



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio de la Patogenicidad de las Variantes
Genéticas Desmosómicas en las Miocardiopatías y
la Muerte Súbita

D. Iván Gómez Milanés

2017

AGRADECIMIENTOS

A Isabel Tovar, por haberme dado la oportunidad, a través de la Beca de Investigación de la Academia de Farmacia Santa María de España, de poder formarme en el campo de la Biología Molecular en el Servicio de Análisis Clínicos. Gracias por el apoyo y por los siempre buenos consejos.

A Juanra, una de las personas mas optimistas que conozco, sabe siempre sacar de donde no hay. Gracias por confiar a ciegas en mí y por darme la oportunidad de aprender tanto. Además de un gran investigador y director, una gran persona.

A mis tres chicas LDG María, Espe e Inma y a David. María, además de directora, una todoterreno en el trabajo y en la vida. Sin su ayuda y sus consejos no hubiera aprendido tanto. Otro ejemplo a seguir y yo he tenido la suerte de que dirija mi tesis. Espe, que decir de Espe, aunque parezcamos la noche y el día nos parecemos mucho, los dos unos ilusos de la vida y unos soñadores, otra gran persona sin la cual mi paso por el laboratorio no hubiera sido lo mismo. Inma, mi compañera de "fatigas laborales"...cuántas veces nos habremos consolado el uno al otro?. Al final me sacaste la delantera con la tesis, otro ejemplo de el que la sigue la consigue...Gracias a las tres, además de haber aprendido todo sobre embarazos, lactancias y pañales, ha sido genial trabajar con vosotras, irnos a congresos, y hacer intentos de salir de fiesta aunque tuviéramos que madrugar (yo os presionaba pero no había manera!).

A Health in Code, los cuales también han hecho posible que se realice este proyecto. Gracias por toda la información sobre pacientes y por estar al pie del cañón cada vez que he necesitado vuestra ayuda.

A mi familia. Mis padres, que en todo momento me han apoyado, sobre todo mi madre; ella es el epicentro de todo esto. Ella fue la que me introdujo en el mundo de la investigación y a ciencia y la que siempre ha estado detrás de esta oveja descarriada (yo) para poder llegar a algo en la vida. Ha costado pero de momento no me va del todo mal no? A mi abuela, mi segunda madre y la que se encarga de que si mi madre se relaja de estar detrás mía ahí está ella para dar guerra. Gracias por todos tus consejos y por no rendirte nunca conmigo, eres más fuerte que todas las personas que conozco juntas.

A mi familia no sanguínea pero no menos importante. A Javi, por tirar de mí cuando lo necesito, por saber hacerme ver las cosas con optimismo cuando se me nubla el futuro y bueno, que decir de la persona que mejor me conoce a parte de gracias gracias y gracias... A todas aquellas personas que de una manera u otra me han apoyado, se han interesado o me han insistido en que acabe la tesis: Elena, Carla, Juanjo, Dudu, Alexandra, Paloma, Ismael, mis compañeras de trabajo actuales de Madrid por aguantar mi estrés pre tesis y a todo aquel que de alguna forma se haya visto afectado o involucrado en esto.

A mi perro Atila (que por desgracia ya no está conmigo), porque sí, porque merece mención, no por esta Tesis en concreto, sino por ser el único que siempre me ha escuchado y me ha aguantado incondicionalmente.

A Juan Pedro Hernández del Rincón, por haberse prestado a ser tribunal de mi Tesis aunque por burocracia universitaria solo haya quedado como suplente. Es una gran persona y merece mención en estos agradecimientos (No serás tribunal pero espero verte este día).

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS

CAPÍTULO I

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1. PROTEÍNAS DESMOSÓMICAS.....	1
1.1 Estructura y funcionamiento del desmosoma.....	1
1.1.1 Cadherinas desmosómicas.....	3
1.1.2 Proteínas armadillo.....	5
1.1.3 La familia de las plaquinas.....	7
2. ALTERACIONES CARDIACAS HEREDITARIAS.....	8
2.1 Implicación desmosomal en las miocardiopatías.....	10
3. MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DE VENTRÍCULO DERECHO (MAVD).....	10
3.1 Antecedentes históricos.....	10
3.2 Etiología.....	11
3.3 Fisiopatología de la enfermedad.....	13
3.4 Clínica de la enfermedad.....	15
3.5 Diagnóstico de la MAVD.....	16
3.6 Relación de la patología del desmosoma con la MAVD.....	20
3.6.1 Síndromes cardiocutáneos.....	20
3.6.2 Desmosomopatías y génesis de la MAVD/I. Genética molecular.....	21
4. MIOCARDIOPATÍA DILATADA.....	30
4.1 Etiología.....	30
4.2 Fisiopatología de la enfermedad.....	30
4.3 Clínica de la enfermedad. MCD familiar.....	32
4.4 Desmosomopatías y MCD. Genética molecular.....	32
5. MUERTE ARRÍTMICA SÚBITA CARDIACA (SADS).....	36
5.1 Etiología y genética.....	36

CAPÍTULO II

<i>OBJETIVOS</i>	40
------------------------	----

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES.....	43
2. ESTUDIO GENÉTICO.....	43
2.1 Extracción de DNA genómico.....	44
2.2 Amplificación y purificación de DNA genómico.....	46
2.3 Secuenciación automática directa.....	48
2.4 Purificación de la reacción de secuenciación.....	50
2.5 Estudio de las alteraciones encontradas.....	51
2.6 Estudio de grandes reordenamientos en los genes desmosómicos.....	52
2.7 Estudio de microsatélites.....	54
2.8 Análisis bioinformático de las variantes. Estudios in silico.....	58
2.8.1 Identificación de posiciones conservadas.....	58
2.8.2 Estudio de variantes de cambio de sentido.....	58
2.8.3 Estudio de variantes intrónicas.....	59

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	62
2. RESULTADOS DEL ESTUDIO FAMILIAR.....	64
2.1 Familias diagnosticadas de MAVD con genotipo positivo.....	68
2.2 Familias diagnosticadas de MCD con genotipo positivo.....	101
2.3 Familias diagnosticadas de SADS con genotipo positivo.....	125
3. ESTUDIO DE MICROSATÉLITES EN FAMILIAS PORTADORAS DE LA MISMA VARIANTE.....	131

4. MLPA. GRANDES REORDENAMIENTOS EN LOS GENES DESMOSÓMICOS.....	138
--	-----

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

1. IMPLICACIÓN DESMOSOMAL EN LAS MIOCARDIOPATÍAS.....	143
2. RENTABILIDAD DE LA GENÉTICA EN EL ESTUDIO DE LAS MIOCARDIOPATÍAS (MCD, MAVD y SADS)	
2.1 Variantes desmosómicas detectadas en la población de estudio.....	143
2.1.1 Variantes detectadas en los genes que codifican para las cadherinas desmosómicas (DSG2 y DSC2).....	144
2.1.2 Variantes detectadas en el gen que codifica para las proteínas armadillo o placoglobinas (JUP).....	149
2.1.3 Variantes detectadas en el gen que codifica para la proteína desmoplaquina (DSP).....	152
2.1.4 Variantes detectadas en el gen que codifica para la proteína placofilina (PKP2).....	157
2.1.5 Variantes identificadas en los genes que codifican para el fosfolambán y lamina (PLN y LMNA).....	163

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES.....	166
-------------------	-----

ANEXOS

ANEXO I. Diagrama de flujo de la inclusión de pacientes en nuestra cohorte.....	168
ANEXO II. Consentimiento informado MAVD y hoja informativa.....	169
ANEXO III. Consentimiento informado MCD y hoja informativa.....	171
ANEXO IV. Consentimiento informado SADS y hoja informativa.....	173

ANEXO V. Diagrama de flujo del procesamiento de las muestras.....	175
ANEXO VI. Sondas utilizadas para la técnica de MLPA.....	176
BIBLIOGRAFÍA.....	177

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACV	Accidente Cerebro Vascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
bp	Pares de bases
C-t	Extremo carboxilo terminal
DAI	Desfibrilador Automático Implantable
dHPLC	Cromatografía Líquida desnaturalizante de Alto Rendimiento
ECG	Electrocardiograma
EEF	Estudio electrofisiológico
FA	Fibrilación Auricular
FE	Fracción de eyección
FV	Fibrilación Ventricular
FVI	Fibrilación Ventricular Idiomática
IC	Insuficiencia Cardíaca
LVNC	Ventrículo Izquierdo No Compactado
MCD	Miocardiopatía Dilatada
MAVD	Miocardiopatía Arritmogénica del Ventrículo Derecho
MAVI	Miocardiopatía Arritmogénica del Ventrículo Izquierdo
MLPA	Multiplex Ligation Probe Amplification
MS	Muerte súbita
N-t	Extremo amino terminal
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

RE	Retículo endoplásmico
RMN	Resonancia Magnética
SB	Síndrome de Brugada
SADS	Síndrome de Muerte Súbita Arrítmica
SMSI	Síndrome de Muerte Súbita Inexplicable
SQTL	Síndrome de QT Largo
TV	Taquicardia Ventricular
TVNS	Taquicardia Ventricular No Sostenida
TVP	Taquicardia Ventricular Polimórfica
VD	Ventrículo Derecho
VI	Ventrículo Izquierdo

INTRODUCCIÓN

1. PROTEÍNAS DESMOSÓMICAS

1.1 Estructura y funcionamiento del desmosoma

La estructura del desmosoma fue observada por primera vez por el patólogo italiano Bizozzero en 1864. Los desmosomas son un tipo de unión intercelular en forma de botón que están ubicados en zonas discretas de los límites intercelulares. Su estructura ha sido analizada con técnicas tales como la microscopía electrónica (ME), revelando que tanto su estructura como su organización son complejas (Figura 1). En cortes al microscopio electrónico de transmisión un desmosoma se reconoce porque:

- La membrana de las células adyacentes corren paralelas entre sí, separadas por un espacio de unos 20 nm en el cual presenta una línea densa en su zona media.
- Adherida a la cara intracelular de la membrana plasmática se encuentra una gruesa banda llamada placa desmosómica
- Insertos en la placa desmosómica aparecen numerosos filamentos intermedios.

Los desmosomas se localizan en tejidos que se encuentran sometidos a un importante estrés mecánico, como es el caso del miocardio o de la piel. Están formados por cinco proteínas de tres familias distintas:

- Cadherinas
- Proteínas armadillo
- Plaquinias.

Las cadherinas son las desmocolininas (DSCs) y las desmogleínas (DSGs), las proteínas armadillo del desmosoma son las placoglobinas (PGs) y placofilinas (PKPs) y la proteína de la familia de las plaquinias es la desmoplaquina (DSP). Las cadherinas tienen un dominio extracelular que es el que interviene en la unión con las cadherinas de la célula adyacente (desmocolina con desmogleína y desmogleína con desmocolina). Estas proteínas tienen además un dominio intracelular que permite su anclaje a las proteínas de la familia armadillo (desmogleína con plakofilina y desmocolina con placoglobina) (Figura 1).

Las proteínas armadillo se anclan a la porción aminoterminal de la desmoplaquina. Finalmente, a través de su porción carboxiloterminial, la desmoplaquina se une a los filamentos intermedios (Garrod and Chidgey, 2008; Getsios et al., 2004; Kowalczyk and Green, 2013).

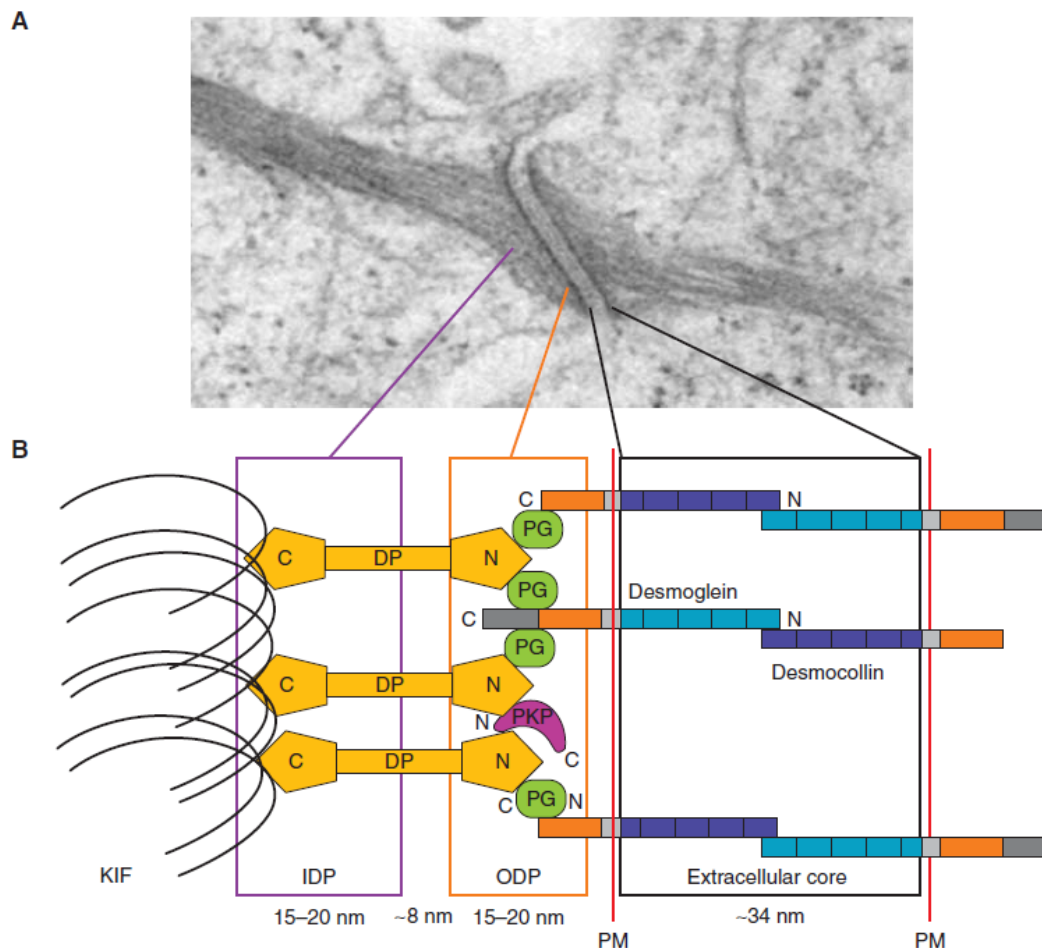


Figura 1. Modelo estructural del desmosoma. (A) Microscopía Electrónica de un desmosoma. (B) Esquema de las proteínas desmosómicas y su distancia relativa a la membrana plasmática (PM). Las cadherinas desmosómicas, las desmogleínas y desmocolinas se extienden en el núcleo y en la placa densa extracelular (ODP) para establecer contacto y adherirse a las células vecinas de manera dependiente de Ca^{2+} . Las colas citoplasmáticas de las cadherinas se asocian a proteínas de unión, placoglobina (PG), las placofilinas (PKP's) y desmoplaquina (DP). La DP une a los filamentos intermedios de queratina (KIF) dentro de la placa densa interna (IDP) uniéndolos de esta manera a la membrana plasmática. (Delva et al. 2009)

La función de los desmosomas es el anclaje de los filamentos intermedios de queratina del citoesqueleto en la epidermis, filamentos intermedios de desmina en el corazón y los filamentos intermedios de vimentina en las células de las meninges y las células dendríticas foliculares de los ganglios linfáticos, a la membrana celular (Green and Gaudry, 2000),

formando así una red transcelular con una alta resistencia a la tracción mecánica. Esto permite que las células mantengan su forma y que la lámina epitelial sea estable. Los desmosomas no solo proporcionan estabilidad celular, sino que además facilitan la comunicación celular a través de señales de transmisión.

1.1.1 Cadherinas desmosómicas

Las desmogleínas (DSG-1, DSG-2 y DSG-3) y desmocolinas (DSC-1, DSC-2 y DSC-3) son componentes transmembrana que unen células adyacentes y que están embebidas en las placas citoplasmáticas. Forman la línea media densa de los desmosomas maduros y comparten un 30% de aminoácidos idénticos entre sí y con las cadherinas clásicas (Garrod et al., 2002). Las cadherinas desmosómicas (Figura 2) están formadas por 5 repeticiones cadherina extracelulares que contienen sitios de unión a Ca^{2+} y sitios de reconocimiento de adhesión celular (RAC) (Runswick et al., 2001), muestran complejidad en el desarrollo y diferenciación de patrones específicos de expresión, lo que implica que los desmosomas en diferentes tejidos son bioquímica y funcionalmente distintos.

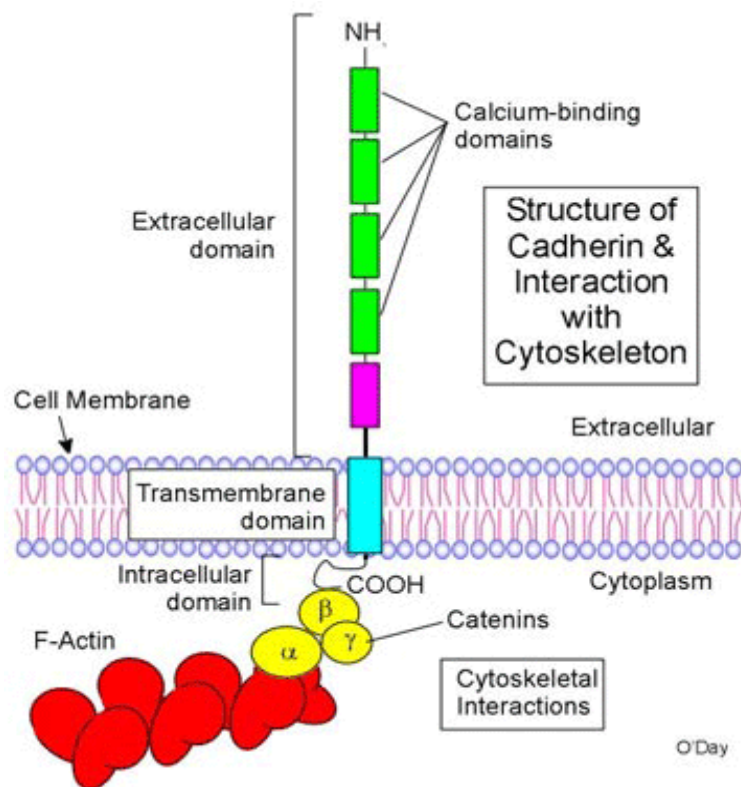


Figura 2. Estructura de las cadherinas desmosómicas e interacción con el citoesqueleto. Se observa el dominio transmembrana y el dominio extracelular con sitios de unión a calcio y sitio de reconocimiento de adhesión celular.

El papel de los patrones de expresión específica de tejido de las cadherinas desmosómicas no acaba de entenderse, pero la manipulación de estas cadherinas sugiere que la regulación estricta de su patrón de expresión es crítica para la homeostasis del tejido (Bannon et al., 2001). Dentro de la epidermis, estos genes son expresados diferencialmente como queratinocitos sometidos a una diferenciación terminal (Bannon et al., 2001;Kottke et al., 2006): DSG1 y DSC1 son fuertemente expresados en la capa granular y espinosa de la epidermis (King et al., 1995;North et al., 1996); DSG2 y DSC2 se expresan en todos los tejidos de soporte del desmosoma, representan las formas predominantes en epitelio simple (Legan et al., 1994;Schafer et al., 1996) y están mayormente expresados en la línea basal de la epidermis estratificada (Figura 3) (Garrod et al., 2002;North et al., 1996). La DSG4 se expresa principalmente en los folículos pilosos y se restringe a la capa granular del epitelio estratificado (Delva et al., 2009b). DSG1, DSG3, DSG4 y DSC1, se

expresan predominantemente en la epidermis, mientras que DSG2 y DSC2 están altamente expresadas en el miocardio (Li and Radice, 2010).

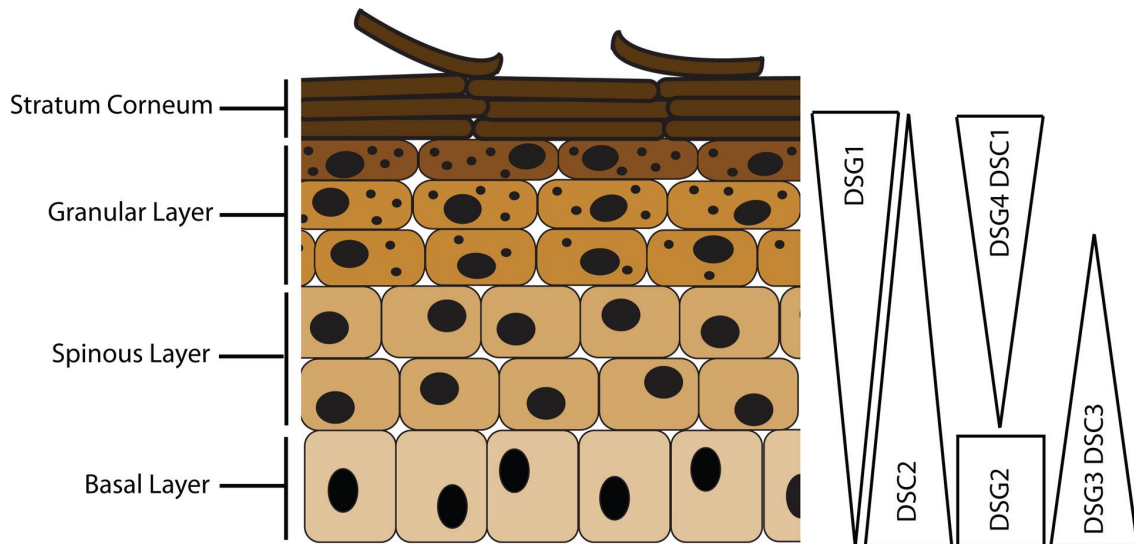


Figura 3. Expresión de las cadherinas desmosómicas en la epidermis. Esta figura ilustra la distribución diferencial y los niveles de expresión relativos de las cadherinas desmosómicas (DSCs y DSGs) en la epidermis. La ubicación y profundidad observadas en enfermedades como en el caso de “penphigus vulgaris” y “foliaceus reflect” reflejan esta distribución (Brooke et al., 2012).

1.1.2 Proteínas armadillo

Las PGs (también llamadas γ -cateninas) junto con las PKPs 1-3 (Hatzfeld, 2005;Hatzfeld, 2007) son proteínas con un importante papel en facilitar la adhesión de la desmoplaquina a los filamentos intermedios de queratina (Figura 4), en la regulación de la agrupación de los componentes desmosomales y en la mediación de importantes rutas de transducción de señales. Las PGs están formadas por 12 brazos repetidos que tienen un 65% de aminoácidos idénticos a la β -catenina, el equivalente de proteína asociada con las uniones adherens. El dominio armadillo central de la PG interactúa con la DSP que a su vez se une con filamentos intermedios a la placa desmosomal. La PG también se puede trasladar a uniones adherens y se unen a E-cadherinas de la misma manera que a las β -cateninas, pero su mayor afinidad por la DSP puede explicar por qué las PGs y no las β -cateninas están localizadas en los desmosomas (Choi et al., 2009).

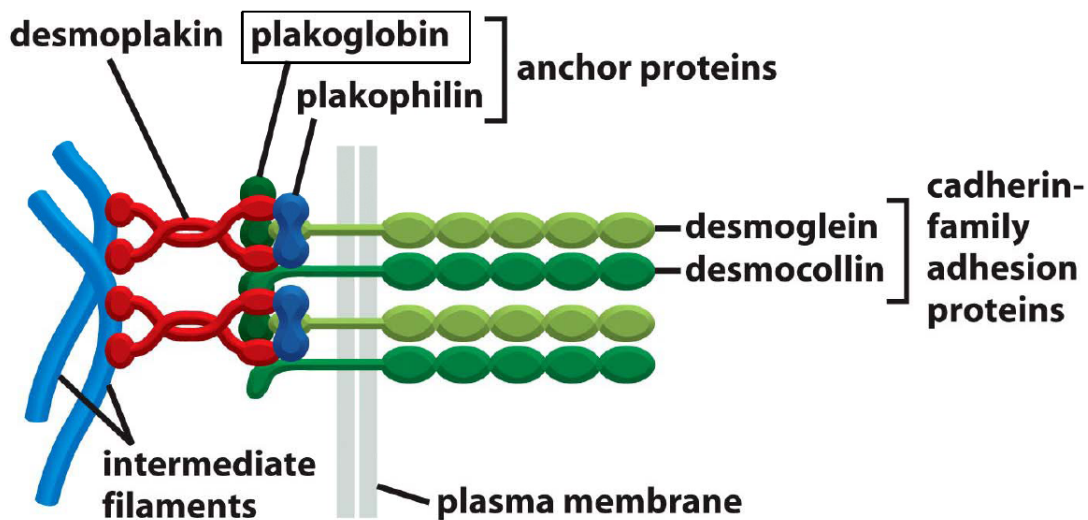


Figura 4: Uniones desmosomales. La proteína plakoglobina facilita la adhesión de la desmoplaquina a los filamentos intermedios (Urzua et al. 2009).

Aunque PKP1 y PKP2 se pueden localizar también en el núcleo, se encuentran predominantemente en los desmosomas (Delva et al., 2009b). Basándonos en el análisis de estudios estructurales, las PKP's contienen nueve dominios repetidos del brazo (Choi et al., 2009) con 21 aminoácidos adicionales añadidos a PKP1 y 44 aminoácidos añadidos a PKP2. Tanto PKP1 como PKP2 tienen dos isoformas: una isoforma corta "a" y una isoforma larga "b" (Mertens et al., 1996) siendo predominante la isoforma corta "a". Las PKPs muestran patrones de expresión específicos similares a los de las cadherinas desmosómicas. Se ha observado, que mientras que PKP3 se expresa en epitelio simple y en todos los tipos de epitelio estratificado, PKP1 se expresa mayormente en las capas suprabasales de epitelio estratificado y PKP2 se expresa mayormente en epitelio simple, en capas bajas de epitelio estratificado y en tejidos no epiteliales como es el caso del músculo cardiaco y los nódulos linfáticos (Bonne et al., 1999; Heid et al., 1994; Mertens et al., 1996; Mertens et al., 1999; Pieperhoff et al., 2010).

Las PKPs parece que juegan un papel importante en la agrupación de proteínas durante la formación de los desmosomas. El dominio N-terminal de la cabeza de la PKP1 se puede asociar con DSG1, PG, filamentos de actina y queratina y en última instancia con DSP, lo cual parece ser una asociación

fuerte y que hace que se reclute DSP en las uniones célula-célula (Hatzfeld et al., 2000; Hofmann et al., 2000; Kowalczyk et al., 1999; Wahl, 2005).

1.1.3 La familia de las plaquinas

La DSP, la más abundante de las proteínas desmosómicas, juega un papel clave en la unión entre la membrana plasmática y los filamentos intermedios de queratina (Delva et al., 2009b). La proteína tiende a formar homodímeros a través de un dominio α -helicoidal que a su vez interconecta con un dominio globular amino terminal, responsable de la unión con las PGs y PKPs, y un dominio carboxilo terminal, responsable de la fijación de los filamentos intermedios (Bornslaeger et al., 2001; Choi et al., 2002; Holthofer et al., 2007; Kowalczyk et al., 1994; Yin and Green, 2004) (Figura 5A). Hasta hace poco solamente se conocían dos isoformas de DSP (DSP1 y DSP2). Al igual que las isoformas “a” y “b” de las desmocolinas, las isoformas DSP1 y DSP2 se producen como resultado de un *splicing* alternativo de ARNm, siendo la isoforma DSP2 la más corta (Figura 5B). Ambas formas son extensamente expresadas en numerosos tejidos, aunque la expresión de la isoforma 2 se encuentra ausente/reducida en el corazón y en otros epitelios simples (Angst et al., 1990). Otra isoforma derivada de la isoforma 1, llamada DSP1 α producida por el *splicing* alternativo de ARNm de DSP1, ha sido descrita recientemente y se detecta en niveles más bajos que las isoformas predominantes, aunque presenta una distribución tisular semejante (Cabral et al., 2010).

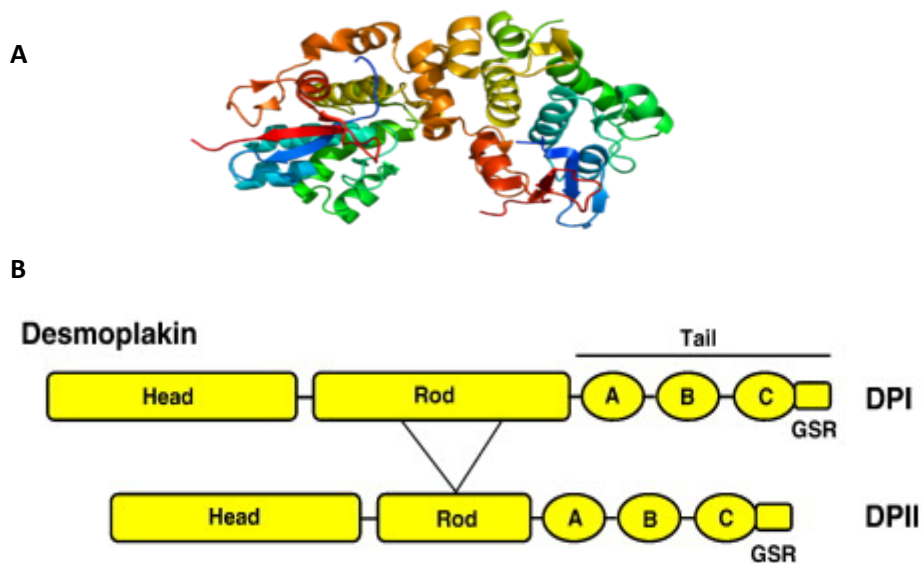


Figura 5. 5A Disposición helicoidal de la proteína desmoplaquina. 5B Subunidades de la DSP1 y DSP2 (Delva et al., 2009a).

Franke *et al* observaron mediante inmunomarcaje, que en músculo cardiaco normal, la DSP está localizada en todas las placas desmosomales y en las uniones tipo “fascia-adherens”, con una señal muy intensa dentro de las uniones de tipo desmosoma (Franke et al., 2007). Varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, confirman la importancia de la DSP en el ensamblaje y función de los desmosomas y muestran que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la epidermis, el neuroepitelio, el corazón y la sangre (Gallicano et al., 2001; Vasioukhin et al., 2001).

2. ALTERACIONES CARDIACAS HEREDITARIAS.

En los últimos años se han conseguido importantes progresos en la identificación de las causas genéticas de las miocardiopatías, lo que a su vez ha permitido una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a cada patología. Este progreso también ha aumentado la probabilidad de establecer diagnósticos genéticos específicos proporcionando así nuevas oportunidades a los profesionales, los pacientes y las familias para utilizar esta información genética (Hershberger et al., 2009).

Al considerar si un paciente puede tener una miocardiopatía, el enfoque se orienta sobre todo por el fenotipo del paciente (signos clínicos). Estas características clínicas incluyen datos cardiovasculares tales como los

derivados de los estudios ecocardiográficos (tamaño ventricular, función, espesor de la pared y movimiento de la pared) y resultados electrocardiográficos (ECG). Otros estudios con técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN), que ofrece una imagen de mayor resolución, también pueden ayudar en la evaluación de una miocardiopatía. Una historia clínica detallada (incluyendo la edad de inicio y el tipo de síntoma), un examen físico (para descartar una enfermedad sindrómica) y un historial de 3-4 generaciones de la familia son también importantes. Esta información fenotípica acumulativa lleva a la asignación de un diagnóstico de miocardiopatía específica (Hershberger et al., 2009).

Aunque la mayoría de las miocardiopatías genéticas solo implican al corazón, establecer un diagnóstico basado en el fenotipo, a veces requiere el reconocimiento de características clave de formas sindrómicas. Un síndrome es un patrón recurrente de defectos que más probablemente representa una sola etiología. En la mayoría de los casos de enfermedad cardiovascular sindrómica están involucrados varios tejidos y/u órganos, por esto, el cardiólogo debe estar alerta para detectar signos y síntomas más allá del sistema cardiovascular. Por ejemplo, el síndrome de Noonan puede estar asociado con cuatro genes y se presenta con hipertrofia cardiaca, baja estatura, grados variables de retraso en el desarrollo y características dismórficas.

Hay ocasiones, en las que distintas mutaciones en el mismo gen (heterogeneidad alélica) pueden dar lugar a fenotipos prácticamente idénticos o por el contrario, fenotipos muy diferentes. Un claro ejemplo lo encontramos en mutaciones del gen de la lamina (LMNA), que dan lugar a múltiples fenotipos, conocidos comúnmente como laminopatías. En los trastornos alélicos de la LMNA se incluye la miocardiopatía dilatada (MCD) aislada, síndromes en los que puede estar implicada la MCD (como por ejemplo la distrofia muscular de Emery-Dreifuss) o trastornos no asociados con la MCD (como por ejemplo la lipodistrofia).

2.1 Implicación desmosomal en las miocardiopatías

La complejidad y la falta relativa de conocimiento de cómo los componentes desmosomales se interrelacionan entre sí y con otros compartimentos en un modelo celular así como su diferenciación, es reflejada por la serie de trastornos genéticos que surgen de mutaciones que afectan a los genes desmosómicos. En el gran número de publicaciones que describen las diversas alteraciones que afectan a todos los genes desmosómicos destacan la gran heterogeneidad fenotípica; las diferentes mutaciones han dado lugar a diferentes trastornos cardíacos y/o cutáneos (tanto con, cómo sin implicación del cabello).

Una de las alteraciones que tiene lugar como consecuencia de mutaciones desmosomales es la miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (MAVD), trastorno hereditario asociado con arritmias y muerte súbita (MS) cardíaca, caracterizada por el reemplazo fibroadiposo de los miocitos cardíacos. Además existen otras patologías cardíacas con las que se relacionan las mutaciones en los genes desmosómicos tales como Miocardiopatía Arritmogénica con afectación del Ventrículo Izquierdo (MAVI) y la MCD.

3. MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DEL VENTRÍCULO DERECHO

3.1 Antecedentes históricos

La primera descripción histórica de la MAVD fue en el libro *De Motu Cordis Aneurysmatibus* publicado en 1736 por Giovanni Maria Lancisi, médico del Papa y profesor de Anatomía en Roma (Figura 6). Lancisi informó sobre una familia con una enfermedad recurrente en cuatro generaciones. Los síntomas incluían palpitaciones, fallo cardíaco, dilatación y aneurismas del ventrículo derecho (VD), además de MS. En 1961, casos con contracciones fuertes de la aurícula derecha, de la curva de presión del VD y la patología no isquémica del VD fueron publicados (Dalla et al., 1961). Sin embargo, la primera descripción clínica exhaustiva de la enfermedad fue publicada en 1982 en adultos con taquiarritmias ventriculares con morfología de bloqueo de rama izquierda (Marcus et al., 1982). Las características electrocardiográficas de la enfermedad, incluida la característica onda epsilon, fueron descritas por

primera vez en 1984 (Fontaine et al., 1984). Desde entonces, esta enfermedad ha sido clasificada como una causa importante de MS en jóvenes y atletas (Thiene et al., 1988).

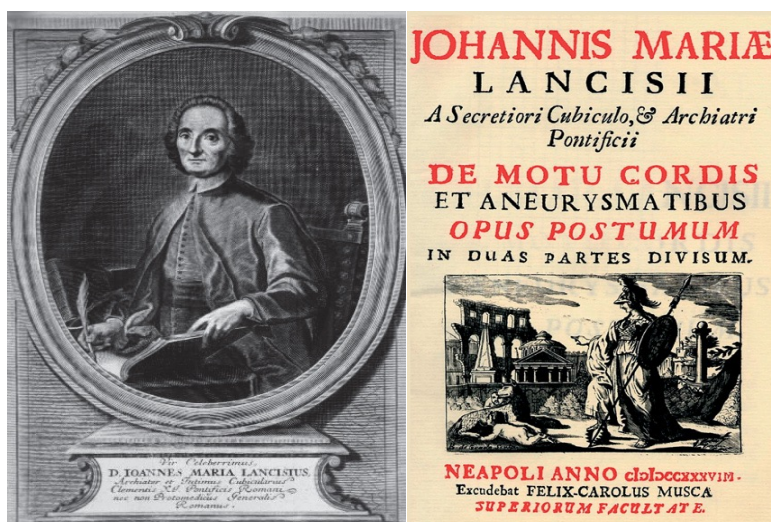


Figura 6. Primera descripción de la miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho. Del libro *De Motu Cordis et Aneurysmatibus* publicado en 1736 por Giovanni Maria Lancisi (Cortesía de Arnold Katz).

3.2 Etiología

Una de las enfermedades hereditarias relacionadas con las variaciones encontradas en los genes desmosómicos es la MAVD, enfermedad primaria del músculo cardíaco con una prevalencia que oscila entre 1/1000-5000 habitantes/año. Los estudios realizados muestran que entre la población de menores de 35 años la incidencia de MS se sitúa en 1-5 casos por cada 100.000 habitantes/año, siendo la MAVD una causa frecuente donde además, la práctica deportiva parece aumentar el riesgo de MS hasta en cinco veces (Corrado, D. 2003). En muchas ocasiones la MS es la manifestación clínica inicial de la enfermedad. Además, parece que ésta es más frecuente en jóvenes entre la segunda y cuarta década de la vida (Quarta, G. 2011). Un estudio analizó las circunstancias en las que se produjo la MS en una serie de 200 pacientes afectados de MAVD. El 75% de las muertes se produjeron durante actividades cotidianas y sedentarias mientras que solamente el 3,5% de los fallecimientos se produjeron durante la práctica de actividades deportivas (Tabib et al., 2003).

Durante los últimos años se han propuesto varias teorías para explicar el origen de la MAVD. Desde las primeras teorías que abogaban por una alteración en la formación del músculo cardíaco (hipoplasia o displasia), han surgido otras teorías que enfatizan el papel que desempeñan las alteraciones de los desmosomas cardíacos en el proceso de degeneración de los cardiomiocitos (Basso, C. 2010; Marcus, F. 2007).

Teoría inflamatoria:

Se han realizado varios estudios para analizar la presencia de material genético de virus cardiotropos (enterovirus y coxsackievirus tipo B, parvovirus B19, virus hepatitis C y citomegalovirus) en biopsias de músculo cardíaco, obteniéndose resultados discrepantes (Calabrese et al., 2000; Calabrese et al., 2006; Heim et al., 1997; Matsumori, 2006; Thiene et al., 2005). Según esta teoría, el papel de los virus en la etiopatogenia de la MAVD se explicaría por una doble vía:

- Daño genético directo al incluirse el material genético del virus en ADN huésped: se originarían mutaciones puntuales, translocaciones cromosómicas e inserciones que provocarían la muerte del miocardiocito.
- Individuos susceptibles genéticamente a sufrir la infección vírica por virus cardiotropos, sufrirían la infección y posteriormente la apoptosis de las células cardíacas (Calabrese et al., 2006).

Teoría de la apoptosis:

Diversos estudios realizados en muestras de miocardio de pacientes diagnosticados de MAVD han mostrado apoptosis cardíaca (Calabrese et al., 2006; Thiene and Basso, 2006). Esta teoría se basaría en que la muerte celular programada sería el paso previo a la sustitución por tejido.

Teoría de la transdiferenciación miocárdica:

Esta teoría tiene su origen en un estudio publicado en el año 2006. Los autores utilizaron un modelo murino sobre el cual, demostraron que la supresión de la DSP en tejido auricular, producía una translocación del gen que codifica para PG (JUP) al núcleo celular y esto se relacionaba con una

reducción en la expresión de Wnt/ β -catenina (vía de señalización celular que juega un papel decisivo en procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular), lo que favorece la transdiferenciación de mioblastos a adipocitos y fibroblastos (Garcia-Gras et al., 2006; Ashimaki et al. año?).

3.3 Fisiopatología de la enfermedad

La MAVD tiene como característica histológica principal el reemplazo fibroadiposo. La sustitución del tejido se realiza desde el epicardio al endocardio y afecta preferentemente al VD, aunque como se comentará más adelante, la afectación del ventrículo izquierdo (VI) puede encontrarse hasta en más de la mitad de los casos. Se han realizado estudios multicéntricos en los que tras analizar 42 corazones con diagnóstico histológico de la enfermedad se encontró afectación biventricular en el 76% de ellos, hallazgo relacionado con una mayor severidad clínica de la enfermedad (Corrado et al., 1997).

Normalmente el VD se encuentra dilatado y la sustitución fibroadiposa se inicia en el conocido como triángulo de la displasia (Figura 7A), que es la zona situada entre el tracto de entrada, el ápex y el tracto de salida del VD. El septo interventricular solamente se encuentra afectado en un 20% de los casos (Basso et al., 1996; Thiene et al., 2012).

Macroscópicamente podemos observar un VD con una coloración blanco-amarillenta debido a la sustitución fibroadiposa (Figura 7B). La pared libre del VD se encuentra adelgazada y pueden aparecer aneurismas sobre las que en ocasiones pueden formarse trombos que pueden ser fuente de tromboembolismos.

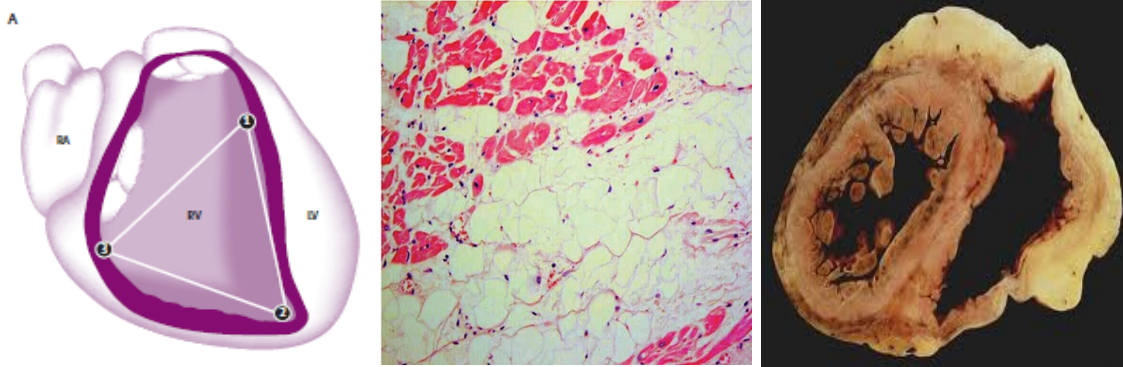


Figura 7: (A) Triángulo de la Displasia Arritmogénica de Ventriculo Derecho en el que se observan las regiones del ventrículo derecho que se afectan de forma predominante en esta enfermedad. RA= aurícula derecha; RV= ventrículo derecho; LV= ventrículo izquierdo. (B) Visión micro y macroscópica (de izquierda a derecha) del color típico del corazón por la sustitución fibroadiposa (Revista Española de Cardiología).

El estudio histológico es de gran ayuda para el diagnóstico. En muchas ocasiones nos podemos encontrar en la necropsia con un corazón macroscópicamente normal pero con hallazgos característicos en el estudio microscópico. Es de vital importancia conocer estas alteraciones para evitar infradiagnosticar la enfermedad en la necropsia de un caso de MS. Característicamente podemos encontrar sustitución por tejido fibroso y adiposo con infiltrados inflamatorios reactivos asociados (Figura 8). Entre este tejido podemos encontrar islotes de miocardiocitos sanos y apoptóticos. Este sustrato anatómico que es inestable desde el punto de vista electrofisiológico es ideal para la génesis de arritmias cardiacas, que son la principal causa de muerte de la enfermedad. En diferentes series de casos se han descrito infiltrados inflamatorios parcheados en un porcentaje que oscila entre el 69% y el 74% (Basso et al., 1996; Burke et al., 1998; Fornes et al., 1998) con un predominio de linfocitos T CD8, CD43; CD45RO y macrófagos.

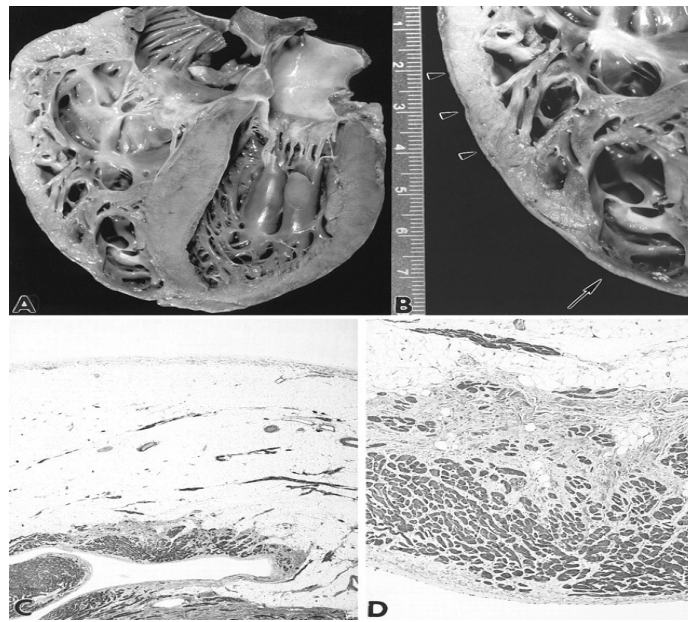


Figura 8: Sustitución fibroadiposa en la MAVD. A: Dilatación marcada del ventrículo derecho. El paciente fue un niño de 13 años de edad que murió de forma súbita sin antecedentes de arritmias familiares. B: Con un mayor aumento se muestra aneurisma apical de miocardio caracterizada por adelgazamiento (flecha) y graves infiltraciones de grasa (puntas de flecha). C: Histológicamente el área de infiltración grasa mostró predominantemente grasa. D: Aumento de C mostrando además de grasa, tejido fibroso. Burke AP et al. *Circulation* 1998; 97: 1571-1580.

3.4 Clínica de la enfermedad

La MAVD suele expresarse en la adolescencia y antes de la cuarta década de la vida. Afecta más a hombres que a mujeres y la prevalencia varía según la región geográfica que se considere. Así, en Véneto (Italia), la enfermedad puede ser tan prevalente como 1 en 2000, y constituye la principal causa de MS en deportistas, a diferencia de lo que ocurre en los EEUU de América donde se ubica por detrás de la miocardiopatía hipertrófica. Las manifestaciones clínicas son muy variables. Con frecuencia es un hallazgo casi fortuito y en ocasiones su primera exteriorización es el paro cardíaco, casi invariablemente debido a la taquicardia/fibrilación ventricular. Las arritmias ventriculares, que son tan frecuentes y le dan el nombre a la enfermedad, varían desde la simple extrasistolia ventricular hasta la taquicardia o la fibrilación ventricular. Las taquiarritmias supraventriculares, extrasístoles o fibrilación auricular, son también frecuentes. La MS predomina durante el esfuerzo, aunque se han descrito casos de muerte durante el sueño. En esta

enfermedad se describe un desequilibrio en la inervación adrenérgica como posible factor contribuyente en la génesis de las arritmias (review Gastón Albina y Col).

La dilatación ventricular y la presencia de insuficiencia cardiaca derecha suelen observarse en adultos y ancianos (Corrado et al., 1990;Fornes et al., 1998;Peters et al., 1999).

En la evolución natural de la MAVD pueden reconocerse cuatro estadios. La fase inicial es silente, asintomática (aunque puede deparar en la MS). En la segunda fase aparecen las arritmias ventriculares, en la siguiente se instalan la dilatación ventricular con signos de insuficiencia cardíaca derecha y en el estadio final ya existe dilatación biventricular, indistinguible de la miocardiopatía dilatada, cuyas complicaciones principales son la fibrilación auricular y la tromboembolia.

A pesar de ser principalmente una enfermedad del VD, el VI puede también estar involucrado y las manifestaciones de estar afectado a veces pueden preceder a las del VD (Sen-Chowdhry et al., 2007b) o incluso ser la principal característica de presentación de la patología (Kies et al., 2006). Se recomienda el estudio de la historia familiar (McKenna et al., 1994;Morales et al., 2008;Sen-Chowdhry et al., 2004), sin embargo, dada la baja penetrancia y la variabilidad clínica así como la posibilidad de una MAVD no sindrómica autosómica recesiva, la ausencia de enfermedad familiar no descarta el riesgo genético. Debido a esto se recomienda el screening clínico de los familiares de primer grado.

3.5 Diagnóstico de la MAVD

En el año 1994 la Sociedad Europea de Cardiología y el Consejo Científico de Miocardiopatías de la Sociedad Internacional de Cardiología publicaron los primeros criterios diagnósticos de la enfermedad. Los criterios analizados incluían alteraciones estructurales en pruebas de imagen, anomalías electrocardiográficas, alteraciones anatomopatológicas y antecedentes familiares de la enfermedad (McKenna et al., 1994) (Tabla 1).

Si bien estos criterios eran bastante específicos de la enfermedad, la sensibilidad de los mismos era bastante menor, sobre todo en las formas

iniciales de la enfermedad y en aquellos sujetos con una expresividad clínica menor. Ante la necesidad de ampliar los criterios diagnósticos, en el año 2002 se publicó una modificación de los criterios para la evaluación diagnóstica de los familiares de primer grado de los sujetos afectados (Hamid et al., 2002; Marcus et al., 2010). Desde ese año, nuevas investigaciones han profundizado en el conocimiento de la enfermedad. Campos de gran interés como las bases genéticas de la enfermedad, el carácter familiar de la misma y la aparición de nuevos parámetros electrocardiográficos llevaron a la *American Heart Association* a realizar una revisión de criterios diagnósticos vigentes en el año 2010. Varios estudios han mostrado una mayor sensibilidad diagnóstica de los nuevos criterios diagnósticos (Protonotarios et al., 2011) (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios diagnósticos Task Force de 2010 (Revista Española de Cardiología)

<i>I. Disfunción y alteraciones estructurales globales o regionales</i>	
Mayores	En el ecocardiograma bidimensional: acinesia, discinesia o aneurisma regionales del VD y 1 de las siguientes (en telediástole):• PELP TSVD ≥ 32 mm (corregido por tamaño corporal [PELP/ASC] ≥ 19 mm/m ²)• PECP TSVD ≥ 36 mm (corregido por tamaño corporal [PECP/ASC] ≥ 21 mm/m ²)• o cambio del área fraccional $\geq 33\%$
	En la RM: acinesia o discinesia regionales del VD o contracción disincrónica del VD y 1 de las siguientes:• Cociente de volumen telediastólico del VD respecto a ASC ≥ 110 ml/m ² (varones) o ≥ 100 ml/m ² (mujeres)• O fracción de eyección del VD $\leq 40\%$
	En la angiografía del VD: acinesia, discinesia o aneurisma regionales del VD
Menores	En el ecocardiograma bidimensional: acinesia o discinesia regionales del VD y 1 de las siguientes (en el periodo telediastólico):• PELP TSVD ≥ 29 a < 32 mm (corregido por tamaño corporal [PELP/ASC] ≥ 16 a < 19 mm/m ²)• PECP TSVD ≥ 32 a < 36 mm (corregido por tamaño corporal [PECP/ASC] ≥ 18 a < 21 mm/m ²)• O cambio del área fraccional > 33 a $\leq 40\%$
	En la RM: acinesia o discinesia regionales del VD o contracción disincrónica del VD y 1 de las siguientes:• Cociente de volumen telediastólico del VD respecto a ASC ≥ 100 a < 110 ml/m ² (varones) o ≥ 90 a < 100 ml/m ² (mujeres)• O fracción de eyección del VD > 40 a $\leq 45\%$
<i>II. Caracterización del tejido de la pared</i>	
Mayores	Miocitos residuales $< 60\%$ mediante análisis morfométrico (o $< 50\%$ si se han estimado), con sustitución fibrosa del miocardio de la pared libre del VD en al menos una muestra, con o sin sustitución adiposa del tejido en la biopsia endomiocárdica
Menores	Miocitos residuales del 60 al 75% mediante análisis morfométrico (o del 50 al 65% si se han estimado), con sustitución fibrosa del miocardio de la pared libre del VD en al menos una muestra, con o sin sustitución adiposa del tejido en la biopsia endomiocárdica
<i>III. Anomalías de la repolarización</i>	
Mayores	Ondas T invertidas en las derivaciones precordiales derechas (V ₁ , V ₂ y V ₃) o más allá en individuos de edad > 14 años (en ausencia de BRDH con QRS ≥ 120 ms)
Menores	Ondas T invertidas en las derivaciones V ₁ y V ₂ en individuos de edad > 14 años (en ausencia de BRDH completo) o en V ₄ , V ₅ o V ₆ Ondas T invertidas en las derivaciones V ₁ , V ₂ , V ₃ y V ₄ en individuos de edad > 14 años en presencia de un BRDH completo

<i>IV. Anomalías de despolarización/conducción</i>	
Mayores	Onda épsilon (señales de baja amplitud reproducibles entre el final del complejo QRS y el inicio de la onda T) en las derivaciones precordiales derechas (V ₁ a V ₃)
Menores	Potenciales tardíos mediante SAECG en al menos uno de tres parámetros, en ausencia de una duración del QRS ≥ 110 ms en el ECG estándar: duración del QRS filtrado ≥ 114 ms; duración del QRS terminal < 40 μV (duración de señal de baja amplitud) ≥ 38 ms; raíz de la media cuadrados de los voltajes de los 40 ms terminales ≤ 20 μV Duración de la activación terminal del QRS ≥ 55 ms medida desde el mínimo de la onda S hasta el final del QRS, incluyendo R', en V ₁ , V ₂ o V ₃ , en ausencia de BRDH completo
<i>V. Arritmias</i>	
Mayores	Taquicardia ventricular no sostenida o sostenida con morfología de BRIH con eje superior (QRS negativo o indeterminado en las derivaciones II, III, aVF; y positivo en aVL)
Menores	Taquicardia ventricular no sostenida o sostenida de configuración de TSVD, con morfología de BRIH con eje inferior (QRS positivo en las derivaciones II, III y aVF y negativo en aVL) o de eje desconocido > 500 extrasístoles ventriculares por 24 h (Holter)
<i>VI. Antecedentes familiares</i>	
Mayores	M/DAVD confirmada en un familiar de primer grado que cumpla los criterios actuales de la <i>Task Force</i> M/DAVD confirmada anatomopatológicamente en la autopsia o la intervención quirúrgica en un familiar de primer grado Identificación de una mutación patogénica * clasificada como asociada o probablemente asociada a la M/DAVD en el paciente examinado
Menores	Antecedentes de M/DAVD en un familiar de primer grado en el que no es factible determinar si cumple los criterios actuales de la <i>Task Force</i> Muerte súbita prematura (< 35 años de edad) debida a presunta M/DAVD en un familiar de primer grado M/DAVD confirmada anatomopatológicamente o mediante los criterios actuales de la <i>Task Force</i> en un familiar de segundo grado

Para el diagnóstico de la enfermedad son necesarios dos criterios mayores de distinta categoría o un criterio mayor y dos criterios menores.

3.6 Relación de la patología del desmosoma con la MAVD

3.6.1 Síndromes cardiocutáneos

En el año 1986 se describió por primera vez un síndrome descubierto en varias familias de la isla griega de Naxos, Este síndrome, conocido como síndrome de Naxos engloba la triada de queratosis palmoplantar no epidermolítica, pelo lanoso y MAVD. Sigue un patrón de herencia autosómico recesivo y fue asociado a una mutación en el gen de la placoglobina (JUP), que origina una delección que tiene como resultado el truncamiento de la proteína (Antoniades et al., 2006;McKoy et al., 2000a). Las manifestaciones epidérmicas en los pacientes de Naxos no son tan severas como las que fueron observadas en ratones con PG nula (Kottke et al., 2006). También se ha descrito otro síndrome que engloba la presencia de pelo lanoso, queratosis palmoplantar y miocardiopatía arritmogénica con afectación predominante del VI. Este síndrome conocido como síndrome de Carvajal sigue una herencia autosómica recesiva y se asocia a mutaciones en el gen de la desmoplaquina (DSP) (Figura 9).

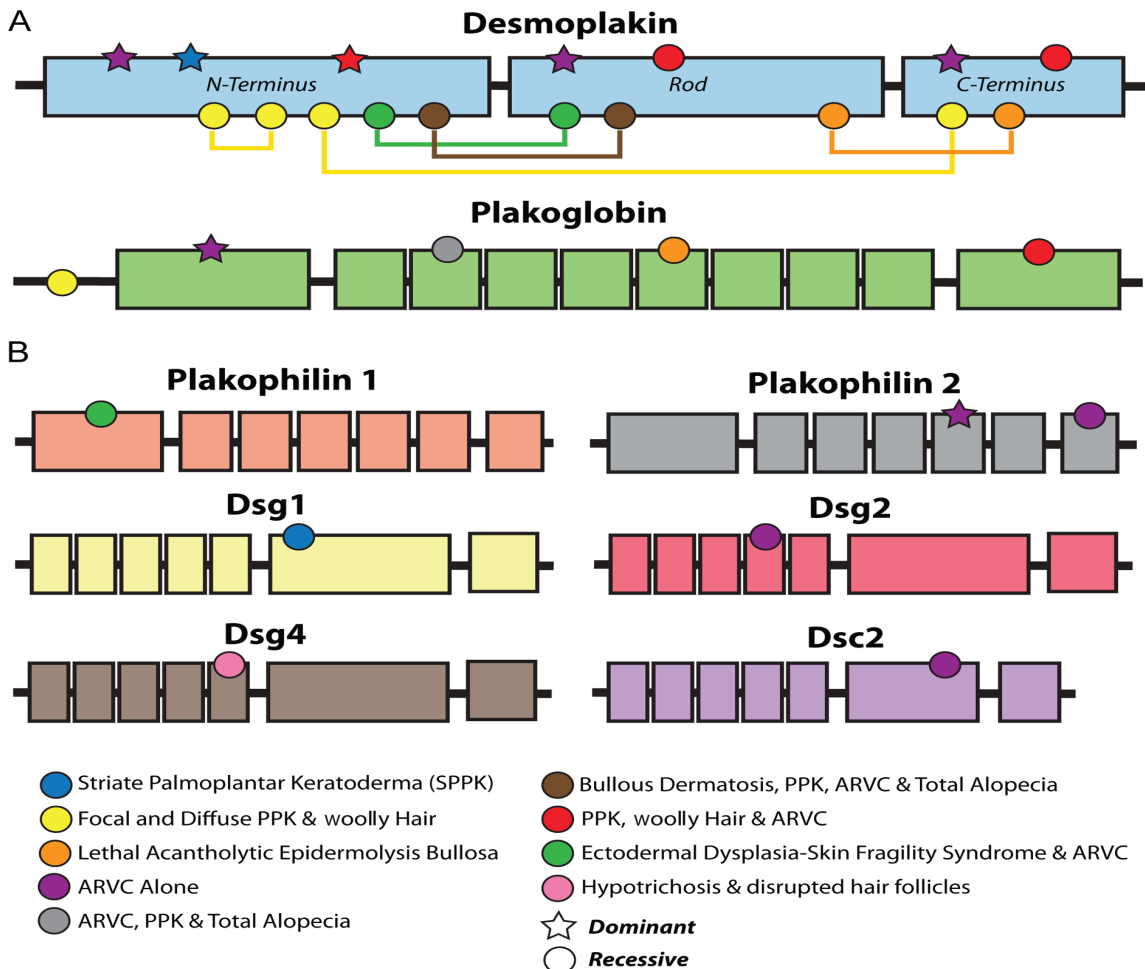


Figura 9. Relación de las proteínas desmosómicas con los diferentes tipos de síndromes y patologías de los que son responsables.

El descubrimiento de estos síndromes cardiocutáneos pone de manifiesto la importancia de la patología del desmosoma en la génesis de la enfermedad, pues la piel y el miocardio son dos tejidos en los que existen gran cantidad de desmosomas. Sin embargo, la inmensa mayoría de los casos de MAVD no se relacionan con estos síndromes y la mayoría de mutaciones en la proteínas desmosómicas relacionadas con la enfermedad siguen un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta (Sen-Chowdhry et al., 2007a).

3.6.2 Desmosomopatías y génesis de la MAVD/I. Genética molecular.

Las tres estructuras involucradas en la adhesión célula-célula del miocardio son los *desmosomas*, las *uniones adherens* y las *uniones gap*. A pesar que las modificaciones genéticas de cualquiera de estas tres estructuras podrían inducir MAVD, solo las mutaciones en los genes que codifican a las

proteínas desmosómicas se han asociado con esta patología. Además de los genes desmosómicos, hay hasta 7 proteínas que también se relacionan con la patología y que son la desmina (DES), la proteína transmembrana 43 (TMEM 43), la titina (TTN), el fosfolamban (PLN), el factor transformador de crecimiento β 3 (TGFB \cdot), la lamina (LMNA) y la α -Tcatenina (CTNNA 3) (Tabla 2). Hasta la fecha se han identificado más de 800 variantes en 12 genes de las que 300 han sido identificadas como perjudiciales y responsables del 60-65% de todos los casos de MAVD (van der Zwaag et al., 2009a). La mayoría de las mutaciones patogénicas se han identificado en los genes que codifican para las proteínas de los desmosomas, siendo la PKP2 responsable del 35-40% de los casos. Las mutaciones en los genes DSP, DSC2 y DSG2 son los responsables de casi el 15-20% de los casos de MAVD (Bauce et al., 2011; Christensen et al., 2010; Kapplinger et al., 2011).

Tabla 2: Genes asociados con la MAVD. Campuzano O, et al.

Gen	Locus	HMH	ID Gen	Proteína	Herencia
CTNNA3	10q21.3	607667	29119	A-T-Catenina	AD
DES	2q35	125660	1674	Desmina	AD
DSC2	18q21	125645	1824	Desmocolina-2	AD
DSG2	18q12.1	125671	1829	Desmogleina-2	AD/AR
DSP	6p24	125647	1832	Desmoplaquina	AD/AR
JUP	17q21	173325	3728	Placoglobina	AD/AR
LMNA	1q22	150330	4000	Lamina A/C	AD
PKP2	12p11	609040	5318	Placofilina-2	AD/AR
PLN	6q22.1	172405	5350	Fosfolambán	AD
TGFB3	14q24.3	190230	7043	Factor Transf. Crec.β3	AD
TMEM43	3p25.1	612048	79188	Prot. Transmembr 43	AD
TTN	2q31.2	188840	7273	Titina	AD

AD: Autosómica Dominante; AR: Autosómica Recesiva; HMH: Herencia Mendeliana en humano.

1. PKP2

La forma más frecuente de MAVD es causada por mutaciones en el gen de la PKP2 (ENSG00000057294). Gerull *et al.* sugiere que la ausencia y/o alteración de la estructura de la PKP2 (Figura 10A) en los desmosomas cardiacos afecta a las interacciones miocito-miocito, induciendo la interrupción del miocardio, en particular en respuesta a la tensión mecánica. Por lo tanto, ésto puede ser una explicación plausible de por qué el ejercicio es un inductor principal de taquiarritmias ventriculares y MS cardiaca. Hasta la fecha se han identificado más de 150 mutaciones en este gen, haciendo que sea el principal responsable de la enfermedad. Las variaciones más frecuentes en PKP2 corresponden a pequeñas deleciones/inserciones con un patrón *frameshift* o cambio en el marco de lectura (40%) (van der Zwaag et al., 2009a) seguidas de

mutaciones *nonsense* o sin sentido en un 25% de los casos, variantes *missense* o de sentido erróneo o alterado en un 20% y mutaciones que afectan al *splicing* o al corte y empalme en un 15%. La mayoría de las mutaciones asociadas a MAVD del gen PKP2 tienen un patrón de herencia autosómico dominante, aunque en 2006 también se describió una forma recesiva (Awad et al., 2006) que fue una delección de 7 pares de bases que se declaró como silente. Aunque el resto de los casos de MAVD pueden ser debidos a mutaciones patogénicas dentro de otros genes no descubiertos hasta la fecha, existe la alternativa de la presencia de grandes inserciones/delecciones en genes conocidos que no se pueden detectar por secuenciación convencional (Sanger). Recientemente, Roberts *et al.* publicaron dos casos en los que el desarrollo de la MAVD eran debidos a grandes delecciones genómicas en el gen PKP2 (Roberts et al., 2013).

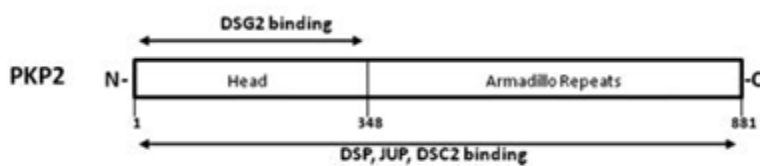


Figura 10A. Características estructurales del gen PKP2. Extremos N-terminal y C-terminal.

2. DSP

La desmoplaquina es la proteína más abundante de los desmosomas, está codificada por el gen DSP (ENSG00000096696) (Figura 10 B) y tiene dos isoformas generadas por *splicing* alternativo. La isoforma I de esta proteína es el constituyente más fuerte de los desmosomas y la principal isoforma presente en el tejido cardíaco, aunque la expresión de la isoforma II tiene lugar en varios compartimentos del corazón (Uzumcu et al., 2006).

El primer informe sobre una variación patogénica en el gen DSP asociada a MAVD fue publicada en 2002 (Rampazzo et al., 2002). Años después Yang *et al.* desarrollaron in vivo e in vitro el análisis de proteínas DSP mutantes, mostrando la interrupción de la interacción DSP-DES en los discos intercalares y marcados cambios ultraestructurales. Así, los resultados sugerían que la expresión de DSP en los cardiomiocitos es crucial para el

mantenimiento de la integridad del tejido cardiaco y que las anomalías en la proteína conducen a la muerte del cardiomiocito, cambios en el metabolismo lipídico y defectos en el desarrollo cardiaco. Se han asociado a la MAVD cerca de 100 variantes en el gen DSP. En total, el 40% son variantes *missense*, el 30% variantes *nonsense* y el resto son pequeñas inserciones/deleciones y en la zona de *splicing* (Rampazzo et al., 2002; van der Zwaag et al., 2009a).

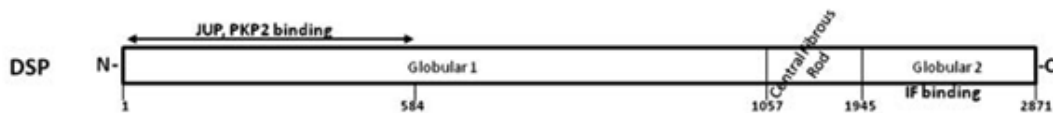


Figura 10B. Características estructurales del gen DSP. Extremos N-terminal y C-terminal.

3. DSC2 y DSG2

La desmocolina y la desmogleína son los mayores constituyentes de la placa desmosoma y ambas participan en la unión celular calcio-dependiente, en la regulación de la morfogénesis tisular y en procesos de señalización intracelular (Saito et al., 2012) (Figura 10C). El gen DSC2 tiene 17 exones con un rango de tamaño que va desde las 46 a las 258 pares de bases y que se extiende por más de 32 Kb de ADN. El exón 16 es empalmado alternativamente dando lugar a las isoformas α y β de la proteína. El gen DSC2 humano (ENSG00000134755) codifica la forma de la proteína más ampliamente distribuida. En 2006, Heuser *et al.* publicaron las primeras mutaciones del gen DSC2 en humanos afectados por MAVD. Además, establecieron los niveles fisiológicos de la proteína esenciales para la formación de los desmosomas cardiacos, así como para la morfogénesis temprana y función cardiaca. Hasta la fecha, han sido descritas menos de 50 mutaciones patogénicas en DSC2 asociadas a MAVD, de las que un 50% son *missense* y el resto son mutaciones *nonsense* y pequeñas deleciones/inserciones que inducen a variaciones *frameshift*. Además se han identificado 4 variantes en sitio de *splicing* en el gen DSC2 en casos de MAVD que cumplen los criterios diagnósticos “*Task Force Criteria*” (van der Zwaag et al., 2009b).

