in Beta-Catenin-Deficient Cell Line. *Oncogene* **23**, 964-72 (2004).

- 
116. **Klymkowsky, M.W., Williams, B.O., Barish, G.D., Varmus, H.E. et al.** Membrane-Anchored Plakoglobins Have Multiple Mechanisms of Action in Wnt Signaling. *Mol Biol Cell* **10**, 3151-69 (1999).
117. **Grossmann, K.S., Grund, C., Huelsken, J., Behrend, M. et al.** Requirement of Plakophilin 2 for Heart Morphogenesis and Cardiac Junction Formation. *J Cell Biol* **167**, 149-60 (2004).
118. **Gomes, J.Finlay, M.Ahmed, A.K.Ciaccio, E.J. et al.** Electrophysiological Abnormalities Precede Overt Structural Changes in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Due to Mutations in Desmoplakin-a Combined Murine and Human Study. *Eur Heart J* **33**, 1942-53 (2012).
119. **Kant, S., Krull, P., Eisner, S., Leube, R.E. et al.** Histological and Ultrastructural Abnormalities in Murine Desmoglein 2-Mutant Hearts. *Cell Tissue Res* **348**, 249-59 (2012).
120. **Fidler, L.M., Wilson, G.J., Liu, F., Cui, X. et al.** Abnormal Connexin43 in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Plakophilin-2 Mutations. *J Cell Mol Med* **13**, 4219-28 (2009).
121. **Noorman, M.Hakim, S.Kessler, E.Groeneweg, J.A. et al.** Remodeling of the Cardiac Sodium Channel, Connexin43, and Plakoglobin at the Intercalated Disk in Patients with Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Heart Rhythm* **10**, 412-9 (2013).

- 
122. **Basso, C., Ronco, F., Marcus, F., Abudurehman, A. et al.** Quantitative Assessment of Endomyocardial Biopsy in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An in Vitro Validation of Diagnostic Criteria. *Eur Heart J* **29**, 2760-71 (2008).
123. **Calabrese, F., Basso, C., Carturan, E., Valente, M. et al.** Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Is There a Role for Viruses? *Cardiovasc Pathol* **15**, 11-7 (2006).
124. **Zhang, M., Tavora, F., Oliveira, J.B., Li, L. et al.** Pkp2 Mutations in Sudden Death from Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (Arvc) and Sudden Unexpected Death with Negative Autopsy (Sudna). *Circ J* **76**, 189-94 (2012).
125. **Dalal, D., Molin, L.H., Piccini, J., Tichnell, C. et al.** Clinical Features of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Associated with Mutations in Plakophilin-2. *Circulation* **113**, 1641-9 (2006).
126. **Pedra, S.R., Hornberger, L.K., Leal, S.M., Taylor, G.P. et al.** Cardiac Function Assessment in Patients with Family History of Nonhypertrophic Cardiomyopathy: A Prenatal and Postnatal Study. *Pediatr Cardiol* **26**, 543-52 (2005).
127. **Sen-Chowdhry, S., Syrris, P. & McKenna, W.J.** Role of Genetic Analysis in the Management of Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **50**, 1813-21 (2007).

- 
128. **Ansari, B., Coates, P.J., Greenstein, B.D. & Hall, P.A.** In Situ End-  
Labelling Detects DNA Strand Breaks in Apoptosis and Other Physiological and  
Pathological States. *J Pathol* **170**, 1-8 (1993).
129. **Allegue, C., Gil, R., Blanco-Verea, A., Santori, M. et al.** Prevalence  
of Hcm and Long Qt Syndrome Mutations in Young Sudden Cardiac Death-Related  
Cases. *Int J Legal Med* **125**, 565-72 (2011).
130. **Herren, T., Gerber, P.A. & Duru, F.** Arrhythmogenic Right Ventricular  
Cardiomyopathy/Dysplasia: A Not So Rare "Disease of the Desmosome" with  
Multiple Clinical Presentations. *Clin Res Cardiol* **98**, 141-58 (2009).
131. **Campuzano, O.Alcalde, M.Allegue, C.Iglesias, A. et al.** Genetics of  
Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Med Genet* (2013).
132. **Tan, H.L., Hofman, N., van Langen, I.M., van der Wal, A.C. et al.**  
Sudden Unexplained Death: Heritability and Diagnostic Yield of Cardiological and  
Genetic Examination in Surviving Relatives. *Circulation* **112**, 207-13 (2005).
133. **Gettings, K.B., Kiesler, K.M. & Vallone, P.M.** Performance of a Next  
Generation Sequencing Snp Assay on Degraded DNA. *Forensic Sci Int Genet* **19**,  
1-9 (2015).
134. **Dalal, D.James, C.Devanagondi, R.Tichnell, C. et al.** Penetrance of  
Mutations in Plakophilin-2 among Families with Arrhythmogenic Right Ventricular  
Dysplasia/Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **48**, 1416-24 (2006).