DSG2 (ENSP00000261590) codifica para la única isoforma de la proteína desmogleína que se expresa en los cardiomiocitos. En 2006, dos informes asociaron mutaciones en el gen DSG2 con MAVD (Pilichou et al., 2006). Desde entonces, se han asociado más de 50 variantes patogénicas con MAVD. De ellas, alrededor de un 60% son *missense*, un 20% corresponde a deleciones/inserciones y otro 20% a sitios de *splicing* (van der Zwaag et al., 2009b).

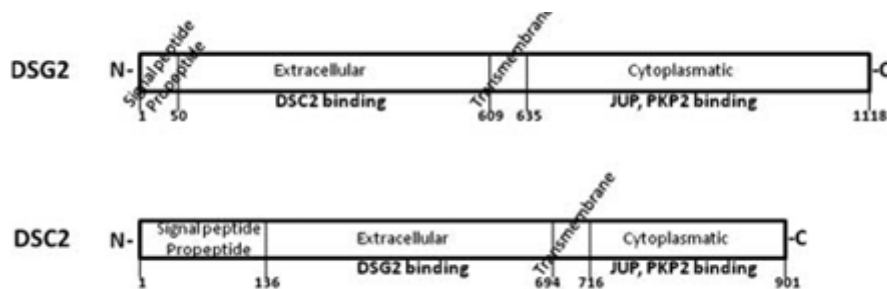


Figura 10 C. Características estructurales de los genes DSG2 y DSC2. Extremos N-terminal y C-terminal.

4. JUP

La placoglobina (PG) es el componente más importante de las uniones de adhesión celular y además forma complejos con cadherinas y cadherinas desmosómicas, siendo miembro de la familia de las cateninas ya que contiene un motivo de repetición aminoacídico distinto (repeticiones armadillo). El dominio armadillo de la PG también conocido como γ -catenina, tiene aproximadamente un 85% de secuencia idéntica a la β -catenina, el principal transductor de señal de la vía de señalización canónica Wnt. Debido a su parecido estructural, la PG y la β -catenina tienen un gran número de similitudes estructurales complejas. La vía canónica Wnt/ β -catenina es un importante regulador del “interruptor” de la miogénesis frente la adipogénesis (Ross et al., 2000). La activación de esta vía favorece la miogénesis e inhibe a los factores de la transcripción adipogénica C/EBP α y PPAR γ (que son los responsables directos de la génesis de los adipocitos regulándose el uno al otro) y mantiene a los preadipocitos en un estado indiferenciado (Ross et al., 2000). Por el contrario, la inhibición de la vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina por la sobreexpresión de axina o por la expresión del factor de transcripción Tcf712, favorece la adipogénesis y la proliferación de los adipocitos (Figura 11). Juega

un papel crucial en la unión de las cadherinas desmosómicas DSG y DSC al citoesqueleto vía DSP. La proteína, codificada por el gen JUP (ENSG00000173801) está implicada en la MAVD (McKoy et al., 2000b). La primera mutación de JUP asociada a MAVD fue una delección en homocigosis con un patrón de herencia autosómico recesivo (McKoy et al., 2000b). Como se ha hablado con anterioridad, la patología fue identificada por primera vez en pacientes de la isla griega de Naxos (enfermedad de Naxos). Hasta la fecha se han identificado alrededor de 20 mutaciones patogénicas en este gen de las que aproximadamente un 50% corresponden a mutaciones *missense*. El resto son inserciones/delecciones y mutaciones en sitios de *splicing* (van der Zwaag et al., 2009a).

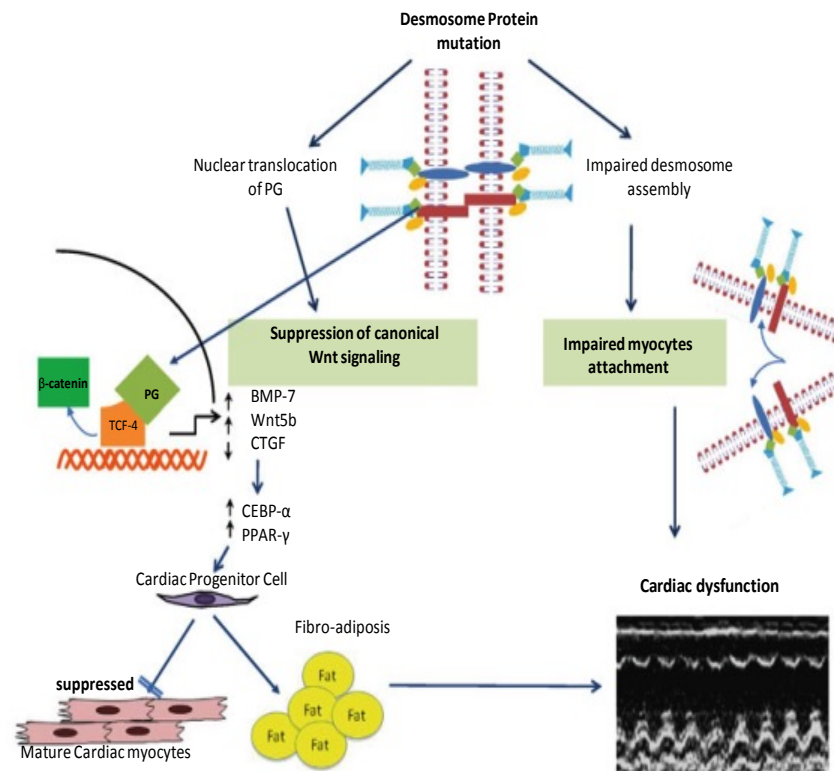


Figura 11. Patogénesis molecular de la MAVD. La disfunción cardíaca puede ocurrir como resultado de una mala incorporación de proteínas mutadas a los desmosomas, y por lo tanto problemas de unión miocito-miocito. La fibroadiposis resulta de la translocación de la PG a partir de los desmosomas en el núcleo y de la supresión competitiva de la vía de señalización canónica Wnt a través del factor de transcripción b-catenina/Tcf712. La vía de señalización canónica Wnt está implicada principalmente en el desarrollo embrionario del ventrículo derecho y de su vía de salida. La PG nuclear aumenta la expresión de marcadores adipogénicos, la proteína morfogénica ósea 7 (BMP-7) y la vía no canónica Wnt5b. En contraste, se suprime la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), que es un conocido inhibidor de la adipogénesis. Por lo tanto PG nuclear media un cambio transcripcional de la miogénesis a la adipogénesis en el subconjunto de células progenitoras del corazón. Este mecanismo proporciona una base para una mayor adipogénesis y la afectación predominante del ventrículo derecho (Lombardi and Marian, 2011).

5. PLN

El gen PLN (ENSG00000303992) codifica para el fosfolambán, una pequeña fosfoproteína asociada al retículo sarcoplásmico cardíaco. Es un regulador de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCa2A) del

músculo cardiaco y por lo tanto es importante en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} (Maclennan et al., 2003).

Hasta la fecha las mutaciones en el gen PLN habían sido asociadas a pacientes con MCD, sin embargo, recientemente se encontró una mutación patogénica en este gen en una familia holandesa, asociándose por primera vez mutaciones en el PLN con la MAVD (van der Zwaag et al., 2012). Además, curiosamente, este estudio mostró que los pacientes portadores de esta mutación p.R14del podían presentar dos fenotipos diferentes: MAVD y MCD. Esta mutación se había asociado previamente con complejos QRS de bajo voltaje y los autores sugirieron, que esta mutación se asocia a “miocardiopatía arritmogénica” abarcando MAVD, MAVI y formas arritmogénicas de MCD. De hecho, la superposición genética entre MAVD y MCD se ha demostrado también en otros genes asociados a la MAVD (Garcia-Pavia et al., 2011; Hodgkinson et al., 2013).

6. LMNA

El gen de la LMNA (ESNG00000160789) tiene aproximadamente 24Kb y contiene 12 exones. El *splicing* alternativo del exón 10 da lugar a dos ARNm diferentes que codifican para dos proteínas: lamina A y lamina C.

Las alteraciones genéticas de la lamina están asociadas con un grupo de trastornos comúnmente denominados laminopatías en los que se incluyen patologías cardíacas (Carboni et al., 2012), pero que en un principio no estaban asociadas a MAVD. Fue en 2012 cuando Quarta *et al.* realizaron un estudio en una cohorte de 108 pacientes afectados de MAVD identificando mutaciones en LMNA de individuos afectados. Además en este mismo año se realizó un estudio de muestras de individuos fallecidos de MS cardíaca con sospecha de miocardiopatía y se halló una mutación de tipo missense en el gen de la LMNA (Larsen et al., 2012) , incorporando el estudio de este gen en pacientes en los que se sospecha una MAVD.

4. MIOCARDIOPATÍA DILATADA (MCD).

4.1 Etiología

La MCD es una enfermedad del músculo cardíaco que se caracteriza por la presencia de dilatación de uno o ambos ventrículos, disfunción ventricular sistólica y diastólica, que evoluciona a la insuficiencia cardíaca congestiva y muerte prematura por arritmias o fallo cardíaco. La MCD puede ser el resultado de una gran variedad de agentes etiológicos que causan disfunción o daño en los cardiomiocitos. En el 50% de los casos no se puede identificar una causa desencadenante específica (MCD “idiopática”). La incidencia de la MCD idiopática está estimada en de 2 casos de cada 2500 por año (Pinto YM et al., 2016). Aunque la MCD tradicionalmente se ha considerado como una enfermedad esporádica no genética, estudios recientes de familias numerosas con MCD sugieren que los “defectos” genéticos heredados son una causa importante de la MCD idiopática (MCD “familiar”). En los últimos años se ha demostrado una asociación familiar en un porcentaje importante de los casos (Gimeno et al., 2009).

4.2 Fisiopatología de la enfermedad

El examen necrópsico del corazón muestra aumento del tamaño con dilatación de las cuatro cámaras. El espesor de la pared ventricular puede estar disminuido debido a la dilatación, aunque un incremento en el peso del corazón suele reflejar que la hipertrofia ha ocurrido. Las válvulas son anatómicamente normales, pero la mitral y la tricúspide pueden presentar dilatación de sus anillos y elongación de los músculos papilares (Figura 12). Las arterias coronarias suelen ser también normales, aunque la MCD puede coexistir con enfermedad coronaria. Con frecuencia se encuentran trombos murales en aurículas o ventrículos.

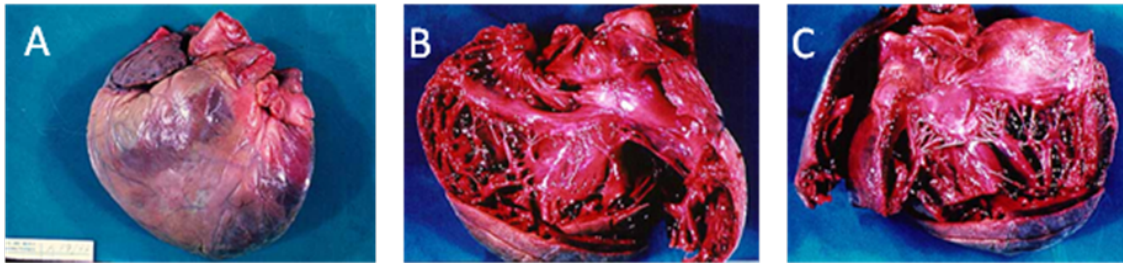


Figura 12: (A) Imagen externa del corazón en una MCD. Llama la atención su punta redondeada y su aspecto globular. (B) Apertura del corazón por el lado derecho, cavidad ventricular y auricular dilatadas, el anillo de la válvula tricúpside también está dilatado. (C) Apertura del corazón por el lado izquierdo en el que también se observa dilatación auricular y ventricular así como del anillo mitral.

En el examen histológico puede aparecer un miocardio básicamente normal, aunque es frecuente la existencia de áreas de generación de las células miocárdicas con fibrosis, necrosis de fibras musculares e infiltración celular que será más pronunciada en pacientes con un proceso inflamatorio agudo. El examen microscópico suele mostrar gran hipertrofia de algunas fibras con agrandamiento nuclear llamativo, junto a atrofia de otras. Cuando se produce fibrosis patológica, hay un aumento de las fibras de la matriz que da lugar a una disminución de la flexibilidad del miocito que tiene como consecuencia una disminución de la distensibilidad ventricular. Esto puede contribuir al fallo diastólico presente en la miocardiopatía dilatada (Janicki, 1992).

La microscopía electrónica muestra también cambios inespecíficos, como un exceso de glucógeno o un incremento de mitocondrias cualitativamente anormales, confirmando la necrosis y fibrosis. Las proteínas contráctiles miosina, actina, troponina I y troponina T pueden faltar o estar alteradas en un porcentaje elevado de células. Pueden coexistir células completamente normales con otras que muestran una desestructuración evidente de los filamentos o ausencia completa de proteínas contráctiles.

A nivel molecular se observa disminución en la expresión del ARNm para la cadena pesada de la β -miosina y para la actina. Por inmunohistoquímica se ha demostrado que la intensidad de fluorescencia de la titina (proteína del citoesqueleto que se asocia a la actina centrado la banda A en el sarcómero y determinando la elasticidad de éste) se encuentra reducida e incluso ausente en algunos miocitos (Hein et al., 1994).

4.3 Clínica de la enfermedad. MCD familiar

Se considera que existe MCD familiar *a priori* cuando al menos uno de los familiares de un paciente con MCD idiopática presenta la misma enfermedad (Michels, VV. 1992; Monserrat, L. 2002). Esta definición es muy restrictiva e implica una infraestimación de la prevalencia de enfermedad familiar. La expresión clínica de la enfermedad depende de la edad del paciente. Se ha demostrado que entre un 10 y un 30% de los familiares que presentan dimensiones del VI superiores a las del 95% de una población normal, con función sistólica conservada, desarrollan MCD en un plazo de 3-5 años (Baig, Mk. 1998). Por ello, se considera probable MCD familiar cuando existe al menos un familiar con crecimiento ventricular izquierdo en el ecocardiograma, aun teniendo una fracción de eyección normal. Por otra parte, puede ser difícil identificar la presencia de enfermedad familiar en casos con herencia recesiva, o ligada al cromosoma X.

La realización de un estudio familiar en la MCD comienza con una buena caracterización clínica del caso índice y una completa anamnesis familiar. Los primeros trabajos sobre prevalencia de MCD familiar sólo ampliaban el estudio cuando el paciente refería la existencia de antecedentes familiares. Con esta estrategia, la prevalencia de enfermedad familiar era de entre un 3 y un 5%. Posteriormente, otros autores realizaron un estudio sistemático de los familiares de pacientes con MCD idiopática y, en la actualidad, se considera que la prevalencia de MCD familiar es de aproximadamente un 30% de los casos (Michels, VV. 1992; Monserrat, L. 2002; Gimeno et al., 2009). Sin embargo, esta estimación procede de pocos estudios con un número reducido de pacientes, con resultados variables (lo que probablemente depende de las características de las poblaciones estudiadas).

4.4 Desmosomopatías y MCD. Genética molecular

La base genética en la mayoría de los casos de MCD idiopática sigue siendo desconocida. Los genes que codifican las proteínas desmosómicas, consideradas comúnmente como sinónimo de otra patología, la MAVD, son también responsables de causar disfunción ventricular izquierda, pero su importancia en pacientes con MCD inequívoca es poco conocida (Elliott et al.,

2010). La MCD es una causa importante de insuficiencia cardíaca progresiva y de MS. Es hereditaria en el 30-40% de todos los casos y hasta ahora se han encontrado más de 40 genes causales en seres humanos (Kayvanpour et al., 2016).

Aunque el diagnóstico clínico de la MAVD requiere la manifestación de la enfermedad en el VD, se reconoce cada vez más que la participación biventricular es más común. De hecho, en algunas familias con mutaciones en alguno/s de los genes desmosómicos, la enfermedad ventricular izquierda puede ser predominante o exclusiva (Norman et al., 2005; Sen-Chowdhry et al., 2007c). El examen patológico de corazones en autopsias y/o trasplantes cardíaco revela tanto macroscópica como microscópicamente la implicación del VI en un 76% de los casos (Corrado et al., 1997). En la mayoría de los casos, la pared posterolateral del VI fue la región más involucrada. Se sugiere que las mutaciones en los genes desmosómicos aumentan la susceptibilidad del miocardio a los efectos dañinos del estrés mecánico de tal modo que predisponen la separación del cardiomiocito, la muerte y el reemplazo eventual por tejido fibroadiposo (Protonotarios and Tsatsopoulou, 2004). Basándose en estas observaciones se puede llegar a la hipótesis de que las mutaciones en los genes desmosómicos (Tabla 3) pueden representar a una proporción de pacientes cuya condición clínica primaria se diagnostica como MCD (Elliott et al., 2010).

Tabla 3: Variantes en genes desmosómicos con significado incierto identificadas en pacientes con MCD (Elliot et al 2010)

Caso	Edad	Sexo	Gen-Cambio Nucleót	Efecto	Síntomas	ECG	Monitor ECG	Ectopía Ventricular con Ejercicio	Ecocardiografía
1	39	V	DSP-IVS15+1 G>C PKP2-c.26300 C>A †	Splicing anormal H877Q	Disnea	RS, defecto conducción	CVP multifocal 24 en 24h	Recuperación LBBB nulo (solo ectópico)	ddf VI 7,0cm (150%); dsf VI 6,1cm; FA 12,9%; No ACR del VI, VD moderadamente dilatado con insuficiencia sistólica sin ACR
2	25	V	PKP2-c.4190 C>T	S140F	Disnea	Fibrilación atrial, transición Onda R en VS	CVP multifocal 128 en 24h, TVNS	Nulo	ddf VI 6,8cm (140%); dsf VI 6,3cm; FA 7,4%; No ACR del VI; VD normal
3	68	V	PKP2-c.4190 C>T	S140F	Disnea y palpitaciones	RS, transición Onda R en VS	CVP multifocal 1608 en 24h, TVNS	Durante recuperación RBBB RBBB multifocal	ddf VI 6,9cm (147%); dsf VI 6,0cm; FA 13% No ACR del VI; VD normal
4	59	V	PKP2-c.4190 C>T DSP-c.8134 G>A †	S140F A2712T	Disnea	RS, LBBB, QRSd 170ms	CVP multifocal 72 en 24h, TVNS	Durante recuperación RBBB RBBB multifocal nulo	ddf VI 7,3cm (158%); dsf VI 6,5cm; FA 11%; deterioro global con diquinesia septal (LBBB); VD moderadamente dilatado con insuficiencia sistólica sin ACR
5	21	M	DSP-c.2765_2766del CA	S922fsX928	Síncope	RS, inversión onda T en aVL	CVP multifocal 3528 en 24h, TVNS	Durante recuperación LBBB LBBB multifocal	ddf VI 5,6cm (113%); dsf VI 4,5cm; FA 19,6%; No ACR del VI; VD normal

FA indica fracción de acortamiento; LBBB, bloqueo de la rama derecha; dsfVI, diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo, TVNS, taquicardia ventricular no sostenida; CVP, complejos ventriculares prematuros; ACR alteraciones de la contractilidad regional; VI, ventrículo izquierdo; VD, ventrículo derecho; ddfVI, diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo

†: Las mutaciones no fueron consideradas patogénicas para el propósito de este estudio

El conocimiento de las bases genéticas de la MCD es muy reciente. La primera mutación responsable de MCD se describió hace 15 años en el gen de la LMNA A/C. Desde entonces, la MCD familiar se ha relacionado con otros genes que codifican proteínas del citoesqueleto celular, proteínas sarcoméricas y otros genes candidatos como es el caso del PLN. Se ha intentado establecer una relación directa entre genotipo-fenotipo y pronóstico. Sin embargo, distintas mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar a fenotipos completamente diferentes. Incluso dentro de una familia en la que se identifica una determinada mutación, las manifestaciones clínicas son a menudo muy variables, probablemente a causa de la influencia de otros factores genéticos y ambientales. De todos modos, el estudio sistemático genético y clínico de estas familias está permitiendo avanzar rápidamente en el conocimiento de esta compleja enfermedad.

5. SÍNDROME DE MUERTE SÚBITA ARRÍTMICA (SADS)

5.1 Etiología

El síndrome de muerte súbita arrítmica (SADS) también denominado síndrome de la MS del adulto es un trastorno genético que suele afectar a personas de 5 a 35 años de edad. Se define MS como la aparición repentina e inesperada de una parada cardíaca en una persona que aparentemente se encuentra sana y en buen estado. Una muerte causada por SADS es repentina y sin síntomas. La autopsia molecular consiste en el estudio genético de una muestra de sangre o tejido de la persona fallecida, que junto con el estudio clínico de los familiares puede hacernos llegar a la enfermedad causante de la muerte (Tan, HL. 2005; Ackerman, MJ. 2001).

Está estimado que alrededor de un 30% de las muertes súbitas que involucran a niños aparentemente sanos, adolescentes y jóvenes no tienen anomalías morfológicas que expliquen dicha muerte, quedando etiquetada como MS con autopsia blanca (Behr et al., 2003; Chugh et al., 2000; Maron et al., 1996; Morentin et al., 2003; Puranik et al., 2005). Para llegar al diagnóstico de una MS inexplicada con corazón estructuralmente normal es necesario descartar una serie de otras causas de MS no cardíacas en las que pueden no observarse lesiones tras la autopsia macroscópica, tales como las muertes de

origen tóxico, especialmente por sobredosis de fármacos, alcohol o drogas de abuso, las muertes por electrocución, asma o anafilaxia. De ahí la necesidad de una autopsia completa (con estudio microscópico de todos los órganos, análisis químico toxicológico y bioquímico de humor vítreo etc.) y una revisión de la historia clínica y de las circunstancias de la muerte antes de hablar de una “autopsia blanca”.

Estudios de *screening* familiar han determinado que hasta en un 50% de los casos, la causa del SADS es debido a canalopatías del tipo Síndrome de QT largo (SQTL), Síndrome de Brugada (SB) y taquicardia ventricular catecolaminérgica (Vyas and Lambiase, 2013).

El análisis molecular de los genes desmosómicos en muestras de personas fallecidas por MS puede determinar la mutación causal, con lo que se podría llegar al diagnóstico certero de la causa de la muerte.

OBJETIVOS

El estudio por secuenciación de los genes desmosómicos (DSP, PKP2, DSC, DSG, JUP) permite conocer la causa de enfermedades como MAVD/I y MCD en un porcentaje importante de nuestra población (aproximadamente un 40%). Determinados cambios en la secuencia aminoacídica en estos genes se asocian a perfiles fenotípicos y pronósticos específicos.

Es posible que grandes reordenamientos en los genes desmosómicos sean también la causa del desarrollo de estas enfermedades. Mediante la técnica del MLPA (Multiplex Ligation Plus Amplification) es posible detectar grandes inserciones y/o deleciones en aquellos pacientes con estudio por secuenciación de los genes desmosómicos en los que no se haya detectado ninguna mutación causante de la enfermedad.

La Región de Murcia es un área geográfica pequeña donde en gran número de ocasiones hay familias emparentadas. Ocasionalmente, familias aparentemente no relacionadas son portadoras de mutaciones idénticas, lo que nos hacen plantearnos la posibilidad de que estas familias tengan un antecesor común. Mediante el análisis de haplotipos con marcadores microsatélites podemos buscar un efecto fundador de estas variantes y conocer el número de generaciones que han transcurrido desde que se originó la mutación.

Objetivos:

1. Identificación de variantes patogénicas en los genes desmosómicos de pacientes diagnosticados de MAVD/I, MCD y SADS.
2. Estudiar la patogenicidad de las variantes encontradas en los genes desmosómicos en la MS con autopsia blanca y en pacientes diagnosticados de MAVD/I y MCD mediante estudios bioinformáticos y haciendo uso de software predictores.
3. Estudiar la correlación genotipo-fenotipo de las mutaciones encontradas (tanto de las ya conocidas como de las nuevas con significado incierto) para el análisis de patogenicidad de dichas mutaciones mediante el estudio de cosegregación familiar previo análisis genético de todos los familiares.

4. Determinar la existencia y la data de fundadores en familias que comparten una misma mutación.
5. Estudiar la prevalencia de grandes reordenamientos en los genes desmosómicos mediante la técnica de MLPA en pacientes diagnosticados de MAVD/I y MCD.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y CONTROLES

El grupo de pacientes incluidos en este trabajo vinieron referidos de la consulta de la Unidad de Cardiopatías Familiares y del Instituto de Medicina Legal. Constituida desde 2002, ejerce para la prevención de la MS y tratamiento de cardiopatías de origen genético y recientemente ha sido acreditada como Unidad de Referencia Nacional por el Ministerio de Sanidad (CSUR-2013).

Se reclutaron 406 individuos de familias con patologías asociadas a alteraciones en genes desmosómicos. 184 pertenecen a 31 familias diagnosticadas de MAVD, 171 a 24 familias diagnosticadas de MCD y 51 que pertenecen a 4 familias diagnosticadas de SADS.

Los diagnósticos se realizaron según los criterios establecidos en el consenso de expertos del año 2010 (Marcus et al., 2010). Se ofreció la posibilidad de estudio clínico completo a los familiares de primer grado de los afectados.

Se llevó a cabo la recogida de datos clínicos de todos los probandos y la realización de una serie de pruebas diagnósticas (electrocardiograma digital, ecocardiograma 2D-doppler, RMN, ergometría o prueba de esfuerzo, electrocardiograma de señal promediada, holter de 24 horas, estudio histopatológico, estudio electrofisiológico (EEF) y análisis genético (Anexo I).

Además se realizó el árbol genealógico y se recogió la historia clínica de cada familia.

Los pacientes y familiares recibieron información detallada de su patología. Para la participación en el estudio genético se requería la firma en un consentimiento informado (Anexo II, III y IV).

2. ESTUDIO GENÉTICO

Se realizó el estudio genético a los 53 casos índice. El estudio mediante secuenciación de los genes PKP2, DSP, DSG2, PLN y LMNA se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Genético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, así como en análisis mediante MLPA de los casos índice con resultado negativo para los genes desmosómicos. El resto de genes

(DSC2 y JUP) se mandaron a secuenciar a un laboratorio externo (Health in Code, A Coruña). Además, en este laboratorio externo también se realizaron las confirmaciones mediante NGS (Next Generation Sequencing) de los casos positivos analizados con MLPA.

Una vez obtenido el resultado (en el caso de que fuera positivo), se procedió al estudio genético de los familiares. Las diferentes técnicas empleadas se describen a continuación.

2.1 Extracción de ADN genómico

Se extrajo el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico de todos los casos índices mediante el sistema automático de Promega (Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit) (Figura 13) a partir de 400 μ L de sangre periférica, extraída en un tubo con anticoagulante EDTA. La técnica se basa en la actuación de unas partículas paramagnéticas que funcionan como una fase sólida móvil que optimiza la captación, lavado y elución de la muestra. En el Anexo V se muestra el flujo de trabajo que se realizó con las muestras desde la extracción de sangre hasta la predicción de patogenicidad de una variante nueva.

Para realizar la extracción de ADN (Figura 13) se centrifugaron los tubos 5'a 3500 rpm y se extrajo la capa de leucocitos para conseguir mayor concentración y pureza del material génico extraído. Las muestras de ADN se llevaron a una concentración de 20ng/ μ L y el resto se congeló a -20°C incluyéndose en la ADNteca de la Unidad de Cardiopatías Hereditarias.



Figura 13. A. Maxwell 16 System. B. Guía de utilización del Maxwell 16. C. Esquema detalle de la extracción de ADN.

Se midió la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría utilizando el equipo de Thermo Scientific, Nanodrop 1000 (Figura 14). Las medidas para la concentración se realizaron a una absorbancia (A) de 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos, y la obtenida de la relación entre A260/A280 nm para determinar la calidad del ADN extraído, considerándose un ratio entre 1.5-1.8 como aceptable.

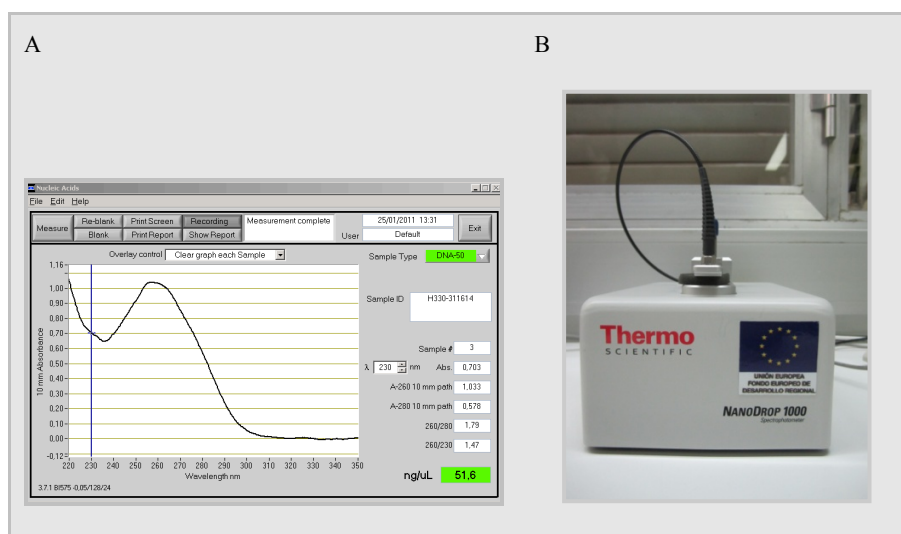


Figura 14. A. Curva de absorbancia de una muestra de ADN. B. Nanodrop1000 (Termo).

2.2 Amplificación y purificación del DNA genómico

Se amplificaron cada uno de los exones de los genes desmosómicos DSP (NM_004415.2), DSC2 (NM_024422.4), DSG2 (NM_001943.4), PKP2 (NM_004572.3) y JUP (NM_002230.2) y los genes candidatos LMNA (NM_170707.3) y PLN (NM_002667.4) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los cebadores utilizados se obtuvieron de la publicación de Chih Chieh Yu. et al de 2008 (Yu et al., 2008) y los que no aparecían en esta se diseñaron mediante el programa *Primer3-Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

Se agruparon todos los cebadores que tuvieran la misma temperatura de hibridación para agilizar el proceso. Se utilizaron los modelos de termociclador: 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700 y modelo Veriti de la misma casa.

El kit enzimático escogido para las amplificaciones fue el kit de Promega Go Taq Hot Start polymerase. La enzima de Promega necesita un tiempo de activación menor que otras de las que están disponibles en el mercado, además reduce la formación de productos inespecíficos y la formación de dímeros de cebadores.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ L, 5 μ moles de cada dNTP (desoxinucleótido trifosfato: ATP, GTP, CTP TTP),

50 μ moles ClMg, 10 μ moles de cada cebador (sentido y anti-sentido), 0.125 μ L Taq, 50 ng ADN (Tabla 4). Primero se realizó una fase de activación de la polimerasa a 94°C durante 2', seguido de un programa de 35-40 ciclos que incluye tres temperaturas: 94°C 1' (desnaturalización de la hebra molde), T^a variable (en función del cebador) 45'', 72°C 1' (tiempo de extensión); por último una fase de extensión final 72°C 10' y 4°C indefinidamente.

Tabla 4. Reacción en cadena de la polimerasa

PCR	V (μL)
H ₂ O	10,375
Buffer (10X)	5,0
Cl ₂ Mg (25mM)	2,5
dNTP's (2mM)	2,5
Primer F + R (10mM)	1+1
Taq (0.5U/ μ L)	0,125
DNA (20ng/ μ L)	2,5
Vol. Total	25

Se verificó la correcta amplificación de los fragmentos mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X (Tris 89mM - ácido bórico 89 mM – EDTA (2mM) a pH 8,4 de Bio-Rad (161-0770)) utilizando para el revelado GelRed (0,1 μ L GelRed/1 μ L gel) (GelRed Nucleic Acid Gel Satín, 10000X in Water. Catalog number: 41003. Biotium), una solución de tinción fluorescente de ácido nucleico que sustituye al bromuro de etidio, muy tóxico, utilizado habitualmente en los laboratorios de biología molecular para la tinción del ADN de doble cadena. Se cargaron aproximadamente 3 μ L de producto amplificado junto con 1 μ L de tampón de carga (0,25% (W/V) azul de bromofenol, 0,25% (W/V) cianol xileno, 30% (V/V)

de glicerol en agua). Se utilizó para el revelado el transiluminador Alpha Innotech y la cámara PowerShot A640 AiAF de Canon.

A continuación se purificaron los amplicones mediante un método enzimático, con el kit ExoSap-It (usb. Affimetrix) (Figura 15). Este kit incluye dos enzimas, la exonucleasa I, que elimina las cadenas simples de ADN residuales que se puedan formar en la PCR o restos de cebadores y una fosfatasa alcalina que elimina los restos de dNTP's. Se mezclan 5 μ L del producto de reacción de PCR con 2 μ L de ExoSap-It, se incuba 15' a 37 °C y seguidamente 15' a 80 °C para su inactivación.

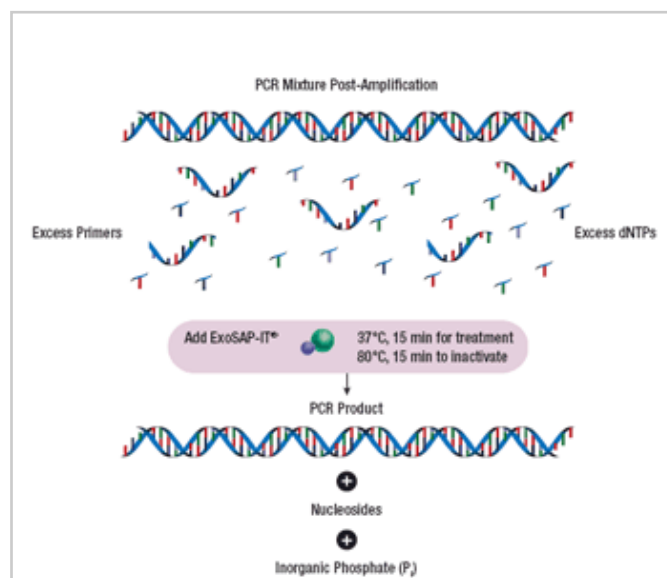


Figura 15. Reacción enzimática para la purificación del producto de PCR

2.3 Secuenciación automática directa

Se utilizó la secuenciación automática por electroforesis capilar como técnica para detectar alteraciones en la secuencia de los genes desmosómicos y los genes candidatos PLN y LMNA. Se empleó el Kit BigDye Terminador (BDt) v1.1 de Applied Biosystems, una adaptación de la reacción enzimática dideoxi de Sanger (1977). Las secuencias fueron analizadas por electroforesis capilar en el equipo ABI3130 (Applied Biosystems) (Figura 16).

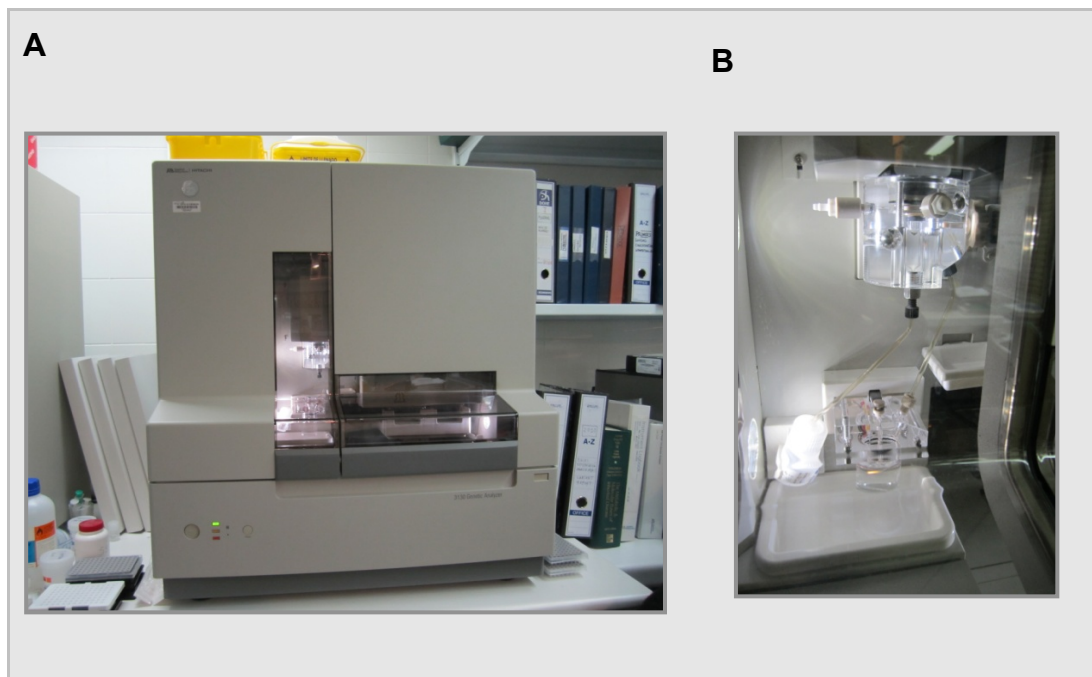


Figura 16. A. Analizador ABI 3130. B. Detalle del circuito del polímero.

El programa del termociclador que se utilizó para la reacción de secuenciación consta de una desnaturalización a 96 °C 1', seguido de un programa de 25 ciclos de tres temperaturas, 96 °C 10'', 50 °C 5'' y 4' a 60 °C terminando a 4 °C indefinidamente. Se trabajó con un volumen final de 5 µL; 1,75 µL "Buffer enhancer sequencing" (10X), 1,5 µL agua miliQ, 0,25 µL de BDt v1.1, 0,5 µL cebador ("Forward" o "Reverse" 3,2 µM) y por último 1 µL del producto de PCR purificado (Tabla 5).

Tabla 5. Reacción de secuenciación

Reacción de secuenciación	V (µL)
H ₂ O	1,5
Buffer <i>enhancer sequencing</i>	1,75
Primer F ó R (3,2 mM)	0,5
Big Dye	0,25
Producto PCR	1,0
Vol. total	5

Se realizó la reacción de secuenciación, tras la purificación del amplicón, utilizando los mismos cebadores que para la PCR pero a una concentración de 3,2µM. Para confirmar los posibles cambios en la secuencia se hace una secuenciación bidireccional. El análisis de las secuencias se realiza con los software suministrados por la casa Applied Biosystems, “Sequencing Analysis v.5.2” y “Seqscape v.2.5”.

2.5 Purificación de la reacción de secuenciación

Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los restos de dNTP's sobrantes y posibles impurezas con las columnas de EdgeBio (Performa DTR (Dye Terminator Removal) Gel Filtration Cartridges, cuyo protocolo se detalla a continuación. El Kit se basa en la descripción de Sambrook et al. (1989) de filtración de ADN en gel para separar fragmentos de más de 16 pares de bases (pb) de restos de dideoxinucleótidos marcados, dNTP's y otras sales o compuestos de bajo peso molecular (elimina hasta el 98% de sales presentes).

Se centrifugaron las columnas a 3000 rpm durante 2 minutos. Se retiró el agua restante y se colocó la columna en un vial de 1,5 ml nuevo. Se añadieron a los 5 µL de la reacción de secuenciación 10 µL de agua milliQ, el volumen final (15 µL) lo depositamos en el centro de la columna. Se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos. Se añadieron 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) que desnaturaliza la doble hebra del ADN, seguidamente

se traspasaron las muestras purificadas a una placa de 96 pocillos (MicroAmp™. Optical 96-Well Reaction Plate. AppliedBiosystems) adaptada para el secuenciador.

Cuando el número de muestras es elevado se realiza la purificación en placa de columnas de EdgeBio (96 pocillos). Se centrifugaron las placas a 850 g durante 3'. Al mismo tiempo se llevó el volumen de reacción de secuenciación hasta 20µL. Una vez descartado el filtrado de las columnas se aplicó el volumen de reacción a cada uno de los 96 pocillos de la placa y se volvió a centrifugar a 850 g 3'. Se añadieron 10 µL de formamida Hi-Di a cada pocillo. La placa de secuenciación se introdujo directamente en el secuenciador ABI3130 para la electroforesis capilar.

2.6 Estudio de las alteraciones detectadas

Una vez comprobada la presencia de una alteración en un caso índice, tanto conocida como nueva, mediante secuenciación bidireccional, se estudió al resto de familiares de los que se poseía muestra, secuenciando sólo el exón donde se detectó la variante. Cuando detectamos una alteración no conocida nos encontramos con dos situaciones:

- 1. Alteración en región intrónica.** Se consideró las que se hallaban 30 pb aguas arriba y abajo de la región codificante. En este caso se utilizaron programas de análisis (indicados en la sección 2.9 de los estudios in silico de este capítulo) de las zonas de reconocimiento de la maquinaria del corte y empalme, y se comprobó una posible eliminación o aparición del sitio aceptor o donador para el proceso de corte y empalme.
- 2. Alteración que se encuentra dentro de la región codificante.** Para considerarla como mutación debe estar en todos los individuos de la familia afectados, no debe estar presente en 200 alelos de individuos sanos sin historia de MS familiar (100 controles sanos) y se comprueba la zona a la que afecta la mutación, si es una zona conservada en la evolución entre varias especies e isoformas o se encuentra en una zona clave de la proteína en cuestión. A estas variantes también se les realizó el estudio in silico con los programas detallados en la sección 2.9.2 de este capítulo.

2.7 Estudio de grandes reordenamientos en los genes desmosómicos

El MLPA (del inglés Multiplex Ligation Probe Amplification) es un método descrito en 2002 por J. Schouten que permite la búsqueda de grandes deleciones o duplicaciones, así como la cuantificación del ADN. Puede utilizarse tanto en ADN genómico como en ARNm (Gallano P., 2005). Requiere la hibridación específica de la secuencia, seguida de una amplificación de las sondas que hayan hibridado y un análisis semicuantitativo de los productos de PCR resultantes. Permite detectar los cambios en el número de copias de secuencias de más de 45 nucleótidos en una sola reacción. La detección en una muestra de dos regiones contiguas delecionadas proporcionaría un confirmatorio interno de la propia deleción. En el caso de la deleción de un único exón es necesaria la comprobación mediante otro método para la confirmación (Vaughn et al., 2008).

En la técnica de MLPA para el estudio de estos reordenamientos usamos el Kit SALSA MLPA KIT FOR DNA. P168-050R ARVC. 2X50 (100 reacciones) de MRC Holland. Las sondas utilizadas en el kit para la detección de grandes reordenamientos génicos vienen indicadas en las tablas del Anexo VI. Se optimizó la técnica en el termociclador Mastercycler de Eppendorf (Figura 17A).

Se realizó el estudio en aquellas muestras en las que no se hubiera detectado ninguna mutación causal. El protocolo para la detección de grandes reordenamientos se compone de 5 pasos (Figura 17B).

- 1. Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas.** Primero se desnaturalizan 5µL de ADN (20ng/µL) 5' a 98 °C. Se enfrían y pausan a 25 °C antes de abrir el termociclador y se añadieron 1,5 µL de SALSA probemix y 1,5 µL de MLPA buffer a cada tubo. Se mezclan e incuban 1' a 95 °C seguido de 18 horas a 60 °C.
- 2. Reacción de Ligación.** Se reduce la temperatura hasta 54 °C y se añaden 32 µL de la mezcla de ligación (3 µL de Ligase buffer A, 3 µL Ligase buffer B y 25 µL de agua miliQ. Se añade 1 µL de Ligase-65) y se homogenizan bien. Se incuban 15' a 54 °C seguido de 5' a 98 °C.

- 3. Reacción de PCR.** Se mezclan en tubos nuevos: 4 μ L de SALSA PCR buffer, 26 μ L de agua miliQ y 10 μ L de la reacción de ligación anterior. En el termociclador a 60 °C mientras se prepara la mezcla de la polimerasa que contiene: 2 μ L de SALSA PCR primers, 2 μ L de SALSA Enzyme Dilution buffer, 5,5 μ L de agua y por último se añaden 0,5 μ L de polimerasa por tubo y se mezcla bien. El programa de PCR consta de 35 ciclos de 30'' 95 °C, 30'' 60 °C y 60'' a 72 °C. Finalmente se termina con una incubación de 20' a 72 °C.
- 4. Separación de los productos de amplificación mediante electroforesis.** Se mezclan 12 μ L de Formamida Hi-Di, 1 μ L de producto de amplificación y 0,5 μ L del marcador de tamaño utilizado, en nuestro caso LIZ500, y se desnaturaliza 5' a 95 °C.
- 5. Análisis de datos.** Los datos obtenidos del analizador ABI3130 se visualizan con el software GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems). Mediante una plantilla de análisis se normalizan los datos con respecto a las áreas de los controles sanos. A continuación se comprueba la existencia de una posible duplicación o delección en el gen. Utilizamos los rangos de referencia utilizados por otros grupos de investigación e indicados por la casa comercial (MRC Holland), considerando un valor por debajo de 0,6 sospechoso de delección y por encima de 1,4 de duplicación, utilizando siempre dos controles sanos como referencia. Ambos se tendrían que confirmar posteriormente. Se debe tener en cuenta que quizás algunos polimorfismos interfieran en la hibridación de alguna sonda y pudiera generar un falso positivo.

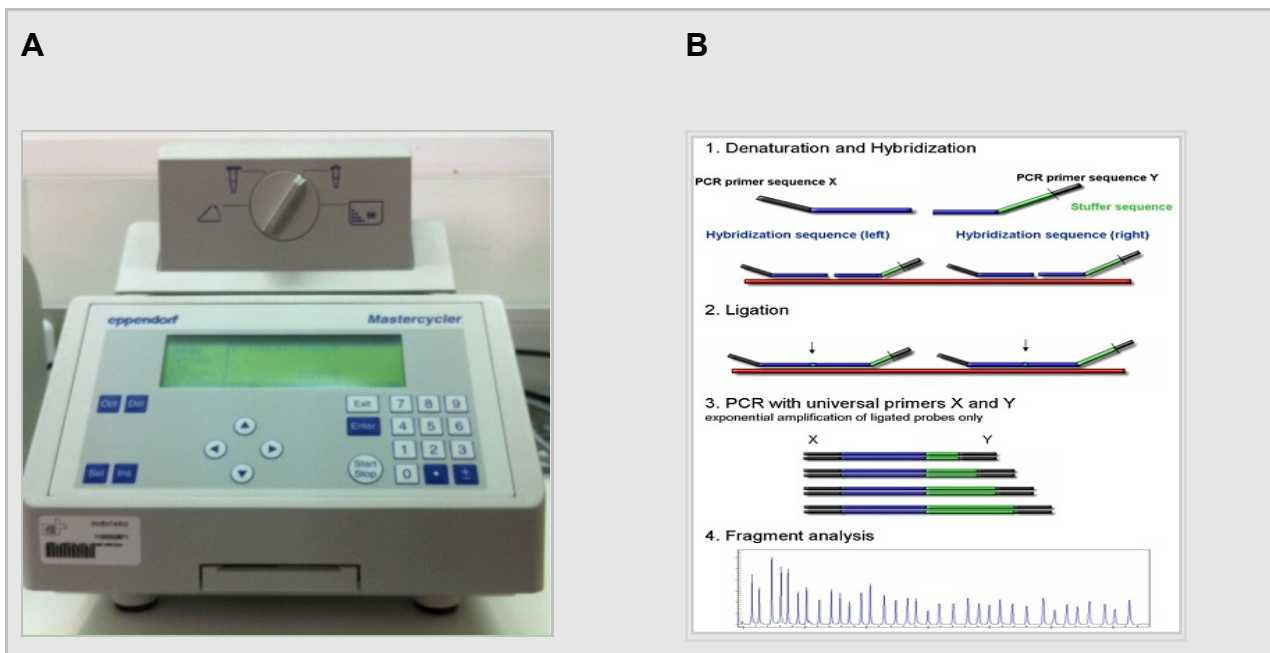


Figura 17. A. Termociclador Mastercycler (Eppendorf). B. Esquema de pasos a seguir de la técnica de MLPA.

2.8 Estudio de microsatélites

El ADN microsatélite, también conocido como STR (“Short Tandem Repeats”), se define como segmentos cortos de mono, di, tri o tetranucleótidos y constituye el 2% del genoma.

El uso de microsatélites ofrece algunas ventajas como marcador genético:

1. Se transmite de manera mendeliana.
2. El número de unidades de repetición puede variar de un individuo a otro.
3. Estos marcadores se pueden utilizar para el análisis de ligamiento, efecto fundador, pruebas de identidad, parentesco y mapeo de genes relacionados con alguna patología o características concretas.

La técnica de microsatélites se ha utilizado para el estudio de 3 familias portadoras de una misma mutación conocida en el exón 11 del gen DSP para demostrar el efecto fundador y que comparten un antecesor común.

El estudio con microsatélites se realizó en dos fases: una primera fase en la que se utilizaron dos marcadores obtenidos del trabajo publicado por Norgett *et al.* Uno de los marcadores (Des.mic.1) se localiza en el intrón 1, aguas arriba del exón 11 donde se da la mutación. El otro marcador (Des.mic.3) se localiza en el intrón 23, aguas abajo del exón 11.

Posteriormente, y con el fin de la búsqueda de un efecto fundador y de calcular cuantas generaciones han pasado desde el origen de la variante, se realizó una segunda fase en la que se utilizaron 4 microsatélites obtenidos de www.ensembl.org: el marcador D6S1640 se localiza aguas arriba del gen DSP a una distancia de 0,13 MB, el marcador D6S1574 también se localiza aguas arriba del gen a una distancia de 1,53 MB del mismo, el marcador D6S1674 se localiza aguas abajo del gen a una distancia de 0,5 MB y por último el marcador D6S1660 se localiza aguas abajo del gen a una distancia de 15,7 MB.

Los primers de los microsatélites utilizados en la primera fase están indicados en la tabla 6 A (Norgett et al., 2000) y los de los microsatélites utilizados en la segunda fase están indicados en la tabla 6 B. La ubicación de los microsatélites en el cromosoma 6 viene indicada en la figura 18. Los cebadores “forward” fueron marcados con el fluoróforo 6-FAM. Se ha utilizado el kit de Qiagen “Type-it Microsatellite PCR Kit” (Cat. N° 206241). El programa de amplificación utilizado consta de varios pasos, 5’ a 95° (activación de la polimerasa de la Master Mix), 28 ciclos de 3 temperaturas: 30’’ a 95°; 90’’ a 57° y 30’’ a 72°; una extensión final de 30’ a 60° y a 4° indefinidamente. Para la PCR de microsatélites utilizamos los reactivos y cantidades señalados en la tabla 7.

Tabla 6 A. Marcadores microsatélites para el gen DSP.

<i>Microsatélite</i>	<i>Secuencia (5' → 3')</i>
Des.mic.1-F	CCCATCTATGCATAATGCAAC
Des.mic.1-R	GTCCTCACGGTAGTGCTACAAG
Des.mic.3-F	CGCTTTTGATCATGGCCCTAGTC
Des.mic.3-R	CTCACCTGTTACAGCTAGATG

Tabla 6 B. Marcadores microsatélites para el análisis de la MAVI.

<i>Microsatélite</i>	<i>Secuencia (5' → 3')</i>
D6S1640-F	AGCCAGGCATGCTAACAT
D6S1640-R	GGATTACAGGCACCCAGTA
D6S1574-F	AAGAACTTCCCAAACCAAT
D6S1574-R	AACCATCCAGGACATCAA
D6S1674-F	CCTTAAACAAACAATAAGACCACC
D6S1674-R	CAGCCTAGAAAACAGAGCCA
D6S1660-F	GAGTCTTGAGTAACTCCCACG
D6S1660-R	GACAATGAGTATCCCCCAC

Tabla 7. PCR de microsatélites.

PCR de microsatélites	V (μL)
H ₂ O	6,5
Master Mix	12,5
Solución Q	2,5
Primer (2μM cada cebador)	2,5
ADN (20ng/μL)	1,0
Vol. total	25

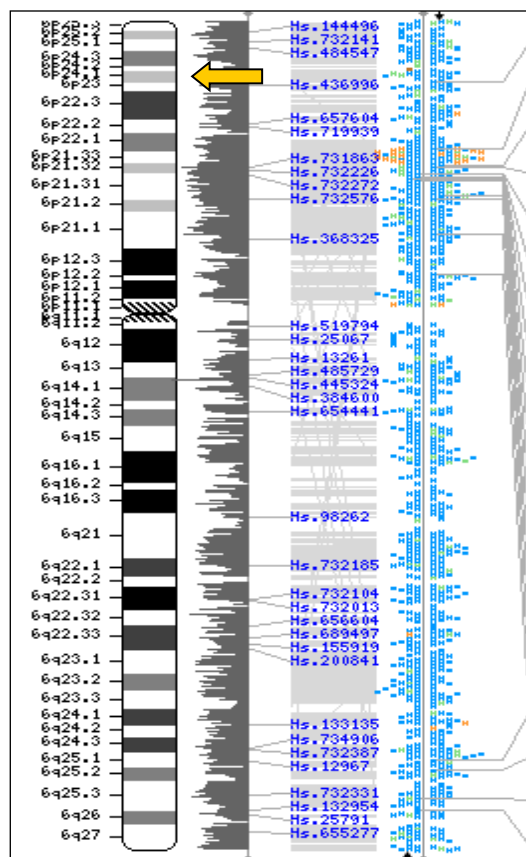


Figura 18. Cromosoma 6; la flecha indica la posición de los marcadores microsatélites entre 6.p23 y 6.p24.

La muestra una vez amplificada se introduce en el analizador ABI3130 para la electroforesis capilar y el posterior análisis de fragmentos. Para ello se mezcla 1 μ L de producto de amplificación con 12 μ L de formamida Hi-Di y 0,5 μ L del marcador de tamaño LIZ-500 (Gene Scan- 500 LIZ Size Standard. Part.Nº 4322682) y se calienta durante 5 minutos a 95°C.

Los datos obtenidos se analizan mediante el software Genemapper v 4.0, facilitado por Applied Biosystems. Cada microsatélite amplificado se repite un número de veces determinado en el alelo paterno y materno y se representa mediante un pico. Dependiendo del número de repeticiones obtendremos un pico con mayor o menor tamaño.

2.9 Análisis bioinformático de las variantes nuevas. Estudios “in silico”.

2.9.1 Identificación de posiciones conservadas

Para determinar la posibilidad de que una variante fuera patógena se tiene en cuenta la localización en la proteína, si una variante se encuentra en una zona importante para el funcionamiento de la proteína su patogenicidad será mayor. Un claro ejemplo es el caso de las mutaciones dominantes en la región N-terminal de la desmoplaquina que son responsables directas de la MAVD. Estudiaremos la conservación filogenética entre especies de todas las variantes encontradas para lo que utilizaremos el software Mutation Taster. Tomaremos como residuo altamente conservado aquel que sea idéntico en al menos 5 especies de las que el programa usa como referencia (Chimp, Rhesus, Xenopus, Cat, Mouse, Chiken, Zebrafish, Fugu, Elegans y Drosophila), como moderadamente conservado cuando el residuo sea idéntico en 4 de estas especies y como poco conservado cuando sea idéntico en 3 o menos especies.

2.9.2 Estudio de variantes de cambio de sentido

Actualmente hay una gran variedad de herramientas in-silico disponibles que pueden ayudar en la interpretación de las variantes de secuencias. Los algoritmos utilizados por cada herramienta pueden diferir, pero pueden incluir la determinación del efecto de la variante de secuencia en el nivel de nucleótidos y aminoácidos incluyendo la determinación del efecto de la variante en los transcritos de genes primarios y alternativos, otros elementos genómicos, así como el impacto potencial de la variante sobre la proteína (Richards et al.,2015)

Cuando detectamos una mutación de cambio de sentido utilizamos 3 programas de predicción:

1. **Pmut** (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/wholeHelp.htm>). Predice un valor mayor que 0,5 como patológico, variando la fiabilidad entre 0 (fiabilidad baja) y 9 (altamente fiable).

2. **Polyphen2** (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Calcula las diferencias entre la variante salvaje y la mutante asignándole un determinado valor, éste varía entre: >2 (afecta a la función y estructura de la proteína), 1,5-2 (posiblemente perjudicial) y <1,5 (benigna).
3. **Mutation T@ster** (<http://www.mutationtaster.org/>). Predice la patogenicidad de la variante y diferencia entre “mutación causante de la enfermedad” y “polimorfismo” con un rango de posibilidad P (0-1).

2.9.3 Estudio de variantes intrónicas

Los programas de identificación de sitios donadores y aceptores de “splicing” y proteínas intervinientes, que ayudan a predecir al efecto de una nueva mutación en el sitio de “splicing” asignando un valor determinado a la probabilidad de que la posición estudiada esté en un sitio aceptor o donador. En general, las herramientas de predicción del sitio de “splicing” tienen una sensibilidad aumentada (90-100%) con respecto a la especificidad (60-80%) en la predicción de anomalías. El programa utilizado fue:

1. ESEFinder

(<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>
)

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se ha realizado el estudio clínico de 406 pacientes de los que 184 pertenecen a 31 familias diagnosticadas de MAVD, 171 a 24 familias diagnosticadas de MCD y 51 que pertenecen a 4 familias diagnosticadas de SADS. Las características clínicas de todos los casos índice vienen resumidas en la Tabla 8.

La edad del diagnóstico en los probandos afectados de MAVD fue de $43,0 \pm 17,4$ años, en los afectados de MCD fue de $39,4 \pm 18,7$ años y en los afectados de SADS fue de $25,7 \pm 15,3$ años. La media de individuos varones en las familias diagnosticadas de MAVD es de 16,6 varones (56,0%), en las familias diagnosticadas de MCD hay una media de 14,60 varones (86,0%) y en las diagnosticadas de SADS la media de individuos varones es de 4 varones (100,0%). En cuanto a los individuos que sufrieron algún tipo de síncope, en las familias diagnosticadas de MAVD, un probando sufrió síncope cardiogénico y ninguno síncope vasovagal. En las familias con diagnóstico de MCD, 6 probandos sufrieron síncope cardiogénico y 1 síncope vasovagal. En las familias con diagnóstico de SADS únicamente un individuo sufrió síncope vasovagal. De los casos índice diagnosticados de MAVD, 5 (20,8%) tuvieron NYHA inicial, 21 (91,3%) tuvieron NYHA tipo I, 2 (8,6%) NYHA tipo II, 1 (4,3%) NYHA tipo III y ninguno NYHA tipo IV. De los casos índice diagnosticados de MCD, 1(4,16%) tuvo NYHA inicial, 9 (39,1%) tuvieron NYHA tipo I, 8 (34,7%) NYHA tipo II, ninguno NYHA tipo III y 7 (30,4%) tuvieron NYHA tipo IV. De los casos índice diagnosticados de SADS, 1 (4,16%) tuvo NYHA inicial y 4 (100,0%) tuvieron NYHA tipo I. Los casos índice diagnosticados de MAVD tuvieron una fracción de eyección (FE) media de 54,2 % y los diagnosticados de MCD de 36,7 %.

De los casos índice diagnosticados de MAVD, 3 (12,5%) sufrieron una parada cardíaca resucitada, otros 3 (12,5%) sufrieron MS, 5 (20,8%) tuvieron una descarga del desfibrilador automático implantable (DAI), 1 (4,1%) murió por insuficiencia cardíaca (IC) y ninguno por accidente cerebro-ventricular (ACV). De los diagnosticados de MCD, 1 (4,0%) sufrió parada cardíaca resucitada, 2 (8,0%) sufrieron MS, 5 (20,0%) tuvieron una descarga del DAI, 1 (4,0%) murió

por IC y 1 (4,0%) por ACV. De los casos índice diagnosticados de SADS, 1 (25,0%) sufrió una parada cardíaca resucitada y 3 (75,0%) sufrieron MS.

Tabla 8. Resumen de las características clínicas de los casos índice

Características clínicas	MAVD (n=184; 31 familias)	MCD (n=171; 24 familias)	MS/MSR: SADS (n=51; 4 familias)
Edad diagnóstico	43,00 ± 17,47	39,41 ± 18,75	25,75 ± 15,39
Varón (\bar{x} ; %)	22; (70,9%)	14; (56,0%)	4; (100,0%)
Síncope vasovagal	x	1 (4,0%)	1 (25,0%)
Síncope cardiogénico	1 (4,3%)	6 (24,0%)	x
NYHA I	21 (91,3%)	9 (39,1%)	4 (100,0%)
NYHA II	2 (8,6%)	8 (34,7%)	x
NYHA III	1 (4,3%)	x	x
NYHA IV	x	7 (30,4%)	x
FE VI (%)	54,2%	36,7%	x
LVNC	2 (8,0%)	8 (32,0%)	x
Ritmo sinusal	20 (80,0%)	14 (56,0%)	4 (100,0%)
FA Parox	3 (12,5%)	0	0
FA persistente	0	1 (4,0%)	0
FA crónica	2 (8,0%)	6 (24,0%)	0
TVNS holter	4 (16,0%)	9 (36,0%)	0
TV clínica	4 (16,0%)	7 (28,0%)	0
Transplante	0	4 (16,0%)	0
Parada cardíaca resucitada	3 (12,5%)	1 (4,0%)	1 (25,0%)
Muerte súbita	3 (12,5%)	2 (8,0%)	3 (75,0%)
Descarga del DAI	5 (20,8%)	5 (20,0%)	0
Muerte por IC	1 (4,3%)	1 (4,0%)	0

2. RESULTADOS DEL ESTUDIO GENÉTICO FAMILIAR

En este estudio se han incluido un total de 406 pacientes de los que 184 (31 familias) pertenecen a un grupo diagnosticado de MAVD, 171 (24 familias) pacientes a otro grupo diagnosticado de MCD y 51 pacientes (4 familias) pertenecen a un tercer grupo diagnosticado de SADS.

Se detectaron un total de 33 variantes. 10 de ellas en el gen DSP (1 *frameshift*, 3 *missense*, 3 *nonsense*, 1 intrónica y 2 variantes silentes), 10 variantes en el gen PKP2 (1 *frameshift*, 7 *missense*, 1 *nonsense*, una variante intrónica y una gran deleción encontrada por MLPA y confirmada mediante NGS), 4 en el gen DSC2 (1 *frameshift*, 2 *missense* y una variante silente), 3 en el gen DSG2 (las 3 *missense*), 2 en el gen JUP (1 *missense* y 1 silente), 1 en el gen PLN (1 deleción) y 3 en el gen LMNA (1 *missense* y 2 *nonsense*).

Los resultados del estudio bioinformático de cada variante encontrada en el análisis genético de cada familia, el estudio de la conservación filogenética de cada una de estas variantes, así como el estudio de penetrancia y cosegregación, cuyo dato numérico en % se obtiene de calcular la probabilidad de que la variante se asocie al fenotipo teniendo en cuenta solamente los afectados portadores, se encuentran resumidas en la Tabla 9.

Tabla 9. Estudio bioinformático de las variantes halladas, estudios de conservación filogenética y estudios de penetrancia/cosegregación.

GEN	EXÓN/INTRÓN	VARIANTE	REF	NCBI/HGMD	MUTATION TASTER	POLYPHEN-2	PMUT	ESEFINDER	CONS. FILOGENÉTICA	PENETRANCIA/COSEGRE GACIÓN (prob)
DSP	23	A1074SfsX1087	x	DCM	DCM	X	X	x	NO	50%/C (87%)
DSP	23	p.Glu1740Lys	rs142885240	NDM	SNP p=0,58	BE SC=0,17	N (2)	x	**	0
DSP	24	p.Gln1925*	x	NDM	DCM	X	X	x	*	33,3%/NPC (50%)
DSP	19	p.Arg877Arg	rs1016835	NDM	SNP p=4,08 (TGP)	X		x	NO	
DSP	23	p.Arg1537Cys	rs28763967	NDM	SNP p=0,71	PD SC=0,965	P (3)	x	**	60% NPC
DSP	11	p.Gln447*	x	NDM	DCM p=0,94	X	X	x	**	77,7%/C (100%)
DSP	11	p.Arg425*	x	DCM	DCM	X	X	x	**	50%/NC (50%)
DSP	23	p.Arg1458Gly	x	DCM	SNP p=0,94	BE SC=0,125	P (1)	x	**	
DSP	23	p.Tyr1512Cys	rs2076299	SNP	SNP p=0,93	BE SC=0,237	P (5)	x	**	
DSP	8	IVS8-1G>A	x		x	X		SI AFECTA SPLICING		33,3%/NPC (50%)
PKP2	5	p.Ala418Asp	x	NDM	DCM p=0,98	PD SC=0,986	N (0)	x	***	50%/NPC (50%)
PKP2	10	p.Gly712Arg	x	NDM	DCM p=0,78	PD SC=0,995	P (4)	x	**	11,1%/NC (50%)
PKP2	7	p.Ser140Phe	rs150821281	DCM	SNP p=0,92	BE SC=0,007	P (6)	x	**	37,5%/C (87%)
PKP2	1	p.Asp26Asn	rs143004808	DCM	SNP p=0,83	PD SC=0,859	N (4)	x	**	66,66%/NP (75%)
PKP2	2	p.Arg79Gln			SNP		P (0)	x	***	50%/NP (75%)
PKP2	2	p.Arg79*	x	DCM	DCM	X	X	x	**	100%/NPC (50%)
PKP2	7	p.Thr526Met	x	DCM	SNP p=0,99	BE SC=0,032	P (0)	x	NO	
PKP2	13	p.Val837fs*930	x	DCM	DCM p=0,99	X		x	**	25%/NP (50%)
PKP2	4	IVS4-11T>C	x		x	X		NO AFECTA SPLICING		100%/NP (50%)
DSC2	4	p.Ala133Thr	x	NDM	SNP p=0,87	BE SC=0,008	N (2)	x	***	0
DSC2	7	p.Gly286Val	x	UV	SNP p=0,98	BE SC=0,266	P (2)	x	*	0
DSC2	16	p.Glu896fs*900	x	NPV	DCM p=1	X		x	***	44,44%/C (94%)
DSC2	2	p.Leu37Leu	rs12954874	SNP	SNP p=0,72 (TGP)	X		x	*	
DSG2	15	p.Ala969Val	x	NDM	DCM p=0,67	PD SC=0,976	N (5)	x	**	100%/NP (50%)
DSG2	15	p.Val920Gly	x	DCM	SNP p=0,94	BE SC=0,154	P (0)	x	**	50% C ?
DSG2	13	p.Gly638Arg	x	DCM	DCM p=0,87	PD SC=0,999	P (3)	x	**	100%/NPC (50%)
JUP	9	p.Ala521Ala	rs149926974	NPV	SNP p=0,72	X		x	*	100%/NP (50%)
JUP	2	p.Thr19Ile	x	DCM	DCM p=0,59	PSD SC=0,514	N (3)	x	**	100%/NPC (50%)
PLN	2	p.Arg14del	x	DCM	DCM p=1	X		x	***	37,5%/C (87%)
LMNA	10	p.Arg545His	rs142191737	NDM	DCM p=0,999	PSD SC=0,816	P (4)	x	***	33,3%/NP (50%)
LMNA	4	p.Arg225*	x	DCM	DCM p= 1	X	X	x	***	100%/NP (50%)
LMNA	6	p.Arg321*	x	DCM	DCM p= 1	X	X	x	***	100%/NP (50%)

DCM: mutación causal de enfermedad, **NPV:** variante no patogénica, **NDM:** mutación no descrita, **SNP:** Polimorfismo, **UV:** variante desconocida, **BE:** benigna, **PD :** probablemente dañina, **PSD:** posiblemente dañina, **p:** probabilidad; **SC:** score; **C:** cosegrega, **NC:** no cosegrega, **NPC:** imposible calcular la cosegregación, **P:** patogénica, **N:** neutral; *****: poco conservado; ****:** parcialmente conservado; *****:** altamente conservado; **NO:** no conservado

2.1 FAMILIAS DIAGNOSTICADAS DE MAVD CON GENOTIPO POSITIVO

- **FAMILIA 1 (H14)**

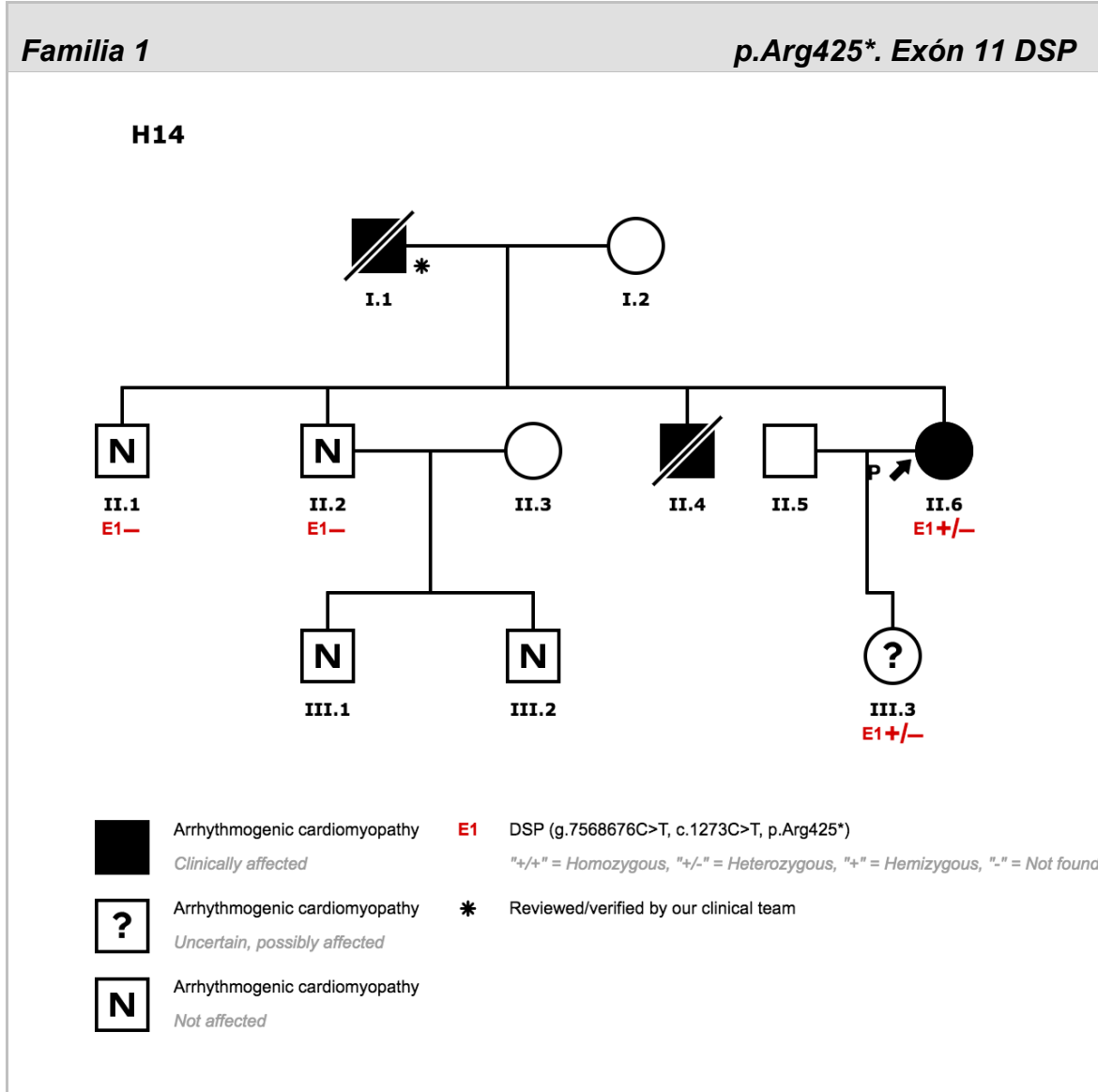


Figura 19. Árbol genealógico de la familia 1.