- 
135. **Rampazzo, A.** Genetic Bases of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Heart Int* **2**, 17 (2006).
136. **Yang, Z.Bowles, N.E.Scherer, S.E.Taylor, M.D. et al.** Desmosomal Dysfunction Due to Mutations in Desmoplakin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Circ Res* **99**, 646-55 (2006).
137. **Lombardi, R. & Marian, A.J.** Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Is a Disease of Cardiac Stem Cells. *Curr Opin Cardiol* **25**, 222-8 (2010).
138. **Herman, D.S.Lam, L.Taylor, M.R.Wang, L. et al.** Truncations of Titin Causing Dilated Cardiomyopathy. *N Engl J Med* **366**, 619-28 (2012).
139. **Rasmussen, T.B.Nissen, P.H.Palmfeldt, J.Gehmlich, K. et al.** Truncating Plakophilin-2 Mutations in Arrhythmogenic Cardiomyopathy Are Associated with Protein Haploinsufficiency in Both Myocardium and Epidermis. *Circ Cardiovasc Genet* (2014).
140. **Ohno, S., Nagaoka, I., Fukuyama, M., Kimura, H. et al.** Age-Dependent Clinical and Genetic Characteristics in Japanese Patients with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia. *Circ J* **77**, 1534-42 (2013).
141. **Orphanides, G. & Reinberg, D.** A Unified Theory of Gene Expression. *Cell* **108**, 439-51 (2002).

- 
142. **Reed, R.** Coupling Transcription, Splicing and Mrna Export. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 326-31 (2003).
143. **Ibba, M. & Soll, D.** Quality Control Mechanisms During Translation. *Science* **286**, 1893-7 (1999).
144. Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W. & Kulozik, A.E. Nonsense-Mediated Decay Approaches the Clinic. *Nat Genet* **36**, 801-8 (2004).
145. **Cerrone, M.Lin, X.Zhang, M.Agullo-Pascual, E. et al.** Missense Mutations in Plakophilin-2 Cause Sodium Current Deficit and Associate with a Brugada Syndrome Phenotype. *Circulation* **129**, 1092-103 (2014).
146. **Kirchner, F.Schuetz, A.Boldt, L.H.Martens, K. et al.** Molecular Insights into Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Plakophilin-2 Missense Mutations. *Circ Cardiovasc Genet* **5**, 400-11 (2012).
147. **Zheng, Q., Li, J. & Wang, X.** Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy in Proteinopathies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **1**, 127-42 (2009).
148. **Portbury, A.L., Willis, M.S. & Patterson, C.** Tearin' up My Heart: Proteolysis in the Cardiac Sarcomere. *J Biol Chem* **286**, 9929-34 (2011).
149. **Godsel, L.M.Hsieh, S.N.Amargo, E.V.Bass, A.E. et al.** Desmoplakin Assembly Dynamics in Four Dimensions: Multiple Phases Differentially Regulated by Intermediate Filaments and Actin. *J Cell Biol* **171**, 1045-59 (2005).

- 
150. **Swope, D., Cheng, L., Gao, E., Li, J. et al.** Loss of Cadherin-Binding Proteins Beta-Catenin and Plakoglobin in the Heart Leads to Gap Junction Remodeling and Arrhythmogenesis. *Mol Cell Biol* **32**, 1056-67 (2012).
151. **Munkholm, J., Christensen, A.H., Svendsen, J.H. & Andersen, C.B.** Usefulness of Immunostaining for Plakoglobin as a Diagnostic Marker of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **109**, 272-5 (2012).
152. **Paul, M., Wichter, T., Gerse, J., Arps, V. et al.** Connexin Expression Patterns in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **111**, 1488-95 (2013).
153. **van der Heyden, M.A., Rook, M.B., Hermans, M.M., Rijksen, G. et al.** Identification of Connexin43 as a Functional Target for Wnt Signalling. *J Cell Sci* **111 ( Pt 12)**, 1741-9 (1998).
154. **Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D.N. & Chuzhanova, N.A.** A Meta-Analysis of Nonsense Mutations Causing Human Genetic Disease. *Hum Mutat* **29**, 1037-47 (2008).
155. **Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J.P. & Namy, O.** Sense from Nonsense: Therapies for Premature Stop Codon Diseases. *Trends Mol Med* **18**, 679-88 (2012).
156. **Beytia Mde, L., Vry, J. & Kirschner, J.** Drug Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: Available Evidence and Perspectives. *Acta Myol* **31**, 4-8 (2012).