Características clínicas de la familia

El caso índice (II.6) es una mujer de 43 años de edad, afectada de MAVD y que presenta disnea y dolor torácico. Presenta un ECG con complejos QRS de bajo voltaje y se le realiza ecocardiografía con la que se observa disfunción del VI moderada. Se le implanta un DAI. La probando tiene 3 hermanos de los que solo uno de ellos (II.4), afectado, fallece a los 26 años a consecuencia de lo que parecía una MA con afectación biventricular. Los otros dos hermanos (II.1 y II.2) poseen fenotipo normal al igual que los dos hijos de

uno de ellos (III.1 y III.2). La hija de la probando (III.3) tiene fenotipo desconocido y su padre presuntamente también estaba afectado.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante encontrada en esta familia, p.Arg425*/g.26807C>T, es una mutación con frecuencia desconocida localizada en el exón 11 del gen DSP. Es una mutación que provoca un truncamiento de la proteína ya que se produce por un codón de stop y está referenciada en la base de datos HGMD como mutación causante de la patología.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

La predicción del efecto de la sustitución del aminoácido R por un codón stop X en el residuo 425 utilizando el software Mutation Taster, con un score de 1 (rango de probabilidad de 0-1) (Tabla 9).

La variante p.R425* es una variante poco conservada entre especies. El residuo R425 se encuentra parcialmente conservado en humano, chimpancé, ratón y pollo.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de 4 individuos de la familia. Dos de ellos son portadores de la variante (II.6 y III.3) y dos no portadores o *wildtype* (II.1 y II.2) Hay una penetrancia de un 50% y la mutación cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 2 (H248)**

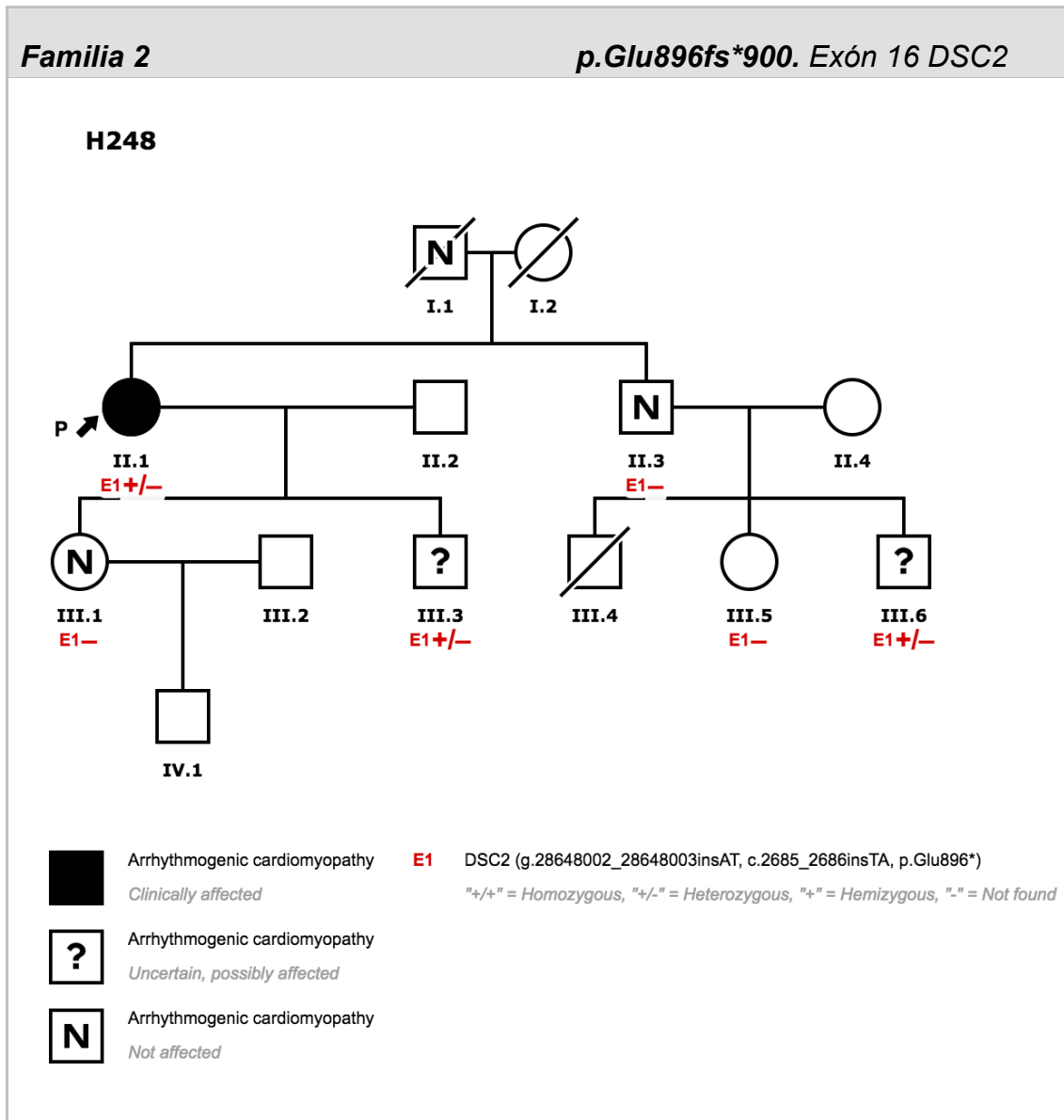


Figura 20. Árbol genealógico de la familia 2.

Características clínicas de la familia

El caso índice (II.1) es una mujer de 65 años asintomática hasta el momento del ingreso por un presíncope. Se le realiza una RMN diagnóstica de MAVD y se le implanta un DAI monocameral por prevención primaria. Tanto el padre (I.1) como el hermano (II.3) y una hija de la probando (III.1) tienen un fenotipo normal. Tiene un hijo con fenotipo dudoso (III.3).

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Glu896fs*900*, está localizada en el exón 16 del gen DSC2 (concretamente en el dominio C-terminal de este gen) y es de tipo frameshift. Se trata de una duplicación/inserción en la posición g.34378-9 de los dos nucleótidos GA de la secuencia genómica de DSC2, dan lugar a un transcrito aberrante que si se tradujera provocaría un codón de stop prematuro en el aminoácido 900. El gen DSC2 tiene dos sitios de *splicing* alternativos que codifican las isoformas a y b de la proteína. Ambas se diferencian en la longitud del extremo C-terminal, siendo la isoforma b más corta (producto de un codón de stop adicional en el exón 16). El exón 16 codifica para el dominio intracelular de la secuencia de tipo caderina (ICS) y se expresa solamente en la isoforma a. El frame shift provocado por esta variante produce un codón de stop prematuro y la alteración de los últimos 5 aminoácidos de la isoforma a (tres cambian y los 2 finales se pierden). Estudios funcionales in-vitro demostraron que la isoforma a truncada producida se localiza en el citoplasma y no en la membrana plasmática como la proteína salvaje. Sin embargo, la isoforma b queda completamente funcional y sería capaz de compensar la deficiencia relativa de la isoforma a. Además, y a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, la isoforma b es la que más se expresa en el corazón y este hecho apoyaría la teoría de compensación entre isoformas.

La variante está referenciada en la base de datos NCBI como variante no patogénica o polimorfismo..

Estudios “in silico” y conservación filogenética

La predicción con Mutation Taster es como patogénica con un score de 1 (rango de probabilidad de 0-1). El software Polyphen-2 no reconoce la variante por lo que no es posible su análisis (Tabla 9).

La mutación afecta a un residuo que se encuentra altamente conservado en humano, chimpancé, macaco, gato, ratón, pollo y rana. El dominio se encuentra totalmente conservado en los 4 primeros niveles. En ratón, pollo, rana, pez zebra y en fugu se encuentra parcialmente conservado.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 6 individuos descritos. Los individuos afectados o posiblemente afectados son portadores de la variante. La penetrancia en esta familia es de un 66,6% y la variante cosegrega con la enfermedad.

- **FAMILIA 3 (H260)**

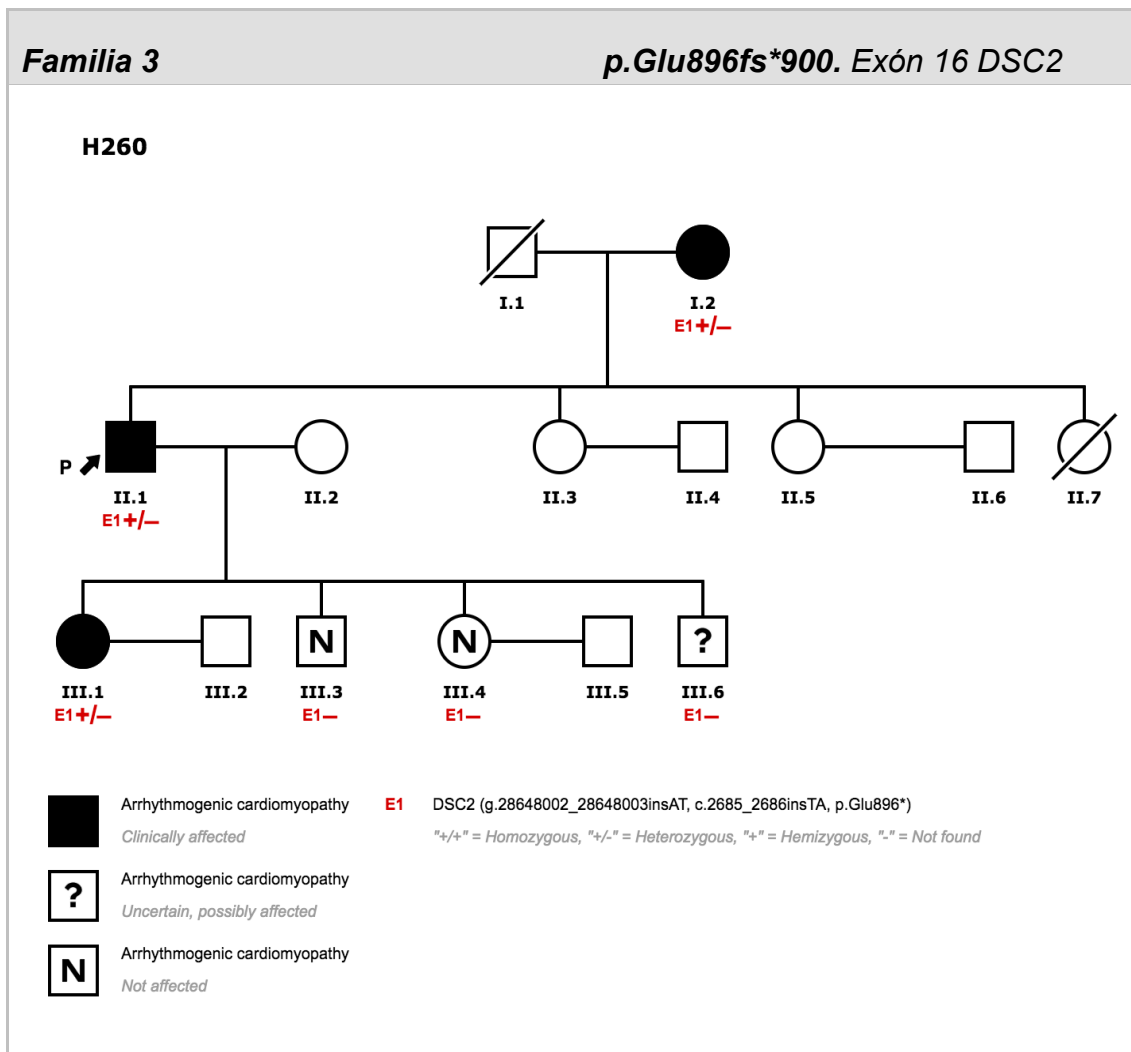


Figura 21. Árbol genealógico de la familia 3.

Características clínicas de la familia

El caso índice (II.1) es un varón de 67 años diagnosticado de MAVD con ecocardiografía normal pero con RMN claramente patológica y presíncopes de poca duración. Lleva implantado un DAI bicameral por prevención primaria. La madre del probando (I.2) tiene fenotipo patológico al igual que una de sus hijas (III.1), un hijo y una hija más con fenotipo normal (III.3 y III.4) y otro hijo con fenotipo dudoso (III.6).

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.E896fs*900*, está localizada en el exón 16 del gen DSC2 (concretamente en el dominio C-terminal de este gen) y es de tipo frameshift . Se ha descrito previamente en la familia 2.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto frameshift que produce este codón de stop con los software Mutation Taster, Polyphen-2 y Pmut. La predicción es la misma que en la familia 2.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 6 individuos descritos. El caso índice (II.1), que está afectado, es portador de la mutación al igual que los otros dos individuos con fenotipo patológico (I.2 y III.1). De los otros tres individuos, dos de ellos (III.3, III.4) tienen un fenotipo normal son *wildtype* y el otro (III.6) tiene un fenotipo dudoso y también es *wildtype*. La penetrancia en esta familia es de un 100%, y la variante cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 4 (H289)**

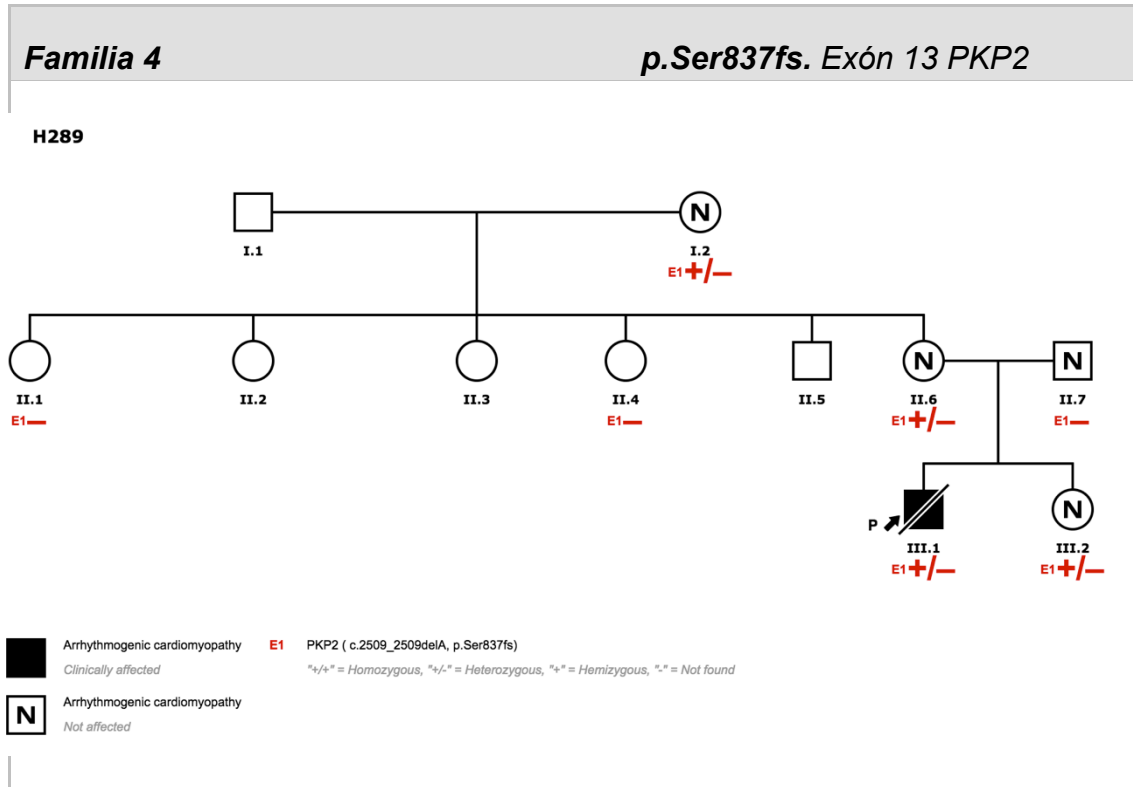


Figura 22. Árbol genealógico de la familia 4.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (III.1) es un varón de 26 años afectado de MAVD que fallece súbitamente mientras practica deporte. Sufría de palpitaciones recurrentes pero se negó a implantarse un DAI. El resto de individuos evaluados en esta familia son sanos.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Ser837fs/g.104134delA*, está localizada en el exón 13 del gen PKP2. Está catalogada en NCBI como variante causal de la enfermedad.

Esta variante es una mutación recurrente en varias familias caucásicas de varios países. Ha sido claramente asociada con el desarrollo de MAVD y se ha demostrado su cosegregación en varias familias aunque con penetrancia incompleta.

La delección de un nucleótido de adenina en la posición g.104135 de la secuencia genómica de PKP2 da lugar a un transcrito aberrante que si se

traduce daría lugar a un nucleótido de parada prematuro en el aminoácido 930 que se encuentra en el dominio C-terminal de la placofilina.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

La predicción con Mutation Taster es como patogénica con un score de 0.99 (rango de probabilidad de 0-1). El software Polyphen-2 no reconoce la variante por lo que no es posible su análisis (Tabla 9).

La mutación afecta a un residuo V837 que se encuentra conservado en humano y 4 especies más: chimpancé, macaco, ratón y pollo. El dominio se encuentra totalmente conservado en chimpancé, macaco y ratón y parcialmente conservado en pez cebra y en drosófila.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 7 individuos descritos en esta familia. El caso índice (III.1) además de estar afectado era portador de la variante *p.V837fs*930*. La hermana (III.2), la madre (II.6) y la abuela del probando (I.2) también son portadoras de la variante, pero tienen fenotipo normal. El resto de individuos son *wildtype*.

La penetrancia en esta familia es de un 25%. No podemos estudiar la cosegregación ya que solo hay un individuo afectado en la familia.

- **FAMILIA 5 (H291)**

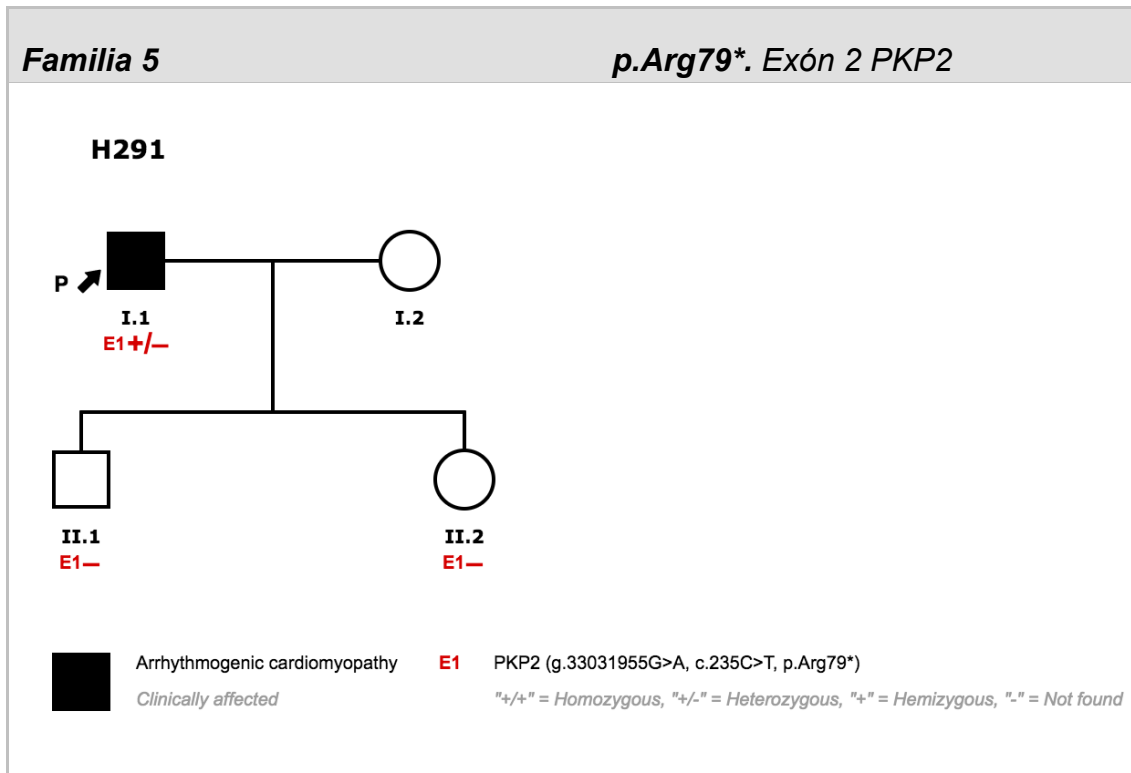


Figura 23.

Características clínicas de la familia

El caso índice (I.1) es un varón fallecido en 2011 afectado de MAVD. Como característica remarcar un complejo QRS de bajo voltaje, ondas T negativas V3-V6 y DIII. Los otros dos individuos estudiados en la familia (II.1 y II.2), hija e hijo del probando, no están afectados.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.R79*/g.17826C>T*, se encuentra localizada en el exón 2 del gen PKP2 y es considerada como mutación ya que no se encuentra presente en controles de la población. Es una mutación que provoca un truncamiento de la proteína ya que se produce por un codón de stop y se encuentra referenciada en la base de datos HGMD como variante causal de la enfermedad.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto de la sustitución del aminoácido Arg por un codón stop en el residuo 79 utilizando 3 softwares: Mutation Taster, Polyphen-2 y Pmut. La predicción con Mutation Taster es

como variante causante de la enfermedad. Polyphen-2 y Pmut no reconocen la variante y no es posible estudiar su patogenicidad con estos software (Tabla 9).

La mutación afecta al residuo R79 que se encuentra conservado además de en humano en 5 especies: chimpancé, macaco, ratón, pez cebra y pollo. El dominio se encuentra parcialmente conservado en las mismas 5 especies.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 3 individuos descritos en esta familia. El caso índice (I.1) además de estar afectado también es portador de la mutación. Los otros dos individuos (II.1 y II.3) hijos del probando, tienen fenotipo normal y genotipo *wildtype*. La penetrancia en esta familia es del 100%. No es posible calcular la cosegregación ya que solo tenemos un individuo portador.

• **FAMILIA 6 (H317)**

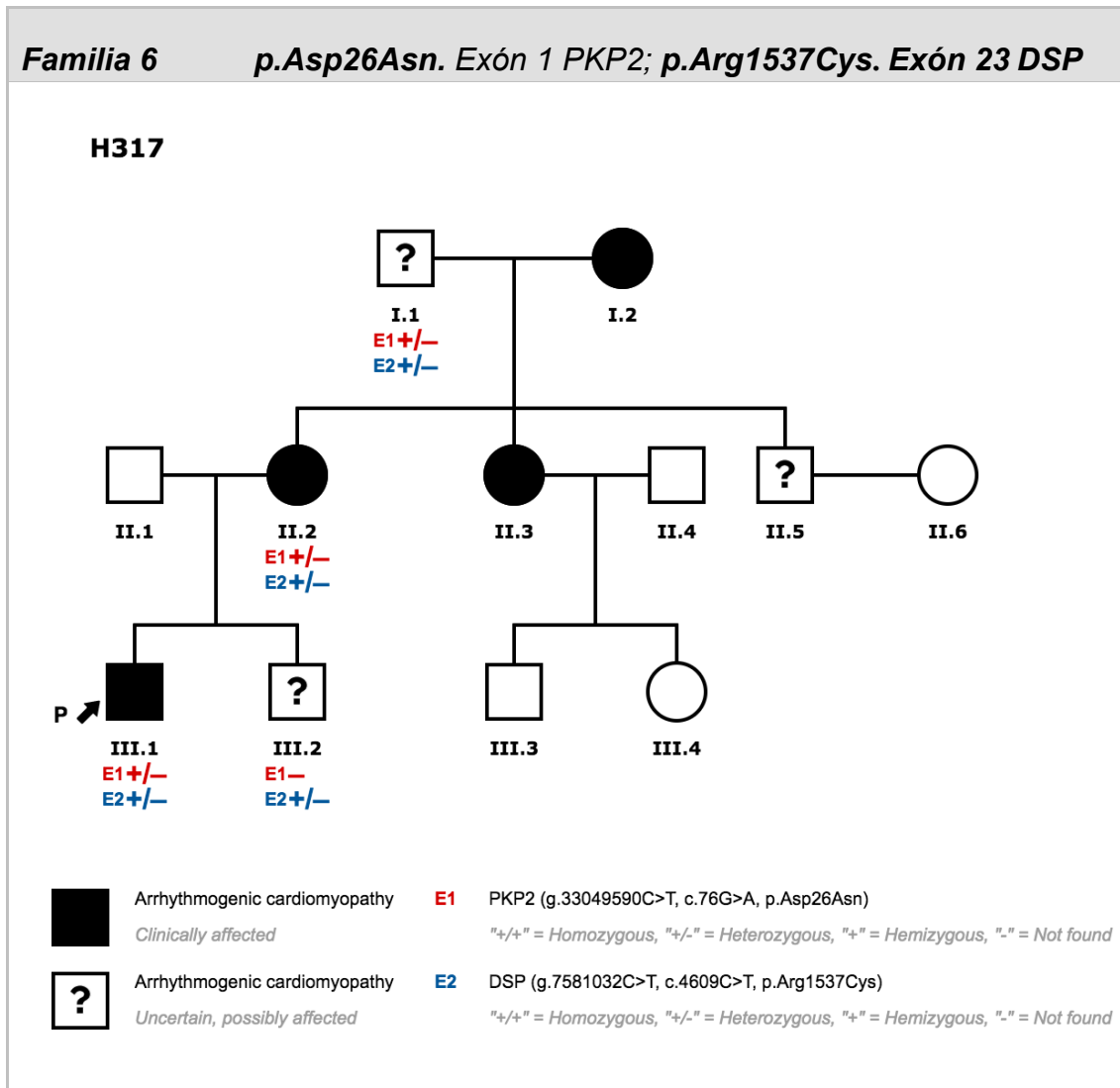


Figura 24.

Características clínicas de la familia

El caso índice (III.1) es un varón de 24 años afectado de MAVD. Sufre dos síncope además de extrasístoles ventriculares muy frecuentes. Se le realiza una RMN diagnóstica con la que se comprueba una función sistólica del VD deprimida. Cumple un criterio mayor y dos menores para el diagnóstico de la enfermedad. Se le implanta DAI monocameral como prevención primaria. Además del probando también están afectadas su madre (II.2), asintomática, su abuela (I.2) y su tía (II.3). Su tío tiene un fenotipo posible/dudoso (II.5), al igual que su abuelo (I.1) y su hermano (III.2) que ha sufrido presíncope y se le

ha realizado una ecocardiografía con sospecha de MAVD. Su padre (II.1) está sano.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

En esta familia se han identificado dos variantes: *p.Asp26Asn/g.191G>A* (ref: rs143004808) en el gen PKP2 y *p.Arg1537Cys/g.39163C>T* (rs28763967) en el gen DSP.

La variante *p.Asp26Asn/g.191G>A* se encuentra localizada en el exón 1 del gen PKP2. Variante hallada por van Tintelen y cols. en un paciente perteneciente a una cohorte holandesa de casos índice con diagnóstico de MAVD.

Afecta a un aminoácido moderadamente conservado (D26N) que produce un cambio de un aminoácido polar ácido (ácido aspártico, D) a polar no cargado (asparagina, D), lo que supone pequeñas modificaciones físico-químicas (distancia escala Grantham=23 [0-215]). El aminoácido 26 se encuentra en el extremo N-terminal de la placofilina, que se ha descrito como el dominio que interacciona con otras proteínas desmosomales como desmoplaquina, desmocolina, desmogleína y filamentos intermedios. Esta variante ha sido referenciada por la base de datos HGMD como mutación causante de la enfermedad (tabla 9).

La variante *p.Arg1537Cys/g.39163C>T* se encuentra localizada en el exón 23 del gen DSP. Esta variante genética ha sido identificada con frecuencia baja en población control. Esta información sugiere que Arg1537Cys es un polimorfismo de baja frecuencia en la población blanca y probablemente no está asociado al desarrollo de enfermedad.

Esta mutación afecta a un residuo altamente conservado (R1537) que produce un cambio de un aminoácido polar positivo básico (arginina, R) (CGC) a otro polar no cargado (cisteína, C) (TGC), lo que supone grandes modificaciones en las propiedades físico-químicas carga, masa, e hidrofobicidad (Distancia Grantham: 180 [0-215]).

El aminoácido R1537 se encuentra en el dominio central a modo de varilla de la proteína, que participa en la formación de la cola dimérica de la desmoplaquina. Esta variante afecta al dominio “rod” o vara de la

desmoplaquina, comprendido entre los aminoácidos 1057 a 1945. Esta región es fundamental para la dimerización de la molécula y la formación de una estructura super-enrollada que sirve de unión a los filamentos intermedios intracelulares. Esta variante está descrita en la base de datos ClinVar como variante benigna o probablemente benigna.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

El efecto de la sustitución del aminoácido D por N en el residuo 26 utilizando software Mutation Taster es como polimorfismo, con un score de 0.83 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es de posiblemente dañina (lo que supone que afecta a la función y a la estructura de la proteína). El Pmut predice que el cambio es neutral con una fiabilidad de 4. En cuanto al efecto de la sustitución del aminoácido R por C en el residuo 1537, la predicción con Mutation Taster es como polimorfismo con un score de 0,71 (rango de probabilidad de 0-1) y Polyphen-2 considera la alteración como probablemente dañina.

La variante p.Asp26Asn afecta al residuo D26 que se encuentra además de en humano conservado en 4 especies: chimpancé, macaco, ratón, pollo y pez cebra. El dominio es idéntico en humano y en estas 4 especies.

La variante p.Arg1537Cys afecta al residuo R1537 que se encuentra conservado en humano y en 4 especies más: chimpancé, macaco, gato y ratón.

Correlación fenotipo-genotipo (penetrancia y cosegregación)

Se ha realizado el estudio genético de 5 individuos de esta familia. El caso índice (III.1) y su madre (II.2) están afectados y ambos portan las dos variantes detectadas en la familia. El abuelo del caso índice (I.1) podría estar afectado y también es portador de ambas mutaciones al igual que su hermano, aunque de este último solo se sabe que es portador de la variante D26N. El padre del probando (II.1) no está afectado y no es portador de ninguna de las dos variantes. La penetrancia en esta familia es del 66,6% y la variante cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 7 (H410)**

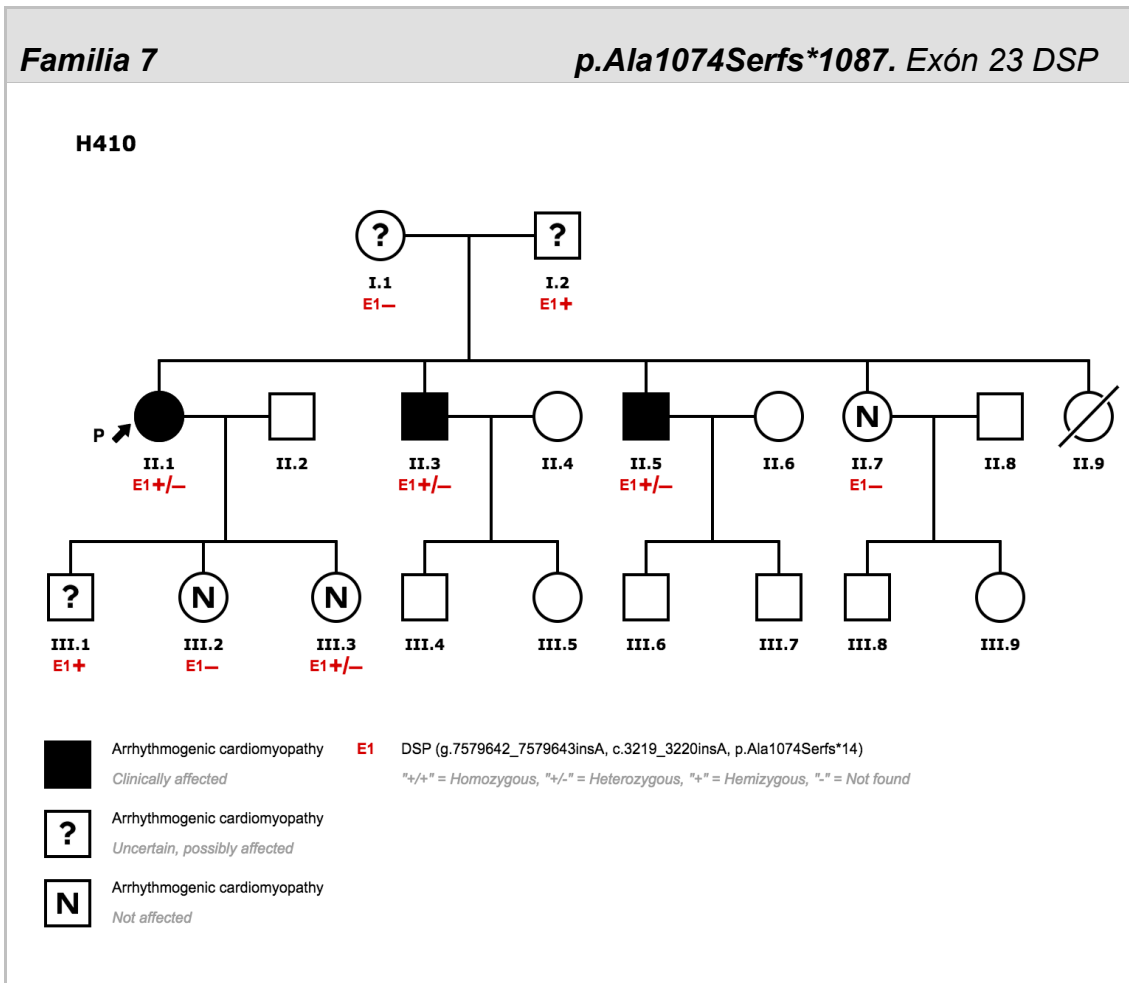


Figura 25. Árbol genealógico de la familia 7.

Características clínicas de la familia

El caso índice (II.1) es una mujer de 49 años de edad afectada de MAVD. Sufre una MS resucitada y se le implanta un DAI monocameral por prevención secundaria. Dos hermanos de la probando (II.3 y II.5) también están afectados pero ambos asintomáticos y una hermana tiene fenotipo normal (III.7). Su madre (I.1) tiene un fenotipo dudoso al igual que su padre (I.2). De los 3 hijos que tiene la probando, dos de ellos (III.2 y III.3) no están afectados de la enfermedad y uno (III.1) tiene un fenotipo probablemente relacionado con la MAVD.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia *p.Ala1074Serfs*1087/g.37773_37774insA*, está localizada en el exón 23 del gen DSP.

Esta variante no ha sido previamente descrita. Afecta al dominio “rod” o “vara” de la desmoplaquina. Esta región es fundamental para la dimerización de la molécula y la formación de una estructura super-enrollada que sirve de unión a los filamentos intermedios intracelulares. La inserción de un nucleótido de adenina produce un cambio de pauta en la lectura del ADN que determina un codón de stop o parada en la posición 1087. Esta alteración provocaría la pérdida de gran parte del dominio “rod” y los subdominios A, B y C del extremo C-terminal de la proteína. Este tipo de mutaciones, que resultan en truncamiento de la molécula de desmoplaquina, son frecuentemente patogénicas y en general se las asume como causa de la enfermedad aunque no hayan sido previamente reportadas. Hay varias mutaciones descritas, y asociadas a MAVD, que están ubicadas muy cerca de la posición 1074 y que producen un efecto de similar. Entre ellas, *p.F1016fs*, *p.E1068Vfs*1086* y *p.R1113X* producen un truncamiento de la proteína muy próximo al que se observaría con *p.A1074Sfs*1087* y que han sido asociadas con MS a edad temprana y compromiso ventricular izquierdo (fundamentalmente dilatación, deterioro ligero de la fracción de eyección y, en algunos casos, hipertrabeculación apical). Otras mutaciones descritas que afectan los mismos dominios también han sido asociadas con afectación dérmica en forma de hiperqueratosis palmoplantar.

En conclusión, si bien esta variante genética no ha sido previamente descrita, la alteración proteica estructural que se deduce de su efecto y la información disponible sobre mutaciones próximas con efecto similar, hacen suponer que muy probablemente esté asociada con el desarrollo de miocardiopatía/displasia arritmogénica.

La variante está catalogada por la base de datos NCBI como variante causante de la enfermedad.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

La predicción según Mutation Taster es que la variante es patogénica y por consiguiente causante de la enfermedad. Polyphen-2 y Pmut no reconocen

esta variante y por lo tanto no se puede predecir su patogenicidad con estos software (Tabla 9).

El residuo A1074 no se encuentra conservado entre especies.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 9 individuos descritos en esta familia. El caso índice (II.1), además de tener fenotipo positivo, es portador de la variante *p.A1074Sfs*1087*. Los dos hermanos de la probando afectados (II.3 y II.5) son también portadores de la mutación. El padre e hijo de la probando (I.2 y III.1), con fenotipo posiblemente relacionado con la enfermedad, también son portadores, y una de sus hijas (III.3), la que tiene un fenotipo normal es a su vez portadora de la variante. La madre de la probando (I.1) tiene un fenotipo dudoso, pero no es portadora. Los dos individuos con fenotipo claramente normal, la hermana y la otra hija del caso índice (II.7 y III.2) son ambas *wildtype*.

La penetrancia en esta familia es de un 50% (3 individuos afectados y 6 portadores), además, la variante cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 8 (H584)**

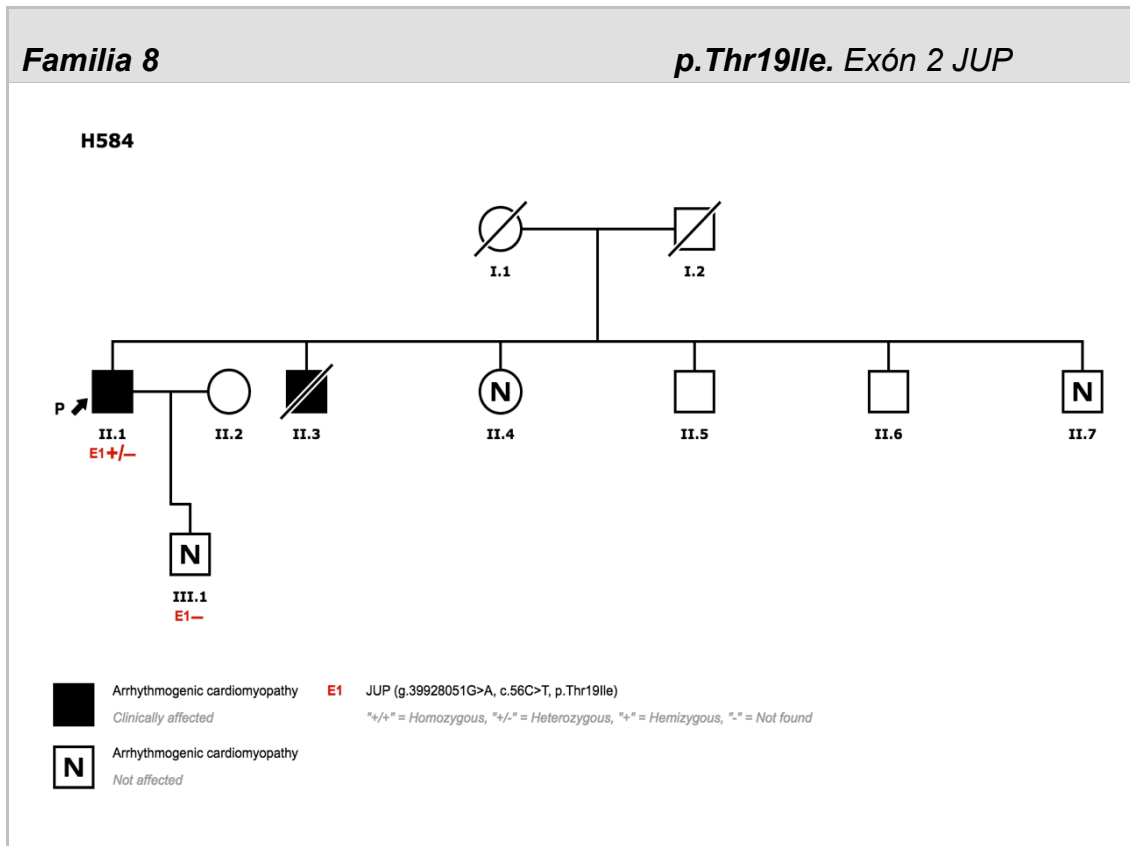


Figura 26. Árbol genealógico de la familia 8.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es un varón de 52 años afectado de MAVD y diagnosticado tras una PCR resucitada. Se le implanta un DAI monocameral por prevención secundaria. Tiene dos hermanos (II.4 y II.7) y un hijo (III.1) no afectados y un hermano patológico (II.3) que sufre una MS. El resto de individuos de esta familia no han sido valorados.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Thr191le/g.14914C>T*, está localizada en el exón 2 del gen JUP.

Esta mutación ha sido descrita en un varón blanco norteamericano, diagnosticado a los 17 años de MAVD, sin historia familiar y que cumple un criterio diagnóstico mayor (alteraciones en la despolarización) y tres criterios menores (alteración en la repolarización, arritmias y alteraciones estructurales).

La variante produce un cambio de un aminoácido polar no cargado (treonina, T) a otro no polar (isoleucina, I), lo que supone moderadas modificaciones fisico-químicas en la masa, polaridad e hidrofobicidad (Distancia Grantham: 89 [0-215]).

El residuo T19 se encuentra en el extremo N-terminal de JUP, que participa en la unión de los filamentos intermedios y el citoesqueleto de la actina con los complejos transmembrana que conectan las células adyacentes. Por lo que una alteración estructural, como ocurre en esta sustitución aminoacídica, podría favorecer un sustrato intercelular inestable y podría impedir tanto la adecuada interacción entre los miocitos como el mantenimiento de la integridad celular.

Esta variante está catalogada en la base de datos HGMD como variante patogénica causal de la enfermedad.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster nos da una predicción de esta variante como patológica con un score de $p=0.59$ (rango de probabilidad de 0-1). Polyphen-2 nos da una predicción de posiblemente patológica con un score de 0,514, una sensibilidad de 0,82 y una especificidad de 0,81. La predicción con PMut es cambio neutral con una fiabilidad de 3 (rango de fiabilidad de 0-9). (Tabla 9).

La mutación afecta al residuo T19 conservado en humanos y 4 especies más: chimpancé, macaco, ratón y rana. El dominio es idéntico en todas las especies anteriores y además en drosophila.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 5 individuos descritos en la familia. El caso índice (II.1) tiene fenotipo positivo y es portador de la variante T19I. Los dos hermanos del probando que siguen vivos (II.4 y II.7) y el hijo (III.1) tienen fenotipo normal y no son portadores de la mutación. Al hermano fallecido por MS (II.3) no ha sido posible realizarle estudio genético.

La penetrancia es de un 33,3% y la cosegregación no es posible determinarla al solo tener un individuo portador de la variante, en este caso el probando.

- **FAMILIA 9** (H657 solo un individuo)

Características clínicas de la familia

El único individuo estudiado en esta familia es el caso índice, un varón de 41 años afectado de MAVD con palpitations de tipo extrasístole. Se encuentra asintomático.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia es una variante de tipo intrónico, *IVS4-11T>C/g.45863T>C* que se encuentra localizada en el intrón 4 del gen PKP2.

La mutación no ha sido descrita previamente ni está catalogada en ninguna base de datos. Está alejada de la zona de corte y empalme y no afecta al *splicing*.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático de la variante *IVS4-11T>C* con el software ESEfinder. Se ha determinado que el cambio no afecta al corte y empalme del ARNm (*splicing*), ya que no detecta descensos superiores al 20%, porcentaje que según Houdayer et al. (2008) podría ser considerado para que una mutación afecte al *splicing* (Tabla 9).

Correlación fenotipo-genotipo

Al ser una familia con un solo individuo afectado portador no es posible calcular la penetrancia. El caso índice tiene tanto fenotipo como genotipo positivos.

• **FAMILIA 10** (H725)

Familia 10

p.S140F. Exón 3 PKP2

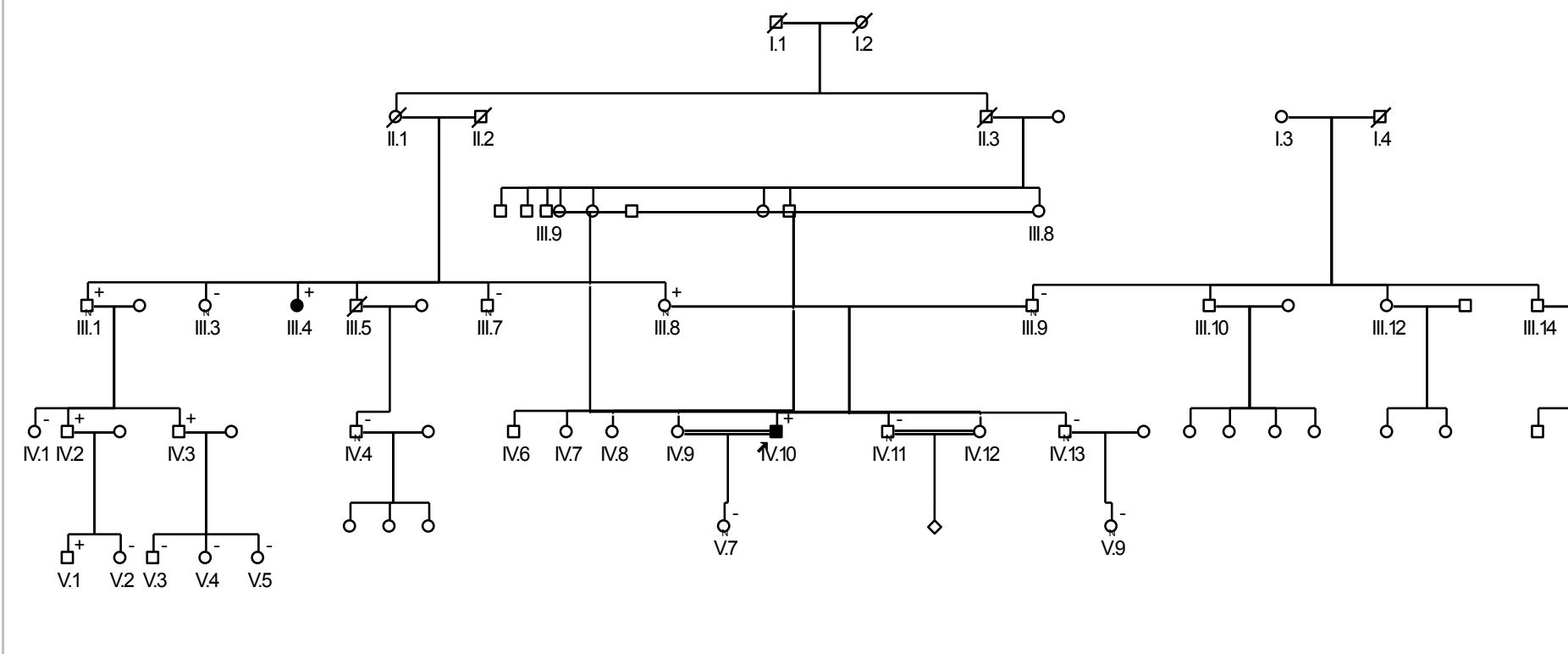


Figura 27. Árbol genealógico de la familia 10.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (IV.10) es un varón fallecido a los 28 años por MS y afectado de MAVD. De los individuos examinados en esta familia, además del probando hay otro afectado claro (III.4) con un VD con hipertrabeculaciones y ecocardiografía muy sospechosa, 17 son normales y 4 tienen un fenotipo posible/dudoso.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.S140F/g.18386C>T* (rs150821281), está localizada en el exón 3 del gen PKP2.

Está descrita en varias familias y asociada con la MAVD, en ocasiones con afectación ventricular izquierda (fenotipo a veces indistinguible de la MCD). Se ha identificado en controles sanos con una frecuencia media aproximada de heterocigosis de 0.5%.

Produce un cambio de un aminoácido polar no cargado (serina, S) a otro no polar (fenilalanina, F), lo que supone grandes modificaciones físico-químicas en la masa, carga e hidrofobicidad (Distancia Grantham: 155 [0-215]).

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como un polimorfismo con un score de 0.92 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es sustitución benigna con un score de 0.007 (rango de score de 0-1). La predicción con PMut es cambio patológico con una fiabilidad de 6 (rango de fiabilidad de 0-9).

La variante *p.S140F* afecta al residuo S140 que se encuentra conservado en humano y 3 especies más: chimpancé, macaco y ratón.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 31 individuos identificados en esta familia. Además del probando (IV.10) portan la variante 6 individuos más (III.1, III.4, III.8, IV.2, IV.3 y V.1) y sólo uno de ellos está además afectado de MAVD. La penetrancia es de un 37,5%.

• **FAMILIA 11 (H719)**

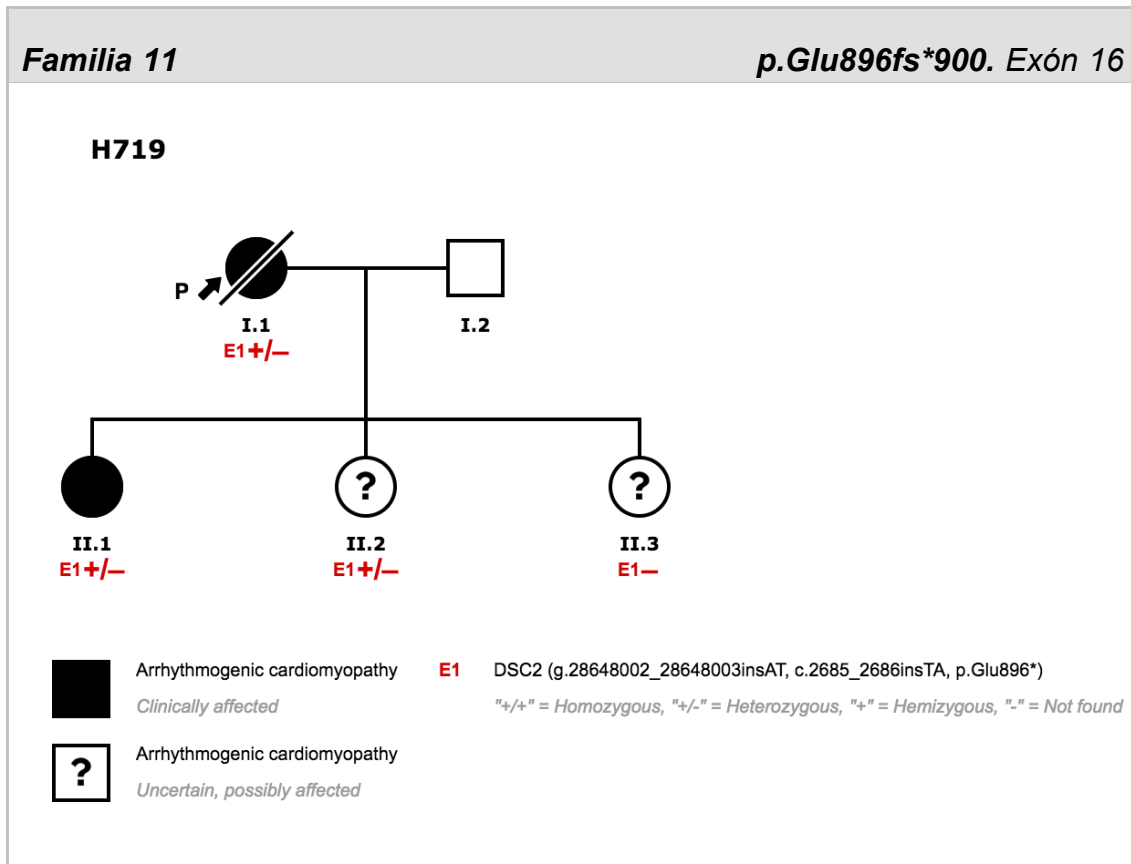


Figura 28. Árbol genealógico de la familia 11.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (I.1) es una mujer de 79 años afectada de MAVD. Con síntomas de IC avanzada fallece en 2011.

Una hija de la probando (II.1) también está afectada pero asintomática. Tiene otras dos hijas que no tienen afectación clara de MAVD pero tienen fenotipo dudoso/sospechoso (II.2 y II.3).

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.E896fs*900*, está localizada en el exón 16 del gen DSC2 (concretamente en el dominio C-terminal de este gen) y es de tipo frameshift . Se ha descrito previamente en la familia 2 y 3.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto frameshift que produce este codón de stop con los software Mutation Taster, Polyphen-2 y Pmut. La predicción es la misma que en la familia 2 y 3.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 4 individuos descritos en esta familia.

La probando (I.1), además de estar afectada es portadora de la mutación p.E896fs*900. La hija afectada (III.1) también es portadora de la variante, al igual que otra de las hijas (II.2) que tiene fenotipo posiblemente asociado a la patología. La hija mayor (II.3) es wildtype.

La penetrancia es de 66.6% y la variante cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 12 (H1214)**

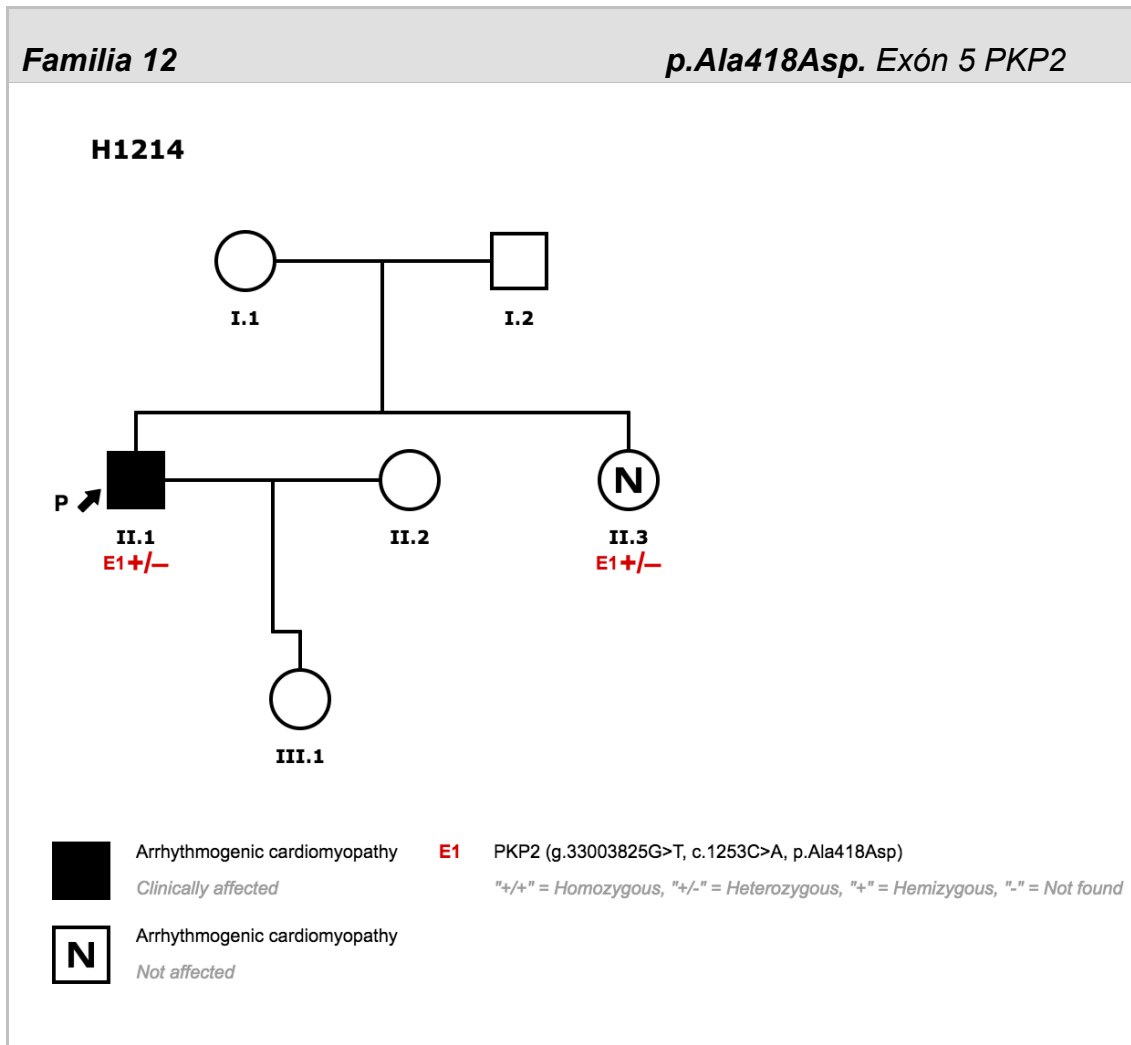


Figura 29. Árbol genealógico de la familia 12.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es un varón de 34 años afectado de MAVD. Diagnóstico por ECG patológico. Tiene TV sostenida presincope antes de un partido de fútbol. Tiene dilatación ligera de VI y disfunción sistólica del VD. Los otros dos individuos estudiados en esta familia, mujer (III.11) y hermana del probando (III.12) tienen un fenotipo normal; no están afectados.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, p.Ala418Asp/g.45956C>A, está localizada en el exón 5 del gen PKP2.

Esta variante no ha sido aun descrita por lo que teniendo en cuenta las miles de muestras secuenciadas hasta la fecha la consideramos mutación.

Afecta un residuo altamente conservado y produce moderadas alteraciones en las propiedades físico-químicas que podrían afectar la estructura/función proteica. A nivel proteico se localiza en el dominio “ARM2” (385-424) de la placofilina. No está catalogada en las bases de datos NCBI/HGMD. Afecta a un residuo altamente conservado (A418) que produce un cambio de un aminoácido no polar (alanina, A) (GCC) a un aminoácido polar positivo ácido (ácido aspártico, D) (GAC), lo que supone moderadas modificaciones en las propiedades físico-químicas tales como la polaridad, hidrofobicidad, la masa y la carga (Distancia Grantham: 126 [0-215]).

Estudios “in silico” y conservación filogenética

La predicción de patogenicidad de esta variante con Mutation Taster es de mutación causante de la enfermedad con un score de $p=0.98$ (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es de probablemente dañina con un score de 0.986 (rango de fiabilidad de 0-1), una sensibilidad de 0.54 y una especificidad de 0.94. La predicción con PMut es neutral con una fiabilidad de 0 (Rango de fiabilidad: 0-9) (Tabla 9).

La variante afecta al residuo A418 que se encuentra conservado en humano y 5 especies más: chimpancé, macaco, ratón, pollo y drosophila.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los individuos descritos en esta familia. El caso índice (II.1) está afectado y es portador de la variante p.Ala418Asp. La hermana del probando (II.3) tiene fenotipo normal y es portadora de la variante.

La penetrancia es de un 50%. No es posible hablar de cosegregación de la variante con la enfermedad puesto que solo está afectado el probando.

• **FAMILIA 13 (H1228)**

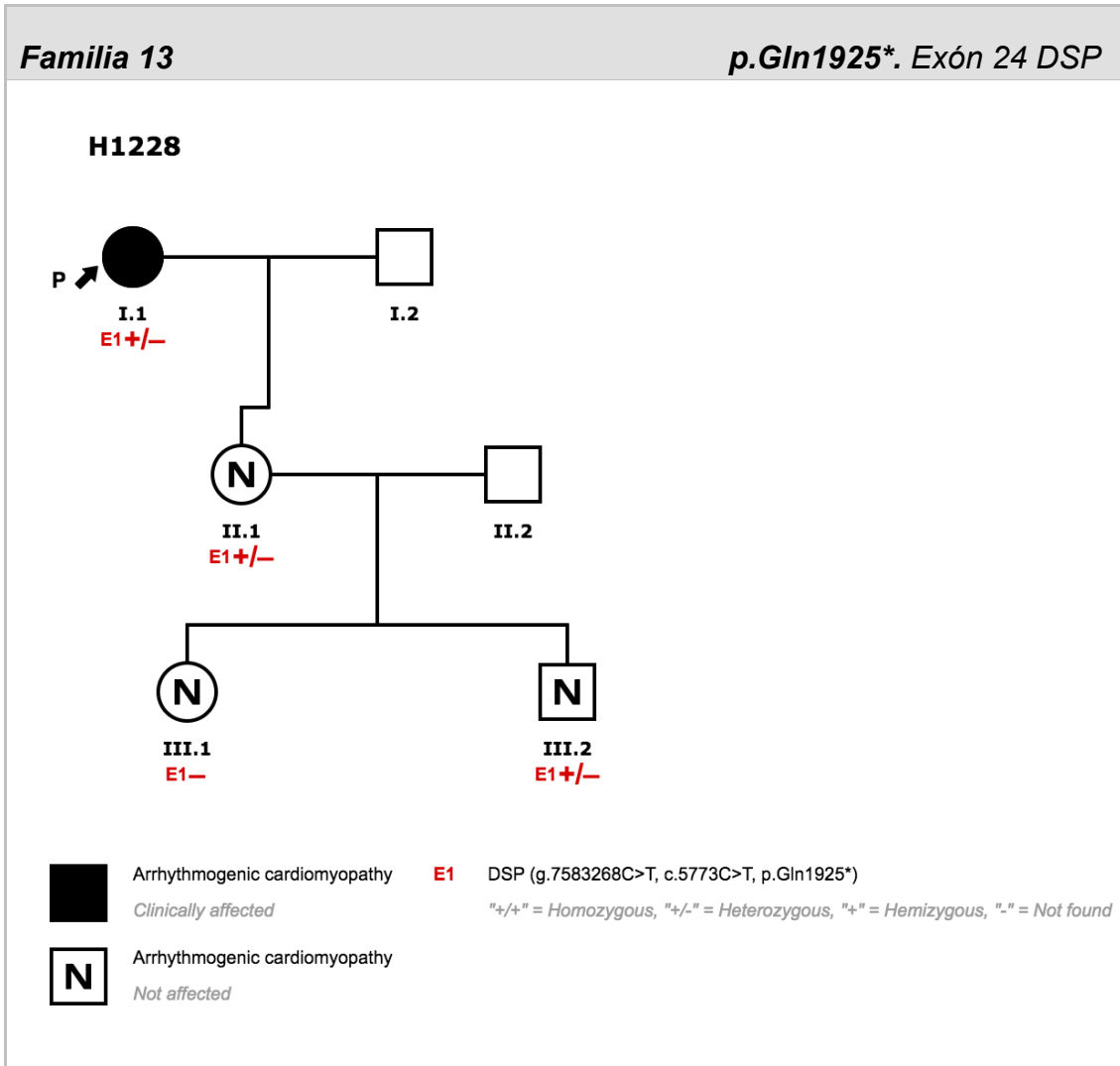


Figura 30. Árbol genealógico de la familia 13.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (I.1) es una mujer de 73 años diagnosticada y afectada de MAVD. Diagnóstico mediante ECG y RMN. Un ingreso en 2011 le hace decidirse para ponerse un marcapasos.

Del resto de individuos estudiados en esta familia, hija (II.1) y dos nietos (III.1 y III.2), no hay ninguno de ellos afectado

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, p.Gln1925*/g.41399C>T, está localizada en el exón 24 del gen DSP.

Afecta al dominio "rod" o vara de la desmoplaquina comprendido entre los aminoácidos 1057 a 1945. Esta región es fundamental para la dimerización de la molécula y la formación de una estructura super-enrollada que sirve de unión a los filamentos intermedios intracelulares. El cambio de C a T en la posición g.41399 de la secuencia genómica de DSP da lugar a un transcrito aberrante que si se tradujera provocaría un codón de stop prematuro en el aminoácido 1925. Esta alteración provocaría la pérdida de gran parte del dominio "rod" y los subdominios A, B y C del extremo C-terminal de la proteína. Este tipo de mutaciones, que resultan en truncamiento de la molécula de desmoplaquina, son frecuentemente patogénicas y en general se las asume como causa de la enfermedad aunque no hayan sido previamente reportadas. En el dominio mencionado han sido descritas hasta el momento una docena de mutaciones con mecanismo fisiopatológico similar.

El aminoácido Q1925 de DSP se encuentra en el dominio central a modo de varilla de la proteína, "*rod domain*" (aminoácidos 1057-1945), que participa en la formación de la cola dimérica de la desmoplaquina. Esta región es fundamental para la dimerización de la molécula y la formación de una estructura súper-enrollada que sirve de unión a los filamentos intermedios intracelulares.

La variante p.Gln1925* no está catalogada en las bases de datos NCBI/HGMD.

Estudios "in silico" y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto de la sustitución del aminoácido Q por un codón *stop* "*" en el residuo 1925 utilizando 3 software: Mutation Taster, Polyphen-2 y Pmut. La predicción con Mutation Taster es como mutación causante de la enfermedad. Polyphen-2 no reconoce la variante por lo que no es posible predecir su patogenicidad con este software. Pmut no reconoce variantes con codón "stop" por lo que tampoco es posible predecir la patogenicidad con este software (Tabla 9).

La variante p.Gln1925* afecta al residuo Q1925 que se encuentra conservado en humano y 4 especies más: chimpancé, macaco, ratón y pollo. El dominio se encuentra parcialmente conservado en estas 4 especies.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 4 individuos descritos en esta familia.

El caso índice (I.1) está afectado de MAVD y es portador de la variante p.Q1925*. Su hija (II.1) tiene fenotipo normal y es portadora de la mutación y de sus nietos, los dos sanos, es portador de la variante el varón (III.2).

Tiene una penetrancia de un 33.3% y no es posible hablar de cosegregación de la variante con la enfermedad puesto que solo hay un individuo afectado.

• **FAMILIA 14 (H1271)**

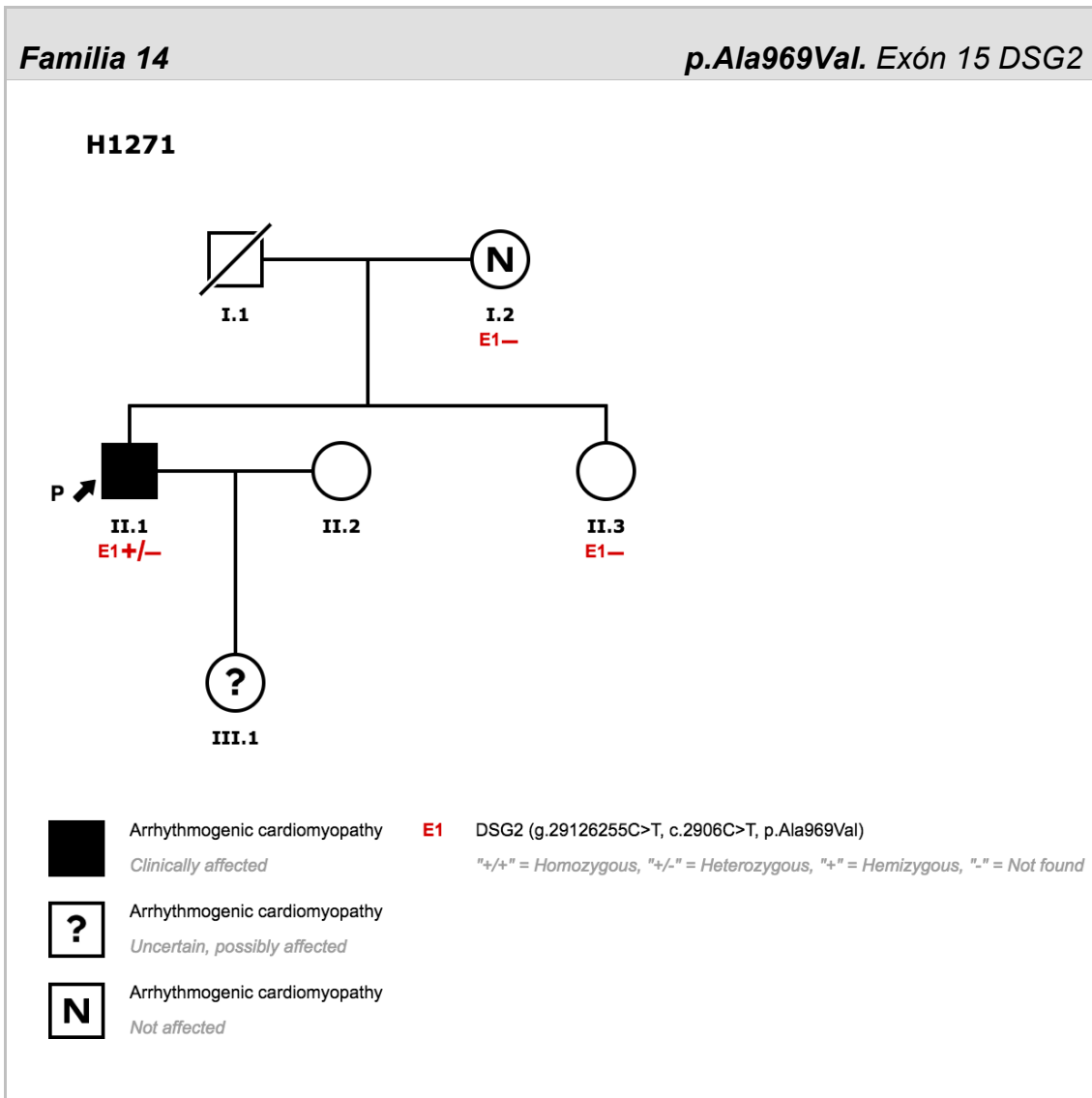


Figura 31. Árbol genealógico de la familia 14.

Características clínicas de la familia

El caso índice (II.1) de esta familia es un varón de 36 años afectado de MAVD. No había sufrido ningún síntoma hasta que fallece súbitamente al parecer a causa de la patología. La hermana del probando (II.3) también está afectada aunque asintomática. Se le diagnostica afectación biventricular por RMN. La madre del probando (I.2) está sana y su hija (III.3) tiene un fenotipo dudoso.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Ala969Val/g.48084C>T*, está localizada en el exón 15 del gen DSG2.

Esta variante genética no ha sido descrita hasta el momento en artículos sobre la materia y no está catalogada en bases de datos como NCBI o HGMD.

La variante *p.Ala969Val* afecta a un residuo altamente conservado (A969), que supone el cambio de un aminoácido no polar (alanina, A) (GCT), a otro no polar (valina, V) (GTT) lo que supone pequeñas modificaciones en las propiedades físico-químicas, hidrofobicidad y masa (Distancia Grantham: 64 [0-215]).

El aminoácido A969 se encuentra en el extremo C-terminal citoplasmático dentro del dominio "RUD" (881-1051), que se predice que forma las láminas beta de la proteína.

Estudios "in silico" y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como causal de la enfermedad con un score de 0.67 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es probablemente dañina con un score de 0,976 (rango de score de 0-1). La predicción con PMut es de sustitución neutral con una fiabilidad de 5 (rango de fiabilidad de 0-9) (Tabla 9).

La variante *p.Ala969Val* afecta al residuo A969 que se encuentra conservado en humano y 4 especies más: chimpancé, macaco ratón y pollo.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de 3 de los 4 individuos identificados en esta familia. El caso índice (II.1), afectado, es portador de la variante *p.A969V*. Tanto la madre (I.1) como la hermana (II.2) del probando son *wildtype*.

La penetrancia en esta familia no es posible calcularla. Del mismo modo no podemos saber si la variante cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 15 (H1313)**

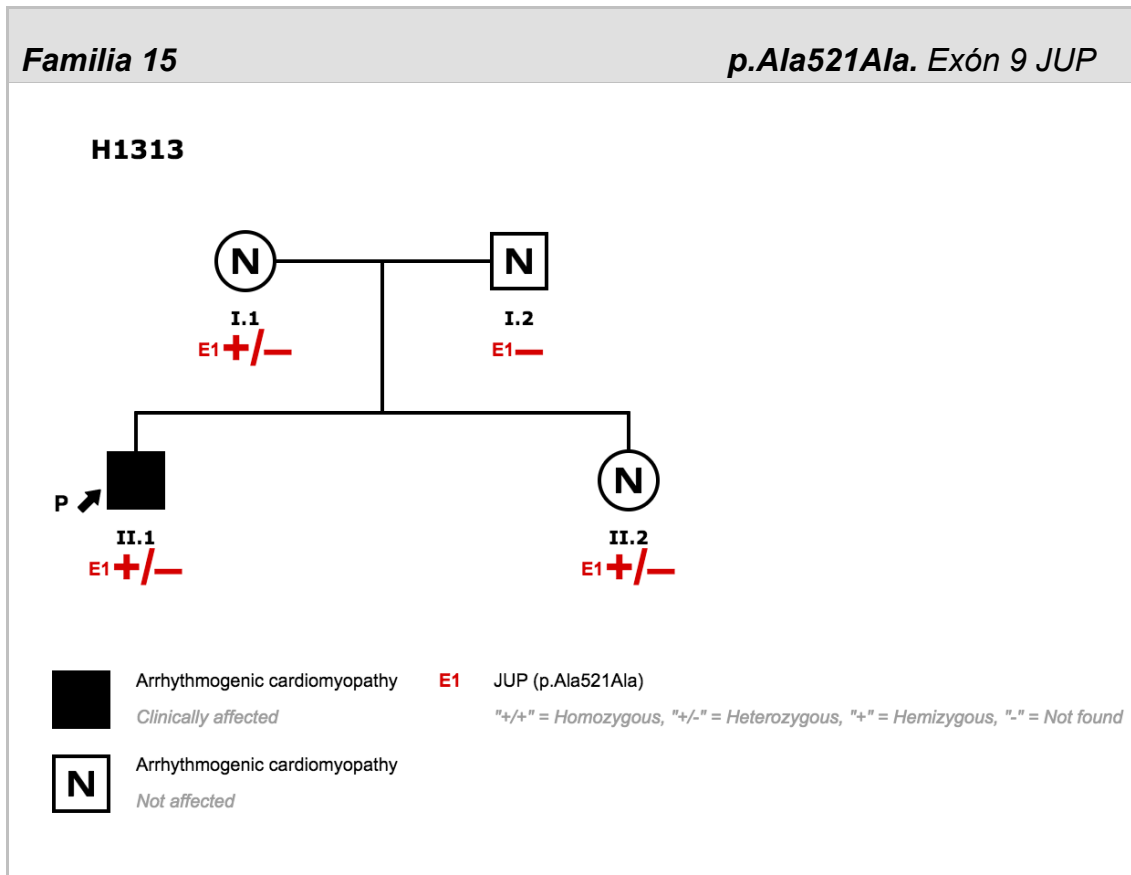


Figura 32. Árbol genealógico de la familia 15.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es un varón de 40 años de edad afectado de MAVD. Hipertrabeculación diagnóstica aunque asintomático; EV frecuentes desde los 16 años.

La hermana (II.2) y padre del probando (I.2) están sanos y su madre (I.1) tiene un fenotipo con sospecha de estar relacionado con la patología.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, p.Ala521Ala/g.27908A>G, está localizada en el exón 9 del gen JUP.

Ha sido catalogada como variante no patogénica en la base de datos HGMD. Ha sido identificada en 2 pacientes de una cohorte Holandesa que incluyó casos con diagnóstico definitivo de miocardiopatía arritmogénica (cumplían criterios diagnósticos según Task Force 2010).

No ha sido informada en la base de datos de polimorfismos del NCBI (PubMed/HapMap) por lo que se trataría de una variante probablemente infrecuente. Sin embargo, al tratarse de una variante “silente” (no produce cambio de aminoácido), no se producirían alteraciones en la estructura/función proteica como tampoco alteraciones en el proceso de corte y empalme del pre-ARNm, ya que se localiza en un punto alejado a la región consenso que participa en este proceso. No se han descrito estudios funcionales.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

La predicción con Mutation Taster es de polimorfismo con un score de 0.72 (rango de probabilidad de 0-1). Polyphen-2 no reconoce la variante por lo que no es posible analizar su patogenicidad con este software (Tabla 9).

La variante p.Ala521A afecta al residuo A521 que solo se encuentra conservado en humano y macaco.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 4 individuos descritos en esta familia. El caso índice (II.1) además de estar afectado de la patología es portador de la variante identificada. Tanto su hermana como su madre (II.2 y I.1), ambas sanas (su madre tiene un fenotipo poco claro), también portan dicha variante. El padre del probando (I.2) está sano y es *wildtype*.

La penetrancia es de 33.3% y no es posible hablar de cosegregación ya que solo hay un individuo afectado claro de MAVD, el caso índice.

2.2 FAMILIAS DIAGNOSTICADAS DE MCD CON GENOTIPO POSITIVO

- **FAMILIA 16 (H238)**

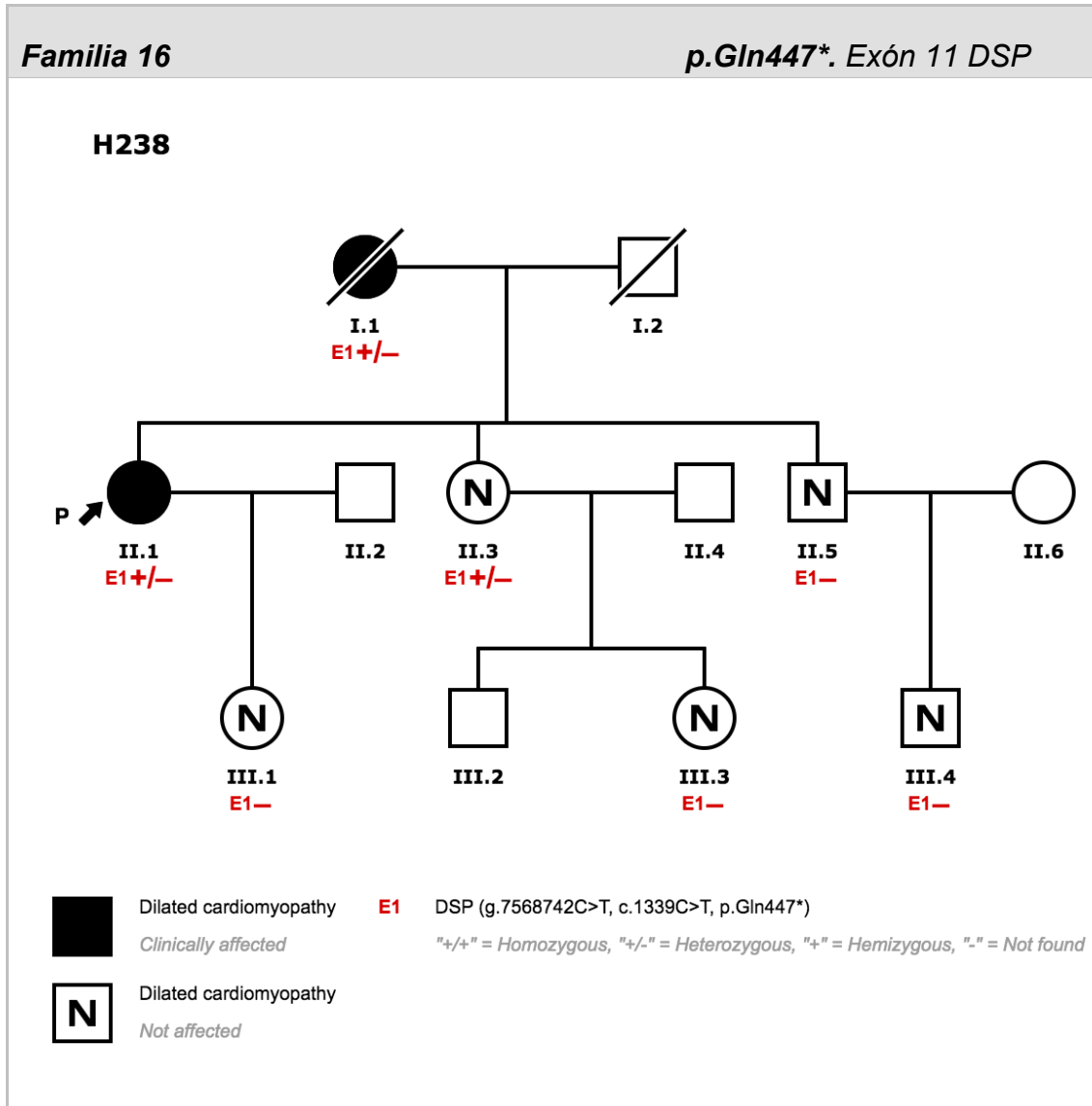


Figura 33. Árbol genealógico de la familia 16.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es una mujer de 56 años afectada de MCD. Síntomas con presíncope y palpitaciones. Se le implanta un DAI monocameral por prevención primaria por TV sincopal. La madre de la probando (I.1), también afectada fue diagnosticada por una TV sintomática antes de la cual estaba asintomática. Se le implanta un DAI y fallece en 2009.

El resto de individuos de la familia están sanos (dos hermanos, dos sobrinos y una hija de la probando).

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Gln447*/g.26873C>T*, está localizada en el exón 11 del gen DSP.

No tenemos constancia de que esta variante genética haya sido descrita previamente, no está catalogada en las bases de datos NCBI/HGMD. La mutación es una transición de C por T en el exón 11 del gen desmoplaquina y crea un codón de stop en la región N-terminal del péptido, que es significativamente más corto que el salvaje, un 85% menor. El aminoácido 477 se encuentra en uno de los dominios de la cabeza globular de la desmoplaquina que participaría en la unión de esta proteína con placoglobina y placofilina.

El cambio de C a T en la posición g.26873 de la secuencia genómica de DSP da lugar a un transcrito aberrante que si se tradujera provocaría un codón de stop prematuro en el aminoácido 447. El aminoácido Q447 se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína DSP (desmoplaquina), en el primer dominio de repetición espectrina (347-447) dentro de la región globular 1 (1-1056). Se ha descrito que la región comprendida entre los aminoácidos 1-584 participa en la unión de esta proteína con placoglobina, placofilina y otros componentes del desmosoma.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

La predicción de patogenicidad con Mutation Taster es de mutación asociada a la enfermedad con un score de 0.97 (rango de probabilidad de 0-1). Polyphen-2 y Pmut no reconocen la variante por lo que no es posible predecir su patogenicidad con estos software (Tabla 9).

La mutación *p.Gln447** afecta a un residuo Q447 que se encuentra conservado en humano y 4 especies más: chimpancé, macaco, ratón y pollo.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 7 individuos identificados en esta familia. El caso índice (II.1), afectado de MAVD es portador de la mutación *p.Gln447X**. Su madre (I.1), afectada, porta también la mutación. Su hermana mediana (II.3), es portadora pero no está afectada por la enfermedad. El resto de individuos de la familia están todos sanos y son todos *wildtype*.

La penetrancia en esta familia es de un 66.6% y la mutación cosegrega con la enfermedad

- **FAMILIA 17 (H264)**

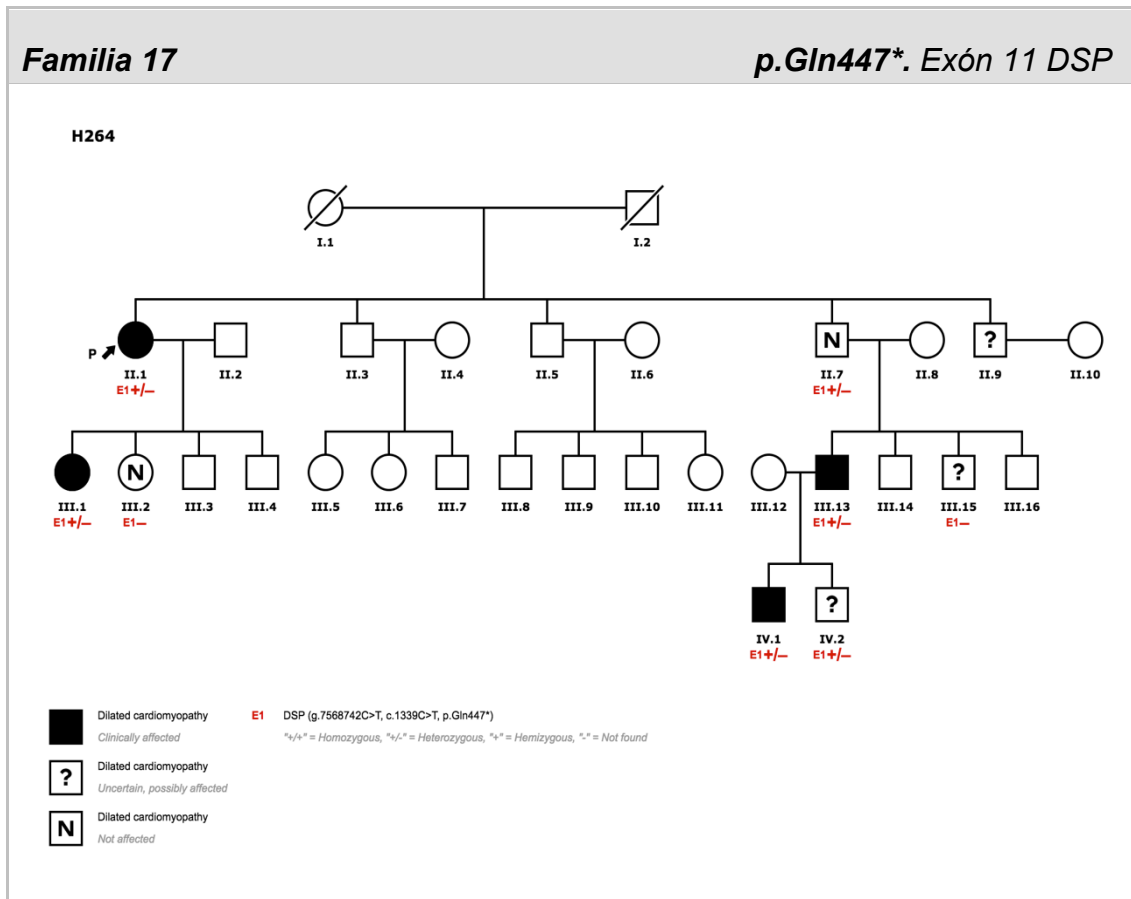


Figura 34. Árbol genealógico de la familia 17.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es una mujer de 71 años afectada de MCD. Tiene leve dilatación y síntomas como NYHA II y presíncopes. De los hermanos de la probando, el mayor (II.7) está sano y el menor (II.9) tiene un fenotipo dudoso. La hija de la probando (III.1) también está afectada aunque prácticamente asintomática. Otro familiar afectado es el sobrino de la probando (III.15), hijo de su hermano mayor no afectado, que tras una parada cardiaca practicando deporte se le implanta DAI. La hija de éste (IV.1), también afectada está asintomática y su hermano (IV.2) tiene fenotipo dudoso como el resto de integrantes de la familia

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Gln447*/g.26873C>T*, está localizada en el exón 11 del gen DSP y ha sido descrita previamente en la familia 16.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto de la sustitución del aminoácido Q por un codón de stop en el residuo 447 utilizando 2 software: Mutation Taster, y Polyphen-2 y Pmut. La predicción es la misma que en la familia 16.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 9 individuos descritos en esta familia.

La probando (II.1), afectada, es también portadora de la variante *p.Gln447**. El resto de individuos afectados por MCD de esta familia (hija, sobrino y sobrina-nieta) también son portadores de la variante.

De los individuos que no están considerados afectados pero que tienen un fenotipo posible, uno de ellos (sobrino-nieto) también es portador de la variante al igual que el hermano de la probando (II.7), aunque éste tiene fenotipo normal. El resto de individuos son *wildtype*.

La penetrancia en esta familia es de un 66.6% y la variante cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 18 (H293)**

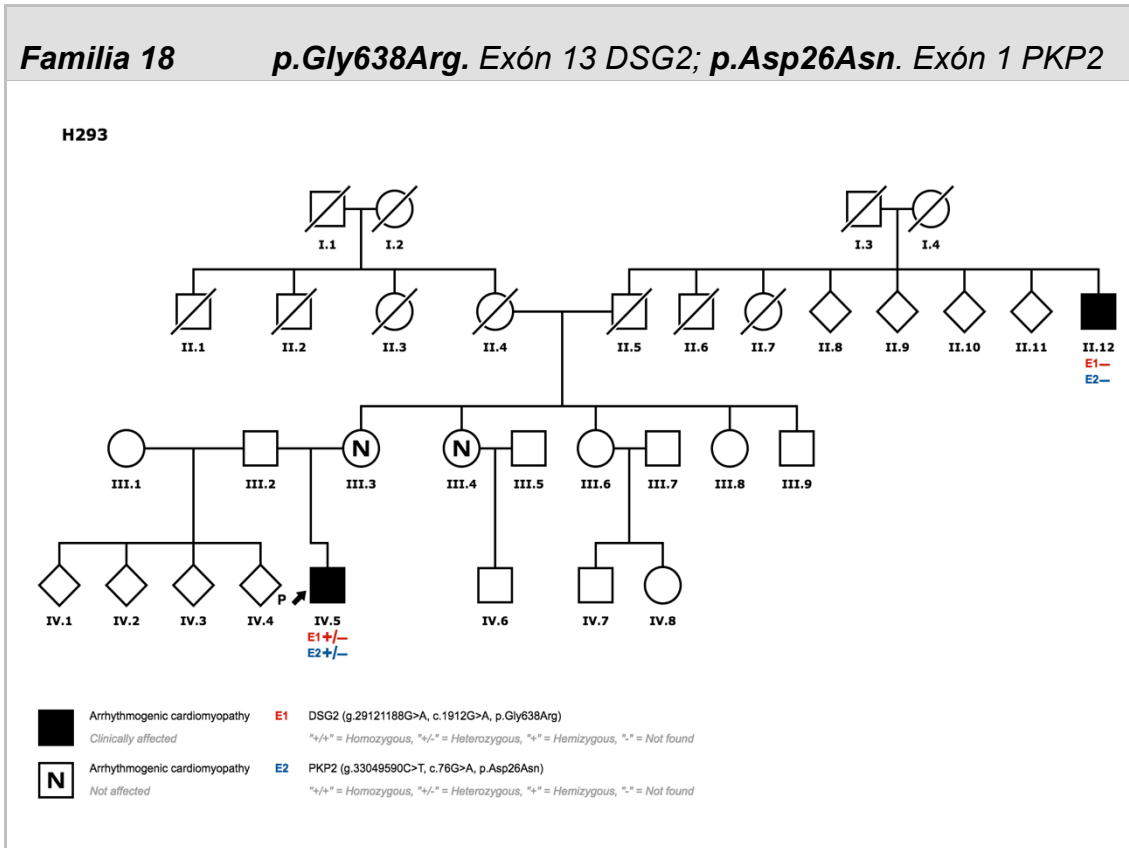


Figura 35. Árbol genealógico de la familia 18.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (IV.5) es una mujer de 34 años afectada de MCD. Tiene síntomas como palpitaciones y extrasístoles que desaparecen con el esfuerzo. Un tío-abuelo de la probando (II.12) también está afectado; diagnosticado a raíz de una IC severa y con síncope por TV sostenida sincopal. Los otros dos individuos examinados en esta familia son normales, madre (III.3) y tía (III.4) de la probando.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

En esta familia se han identificado dos variantes: *p.Gly638Arg/g.43017G>A* y *p.Asp26Asn/ g.191G>A (rs143004808)*.

La primera de ellas, *p.Gly638Arg/g.43017G>A*, está localizada en el exón 13 del gen DSG2. Está catalogada como variante causal de la patología en bases de datos como HGMD/NCBI. Esta variante ha sido informada en

bases de datos públicas de genotipado en población general. Aparece recogida en la base NHLBI GO ESP por haber sido identificada en 2/4134 (0,04%) controles Europeo-Americanos, por lo que constituye una variante genética rara.

El aminoácido 638 se localiza en el dominio de anclaje intracelular citoplasmático de Desmogleína (aminoácidos 635-1118) y dentro de éste, pertenece al dominio de anclaje intracelular (IA) adyacente a la región transmembrana de esta proteína (aa 635-880). Esta región se encuentra altamente conservada, es característica de los miembros de la superfamilia de las cadherinas (desmogleína y desmocolina) y se encarga de mediar la unión de estas proteínas desmosomales a las cateninas (plakoglobina y plakofilina).

La mutación *p.Gly638Arg* afecta a un residuo altamente conservado (G638), que supone el cambio de un aminoácido no polar (glicina, G) (GGA) a otro polar positivo básico (arginina, R) (AGA). El cambio supone modificaciones moderadas en algunas de las propiedades físico-químicas, como la polaridad, la carga, la hidrofobicidad y la masa, entre la glicina y la arginina (distancia Gratham:125[0-215]).

La segunda variante, *p.Asp26Asn/g.191G>A (rs143004808)*, se ha descrito anteriormente en la familia H317.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como causal de la enfermedad, con un score de 0.87 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es que la variante es probablemente dañina con un score de 0.999 (rango de score de 0-1). La predicción con PMut es de patogénica con una fiabilidad de 3 (rango de fiabilidad de 0-9) (Tabla 9).

La variante *p.G638R* afecta al residuo G638 que se encuentra conservado en humano y 4 especies más: chimpancé, macaco, ratón y pollo.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de dos individuos de esta familia. El caso índice de la familia (IV.5), además de estar afectado, es portador de las dos mutaciones encontradas. El otro individuo estudiado, el tío-abuelo de la probando (II-12) está afectado pero no es portador de ninguna de las dos

mutaciones. La penetrancia es del 50% y las variantes no cosegregan con la enfermedad.

• **FAMILIA 19 (H330)**

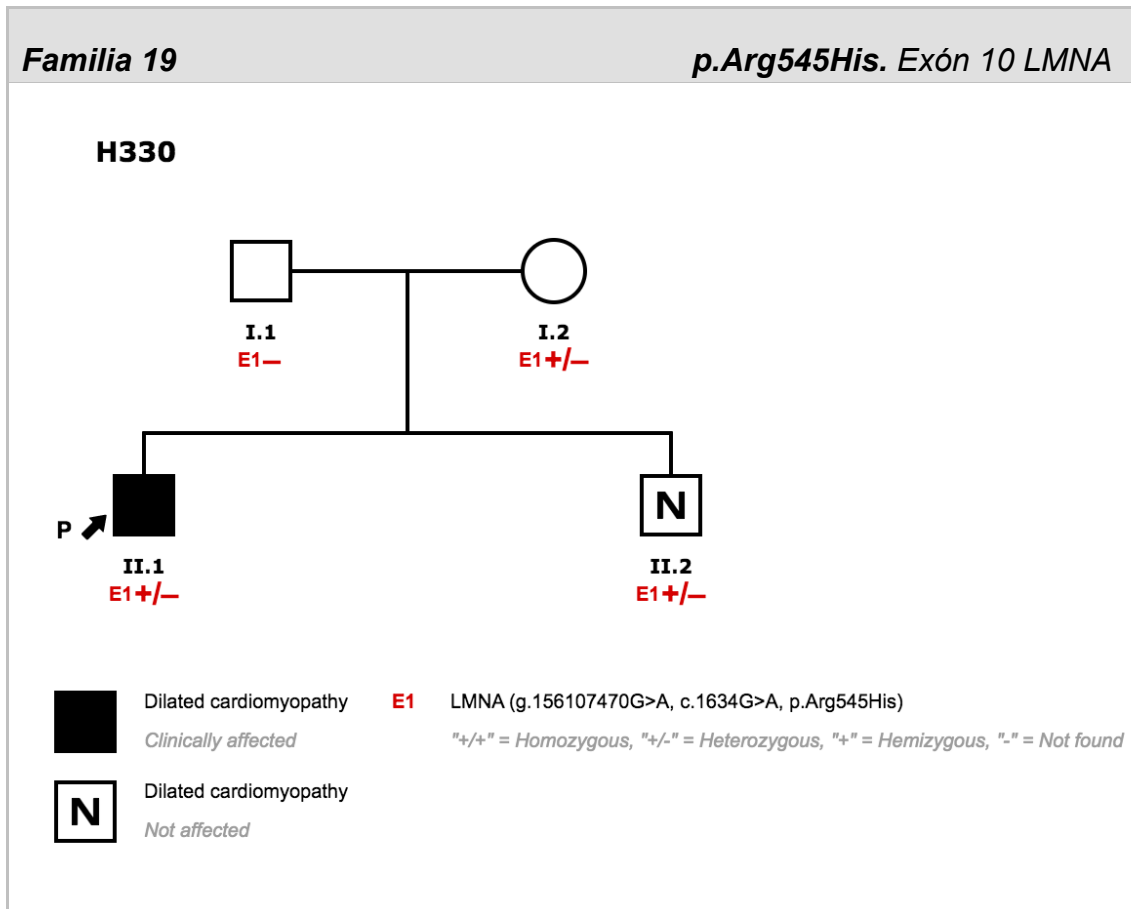


Figura 36. Árbol genealógico de la familia 19.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es un varón de 22 años afectado de MCD posiblemente biventricular sobre todo del VI (56mm). El diagnóstico se le realiza de forma casual por ECG de la federación de fútbol. Tiene un VI dilatado con disfunción sistólica moderada e hipertrabeculación. Tiene extrasístoles ventriculares por lo que se realiza una ablación por radiofrecuencia del foco arritmogénico con buena respuesta.

Ni sus padres (I.1 y I.2) ni su hermano (II.2) parece que estén afectados.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Arg545His/g.22973G>A* (rs142191737) se encuentra localizada en el exón 10 del gen LMNA.

Es una variante que no aparece catalogada en las bases de datos NCBI/HGMD ni en la literatura. Hasta el momento ha sido detectada en heterocigosis en 3 de 4241 sujetos de origen europeo (MAF: 0.0354) y en 0 de 105

2167 sujetos afro-americanos. No se dan detalles del fenotipo de estos portadores (Proyecto 5000 Genomas/Exome Variant Server).

La mutación p.Arg545His afecta a un residuo altamente conservado (R545) que produce un cambio de un aminoácido polar positivo básico (arginina, R) (CGC) a otro polar positivo básico (histidina, H) (CAC), lo que supone pequeñas modificaciones en las propiedades físico-químicas de masa e hidrofobicidad (Distancia Grantham: 29 [0-215]).

El aminoácido R545 se encuentra en el dominio cola C-terminal de la LMNA (aminoácidos 384-664). Adyacente a un dominio inmunoglobulina que está involucrado en las interacciones proteína-proteína (aminoácidos 436-544).

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como causal de la enfermedad con un score de 0.999 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es posiblemente dañina con un score de 0.816 (rango de 0-1), una sensibilidad de 0.74 y una especificidad de 0.87. La predicción con PMut es patológica con una fiabilidad de 4 (rango de fiabilidad: 0-9) (Tabla 9).

La variante p.Arg545His afecta al residuo R545 que se encuentra conservado en humano y 8 especies más: *Ptroglyodytes*, *Mmulatta*, *Mmusculus*, *Trubripes*, *Drerio*, *Fcatus*, *Dmelanogaster* y *Xtropicalis*.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 4 individuos descritos en esta familia.

El caso índice (II.1), afectado de MCD es portador de la variante R545H. El hermano del probando (II.2), sano, también porta la variante al igual que su madre (I.2). El padre (I.1) está sano y es *wildtype*.

La penetrancia en esta familia es de 33.3% y no es posible estudiar la cosegregación con la enfermedad ya que solamente hay un afectado portador.

• **FAMILIA 20 (H402)**

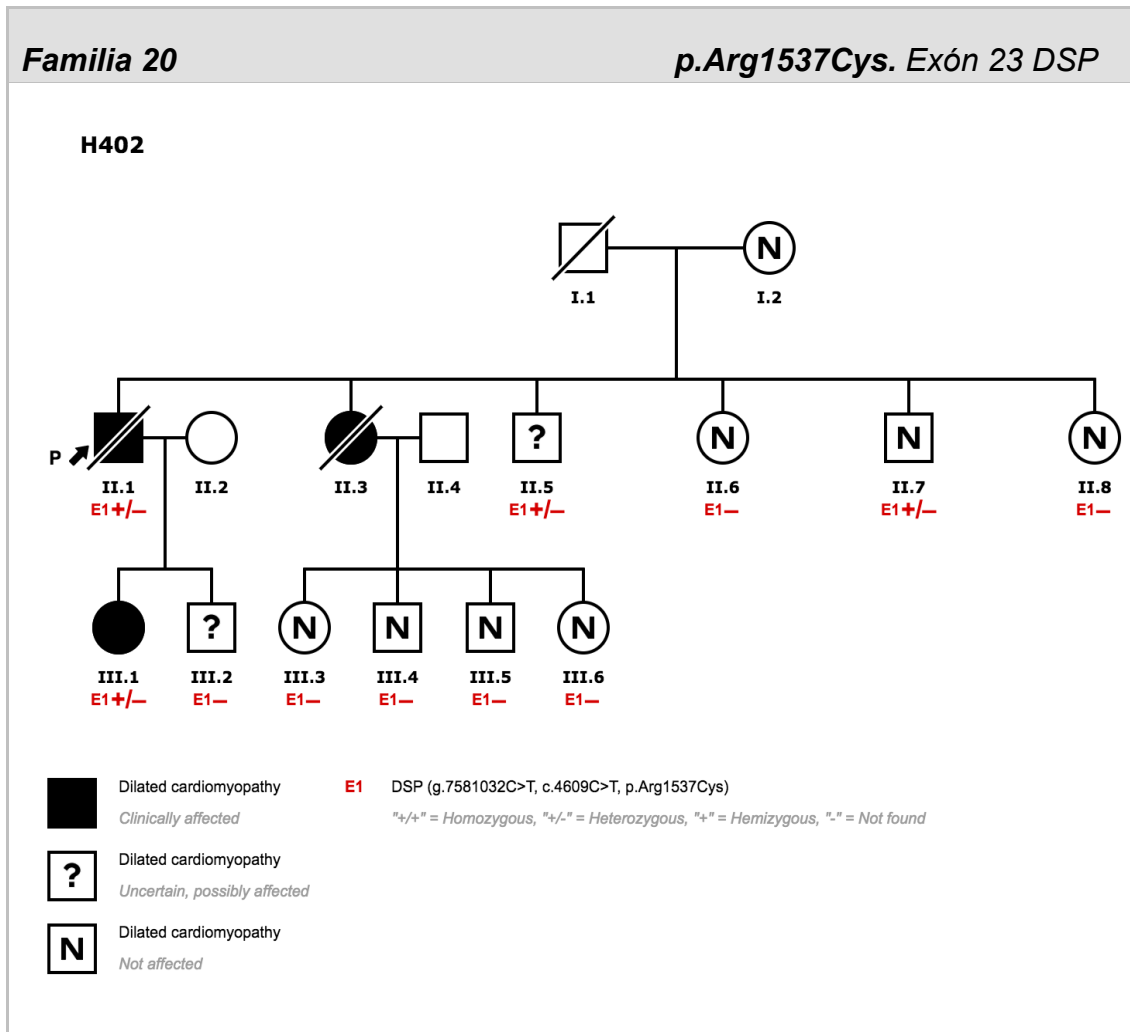


Figura 37. Árbol genealógico de la familia 20.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es un varón de 59 años afectado de MCD con hipertrabeculación clara y al que se le implanta un DAI por prevención primaria. Fallece tras un ingreso por una IC severa con fallo derecho. Hay dos individuos más afectados en esta familia; una hermana (II.3) del probando a la que no se pudo examinar por haber fallecido y la hija del probando (III.1) que se encuentra asintomática.

Se han examinado a 11 individuos más en esta familia. Ocho de ellos están sanos y dos tienen un fenotipo dudoso.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Arg1537Cys/g.39163C>T* (rs28763967), está localizada en el exón 23 del gen DSP.

Esta variante genética ha sido identificada con frecuencia baja en población control. Esta información sugiere que p.R1537C es un polimorfismo de baja frecuencia en la población blanca y probablemente no está asociado al desarrollo de enfermedad. No se encuentra catalogada en las bases de datos NCBI/HGMD.

La variante p.Arg1537Cys afecta a un residuo altamente conservado (R1537) que produce un cambio de un aminoácido polar positivo básico (arginina, R) (CGC) a otro polar no cargado (cisteína, C) (TGC), lo que supone grandes modificaciones en las propiedades físico-químicas carga, masa, e hidrofobicidad (distancia Grantham: 180 [0-215]).

El aminoácido R1537 se encuentra en el dominio central a modo de varilla de la proteína, que participa en la formación de la cola dimérica de la desmoplaquina. Esta variante afecta al dominio “rod” o vara de la desmoplaquina, comprendido entre los aminoácidos 1057 a 1945. Esta región es fundamental para la dimerización de la molécula y la formación de una estructura super-enrollada que sirve de unión a los filamentos intermedios intracelulares.

Además de la mutación en DSP se ha identificado otra mutación en esta familia en el gen MYBPC3.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como un polimorfismo con un score de 0.71 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2, es probablemente dañina con un score de 0,965 (Rango de score: 0-1). La predicción con PMut es patológica con una fiabilidad de 3 (Rango de fiabilidad: 0-9) (Tabla 9).

La variante p.Arg1537Cys afecta al residuo R1537 que se encuentra conservado en humano y en 4 especies más: chimpancé, macaco, gato y ratón.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de 13 de los 14 individuos descritos en esta familia. El caso índice (II.1), que está afectado, es portador de la

variante p.Arg1537Cys. La hija del probando (III.1), además de estar afectada también es portadora de la variante. De los 9 individuos con fenotipo normal, 2 son portadores de la variante y 7 son *wildtype*. El hermano del probando que tiene fenotipo patológico también es portador.

De los individuos portadores, sólo el probando es también portador de la otra mutación en el gen MYBPC3.

La penetrancia en esta familia es de 40% y la variante cosegrega con la enfermedad.

• **FAMILIA 21 (H477)**

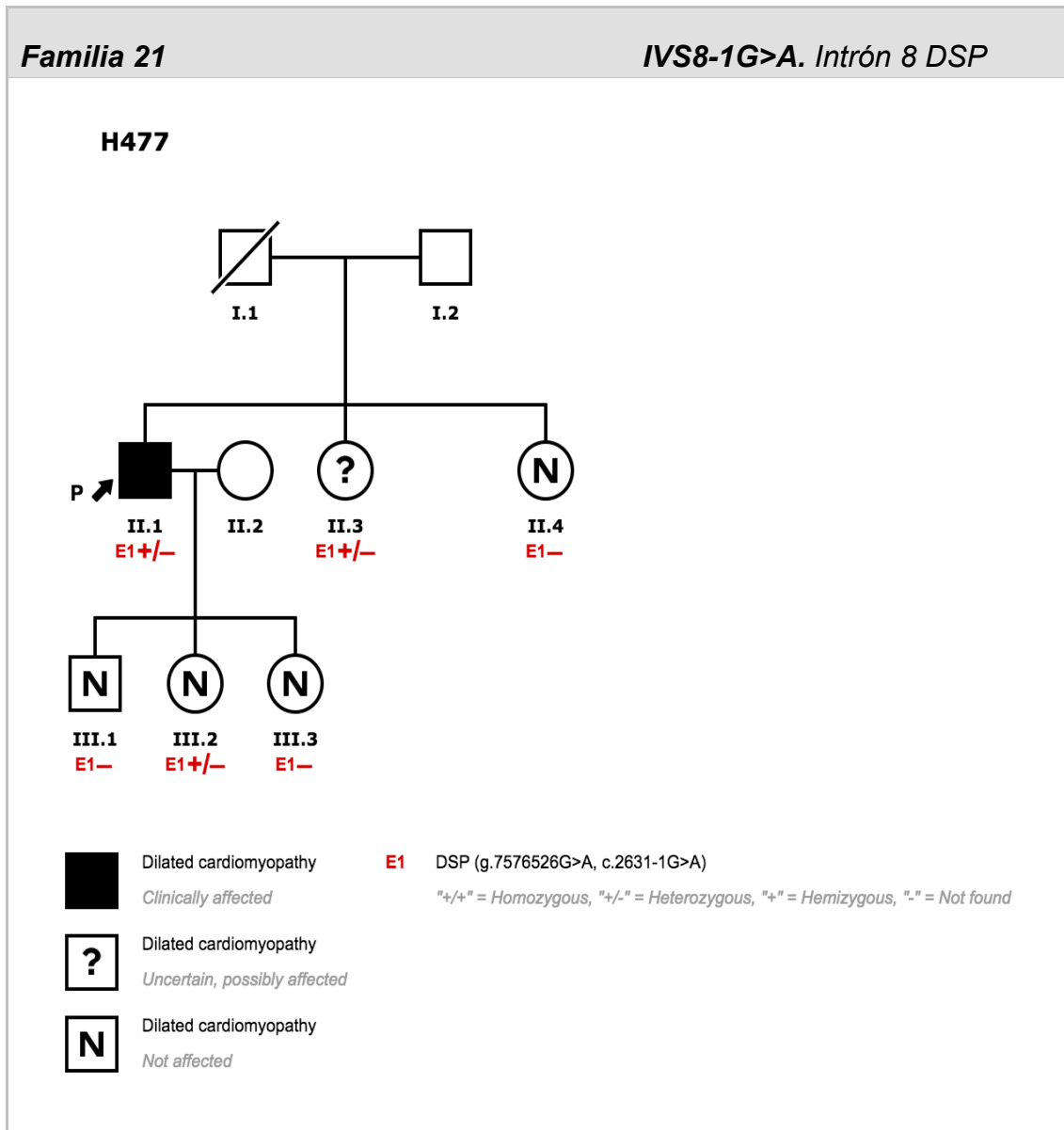


Figura 38. Árbol genealógico de la familia 21.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es un varón de 68 años afectado de MCD. Diagnosticado por un ingreso por TV sostenida con disfunción sistólica que posteriormente recupera. Tiene complejos QRS de bajo voltaje. Tras una tomografía axial computarizada que muestra disfunción sistólica severa se le implanta un DAI monocameral por prevención primaria.

De las dos hermanas del probando, una (II.4) está sana y la otra tiene fenotipo posible/dudoso (II.3). El resto de individuos estudiados de la familia están sanos (III.1, III.2 y III.3).

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *IVS8-1G>A*, está localizada en el intrón 8 del gen DSP pudiendo estar afectando al proceso de corte y empalme. No ha sido identificada hasta la fecha en bases de datos públicas de genotipado de población general.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto de la variante sobre el *splicing* utilizando el software ESEfinder, el cual nos dice que el cambio afecta al donador de *splicing* (Tabla 9).

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 6 individuos descritos en esta familia. El probando (II.1), que está afectado, es además portador de la variante *IVS8-1G>A*. La hermana del probando con fenotipo normal no es portadora (II.5), y la que tiene un fenotipo dudoso porta la variante (II.3). Los hijos mayor y pequeño del probando (III.1 y III.3) están sanos y además son *wildtype*. La otra hija, sana, porta la variante del padre (III.2).

La penetrancia en esta familia es de 33.3% pero no es posible determinar la cosegregación al haber estudiado únicamente a un individuo afectado y portador.

• **FAMILIA 22 (H758)**

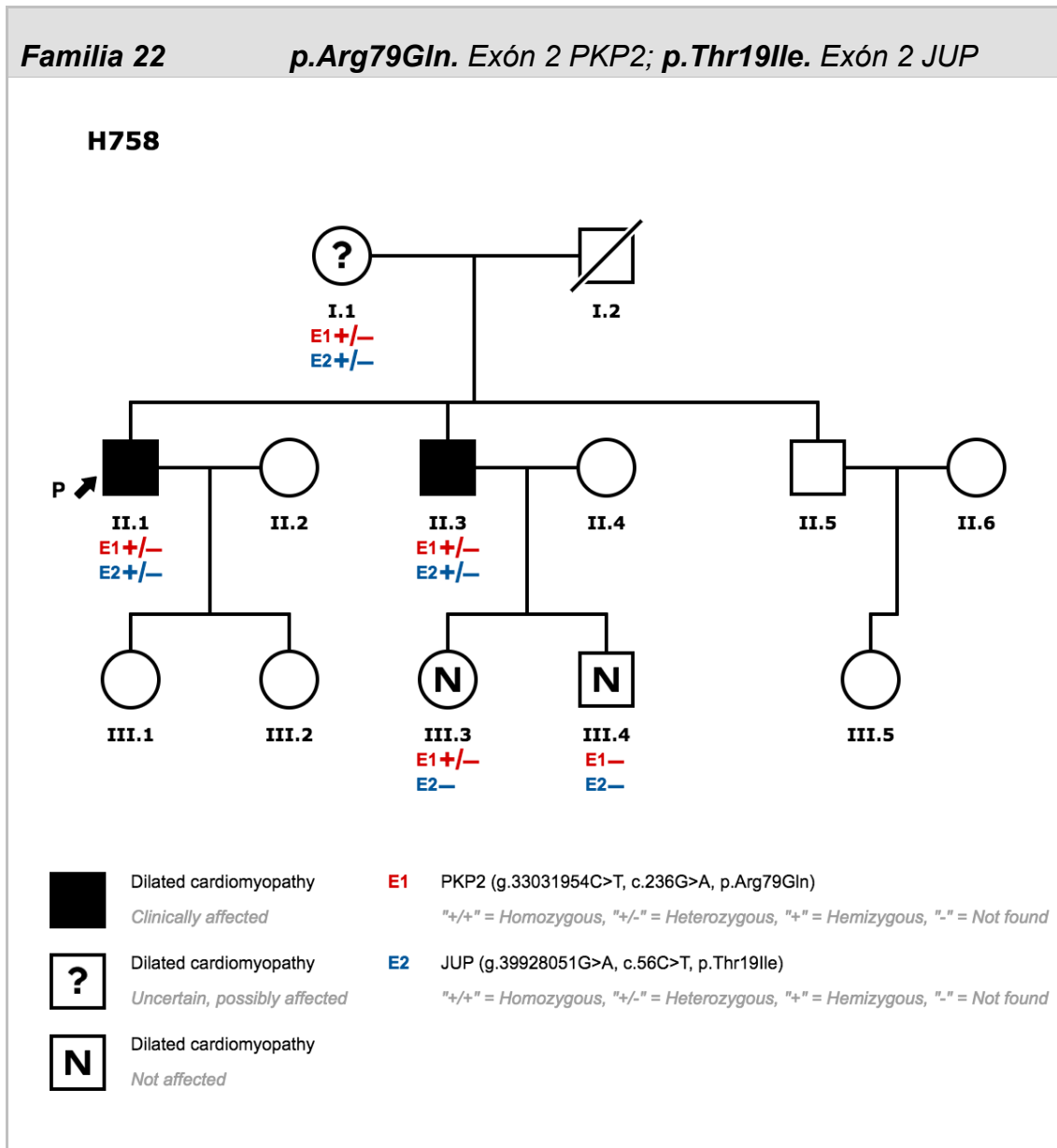


Figura 39. Árbol genealógico de la familia 22.

Características clínicas de la familia

El caso índice (II.1) de esta familia es un varón de 52 años afectado de MCD. Diagnóstico a raíz de ingreso por AIT. Sufre una MS resucitada en 2009 y se le implanta DAI tricameral por prevención secundaria. Ingresa por 4 descargas del DAI y tiene un episodio de TVNS. El hermano del caso índice (II.3) también está afectado, tiene TVNS en holter de 7 días y se le implanta un DAI monocameral por prevención secundaria. La madre del probando (I.1) no está afectada aunque tiene un fenotipo dudoso posiblemente asociado a la

patología y sus sobrinos (III.3 y III.4), hijos del hermano afectado, están ambos sanos.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Arg79Gln/g.17826C>T*, está localizada en el exón 2 del gen desmosómico PKP2. La variante se encuentra catalogada en la base de datos HGMD como variante causal de la enfermedad.

No se encuentra presente en controles. La mutación afecta a un residuo altamente conservado (R79) que produce un cambio de un aminoácido polar positivo básico (arginina, R) a polar no cargado (leucina, L), lo que supone un cambio de carga y pequeñas modificaciones en la masa e hidrofobicidad. R79 se encuentra en el extremo C-terminal de la placofilina-2.

Se ha identificado una segunda variante en esta familia, *p.T19I/g.14914C>T*, descrita en la familia H584.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto de la sustitución del aminoácido R por otro Q en el residuo 79 utilizando 3 software: Mutation Taster, Polyphen2 y PMut. Mutation Taster reconoce la variante como causal de la enfermedad. La predicción con Polyphen es de sustitución benigna. La predicción con PMut es patológica con una fiabilidad de 0 (Rango de fiabilidad: 0-9) (Tabla 9).

La mutación afecta a un residuo altamente conservado entre especies (R79).

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 5 individuos de esta familia. El probando (II.1), afectado es también portador de la variante *p.R79Q* y de la variante *p.T19I*. A su hermano afectado (II.3) le ocurre lo mismo, porta ambas variantes. La madre del probando (I.1), con un fenotipo posiblemente asociado a la patología, también es portadora de las dos variantes. Su sobrina menor, sana, también porta la variante *p.Arg79Gln* pero no es portadora de *p.T19I*, y su otra sobrina, que tampoco está afectada es *wildtype* para ambas variantes.

La penetrancia en esta familia para esta variante, que cosegrega con la enfermedad es de 50%.

• **FAMILIA 23 (H780)**

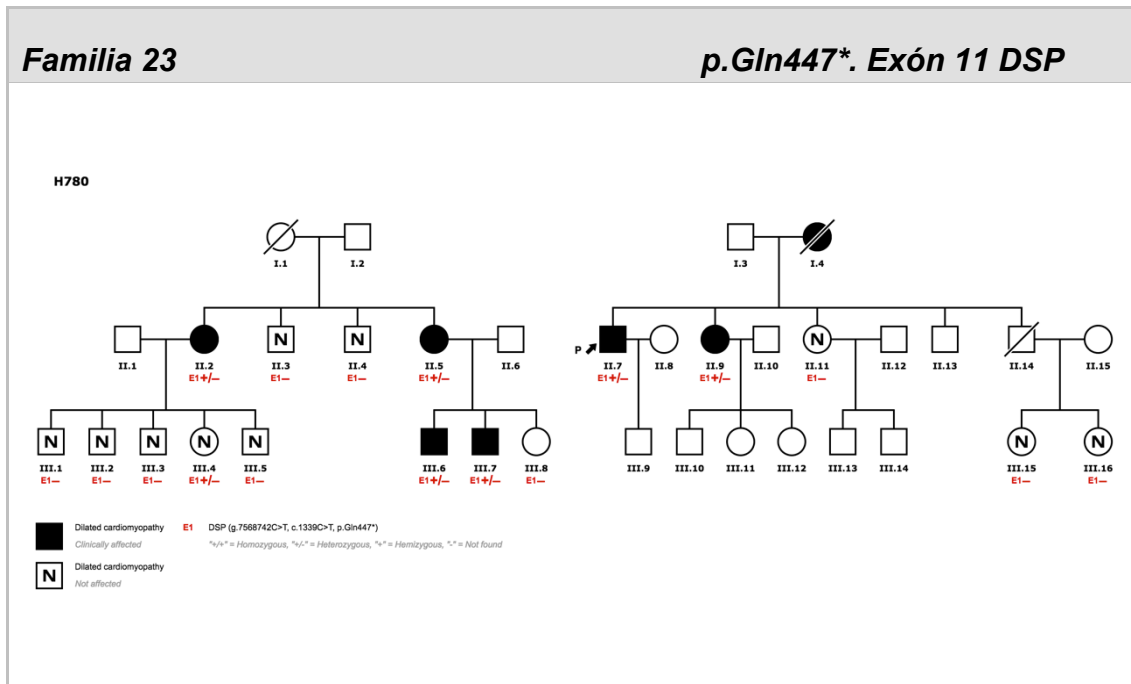


Figura 40. Árbol genealógico de la familia 23.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.7) es un varón de 41 años afectado de MCD con antecedentes de muerte con origen cardíaco en la familia. Tiene disfunción ventricular severa, complejos QRS de bajo voltaje y se le ingresa por TV sostenida. Se le implanta un DAI monocameral por prevención secundaria. Hay 7 individuos más afectados en esta familia. Dos de ellos, madre y tía del probando han sufrido MS; el resto de afectados llevan implantado DAI monocameral por prevención primaria. Los afectados de menor edad no tienen síntomas. Otros 10 individuos de esta familia están sanos y 4 tienen fenotipo dudoso posiblemente asociado con la patología.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Gln447*/g.26873C>T*, está localizada en el exón 11 del gen DSP y ha sido descrita previamente en la familia 16 y 17.

Estudios “in sílico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto de la sustitución del aminoácido Q por un codón de stop en el residuo 447 utilizando 2 software:

Mutation Taster, y Polyphen-2 y Pmut. La predicción es la misma que en la familia 16 y 17.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de 21 de los 22 individuos descritos en esta familia. El caso índice (II.7), afectado, porta la variante p.Gln447*. Los otros 7 afectados también son portadores de la variante y además, uno de los individuos con fenotipo dudoso (prima-hermana del probando) también la porta. Los individuos sanos son *wildtype*.

- **FAMILIA 24 (H1113)**

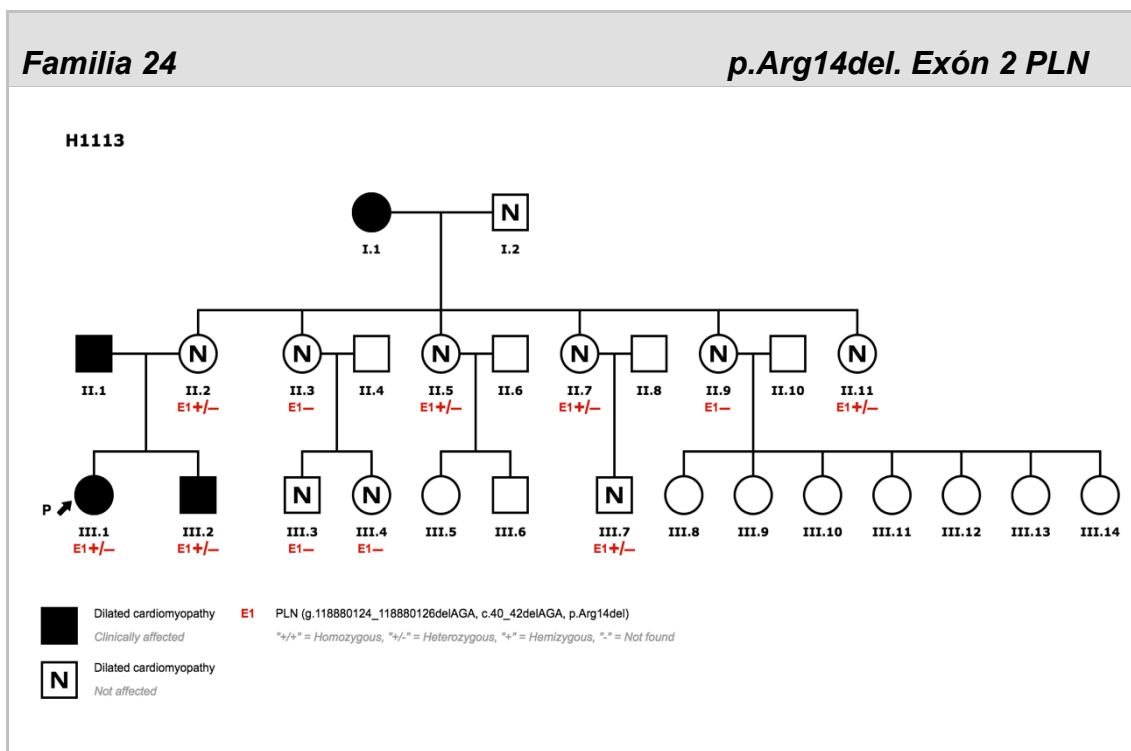


Figura 41. Árbol genealógico de la familia 24.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (III.1) es una mujer de 32 años afectada de MCD y con síntomas como disnea, síncope y arritmias ventriculares. Complejos QRS de bajo voltaje llamativos y disfunción sistólica severa sin dilatación. Se le implanta un DAI monocameral por prevención secundaria. Hay 4 individuos más afectados en esta familia; el padre de la probando (II.1) que lleva implantado un DAI, el hermano de la probando (III.2) con síntomas y pendiente de la implantación del DAI y la abuela (I.1) y tía abuela de la

probando ambas asintomáticas. Tanto el hermano de la probando (III.2), como la madre de esta (II.2), 3 de sus 5 hermanas y 3 primos están sanos. Las otras 2 hermanas de la madre y dos hermanos de la abuela de la probando tienen un fenotipo posible/dudoso.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.R14del/g.15683_15685delAGA*, está localizada en el exón 2 del gen PLN. Está catalogado en la base de datos HGMD como variante causal de la enfermedad.

Consideramos la variante *p.Arg14del* como una mutación patogénica, identificada en pacientes de diferentes países. Recientemente ha sido identificada como variante con un efecto fundador hasta en un 14% de los casos de una larga cohorte de pacientes holandeses con MCD o MAVD (con frecuente afectación del VI). Estos últimos caracterizados por onda T negativa en cara lateral (V4-V6) y bajos voltajes, diferenciándose de los portadores de mutaciones claramente desmosomales (con ondas T negativas en precordiales derechas).

El aminoácido R14 se encuentra localizado en el dominio IA del fosfolambán (aminoácidos 1-20), importante porque contiene sitios de fosforilación de la PKA en el S16 y de la calmodulina quinasa en el T17. La delección en la posición *g.10653_55* de tres nucleótidos AGA causa una mutación que ocasiona la pérdida del residuo N14 pero no produce cambio en la pauta de lectura. La mutación *p.R14del* se encuentra en un dominio conservado del fosfolambán (proteína de 52 aminoácidos que regula la recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico durante la diástole, inhibiendo la actividad de SERCA2a). La supresión del aminoácido R13 altera la estabilidad de la estructura de pentámeros del fosfolambán.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como variante causal de la enfermedad con un score de 1 (rango de probabilidad de 0-1). Polyphen-2 no reconoce la variante por lo que no es posible determinar su patogenicidad con este software. PMut no reconoce variantes del tipo delección, por lo que no fue posible predecir patogenicidad con este software (Tabla 9).

La variante p.Arg14del afecta al residuo R14 que se encuentra conservado en humano y 5 especies más: chimpancé, macaco, gato, ratón y pollo.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 12 individuos descritos en esta familia. El caso índice (III.1), afectado, es portador de la variante R14del. Los otros dos individuos afectados, hermano (III.12) y abuela de la probando (I.1) también son portadores de la variante. De los 8 individuos con fenotipo normal 4 de ellos portan la mutación: madre de la probando (II.2), tres tías (II.5, II.7 y II.11) y un primo (III.7); los otros 4 son *wildtype* (II.3, II.9, III.3 y III.4). De las dos tías de la probando con fenotipo dudoso/posible una de ellas es portadora de la variante y la otra no.

La penetrancia en esta familia es de 37.5% y la variante cosegrega con la enfermedad.

- **FAMILIA 25 (H1129)**

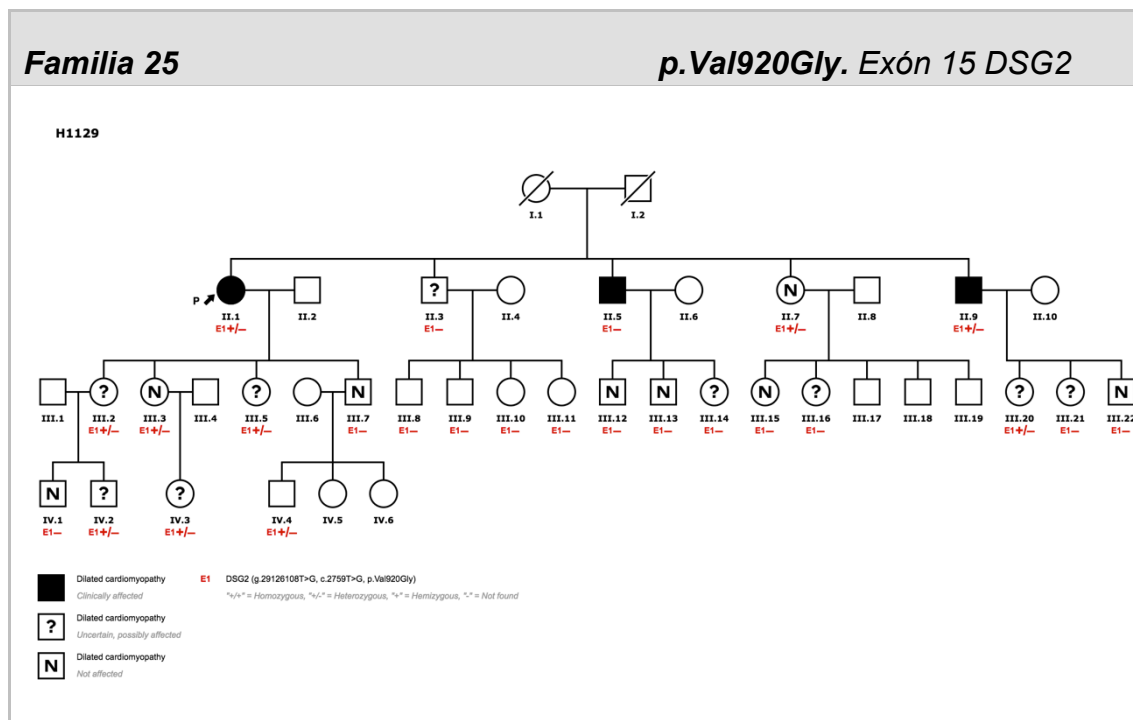


Figura 42. Árbol genealógico de la familia 25.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia (II.1) es una mujer de 80 años afectada de MCD. Diagnosticada por una angina de pecho sin enfermedad coronaria significativa se le implanta un DAI biventricular por prevención primaria. Dos de sus hermanos (II.15 y II.9) también están afectados, uno de ellos con insuficiencia cardiaca crónica secundaria a MCD con disfunción ventricular sistólica sincrónica y con un DAI tricameral implantado por prevención primaria y el otro asintomático. La hija de la probando (III.1), con un fenotipo posible, es ablacionada por TSVD; se le observa además con RMN una pequeña aneurisma en TSVD e hipocinesia lateral apical del VD y se le realiza ecocardiografía muy sugestiva de miocardiopatía. El resto de hijos de la probando no están afectados.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, *p.Val920Gly/g.47937T>G*, está localizada en el exón 15 del gen DSG2.

Está catalogada en la base de datos HGMD como variante causal de la enfermedad. Esta variante aparece recogida en diversas bases de datos de genotipado en población general. La base NHLBI GO ESP informa su identificación en 41/4135 individuos norteamericanos sanos de origen Europeo (cerca del 1%) y en menor proporción (0,3%) en individuos afroamericanos. También aparece recogida en poblaciones de raza mixta en la base de datos del proyecto 1000 genomas (México, Colombia) con frecuencias similares. Por tal motivo, su frecuencia en población general se acerca a la de un polimorfismo.

La variante *p.V920G* afecta a un residuo moderadamente conservado (V920), que supone el cambio de un aminoácido no polar (valina, GTA) a otro no polar (glicina, GGA). El cambio supone moderadas modificaciones en algunas de las propiedades físico-químicas, como la hidrofobicidad y la masa (distancia Gratham: 109[0-215]). El aminoácido V920 se encuentra en el extremo C-terminal citoplasmático dentro de la segunda repetición del dominio RUD (aminoácidos 913-942), que se predice que forma las láminas beta de la proteína.

Estudios “in sílico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como un polimorfismo con un score de 0.94 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es de sustitución benigna con un score de 0.154 (rango de score de 0-1). La predicción con PMut es cambio patológico con una fiabilidad de 0 (rango de fiabilidad de 0-9) (Tabla 9).

La variante p.Val920Gly afecta al residuo V920 que se encuentra conservado en humano y 4 especies más: chimpancé, macaco, gato y ratón.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de los 20 individuos identificados en esta familia. El caso índice (II.1), afectado, es además portador de la variante p.Val920Gly. De los 3 hermanos de la probando afectados, dos de ellos portan la variante y uno es *wildtype*. Un hijo de la probando es fenotípicamente normal y *wildtype* y las otras tres hijas son portadoras de la variante; la mayor no está afectada y las otras dos tienen fenotipo posiblemente patológico. Tres nietos de la probando son portadores y tienen fenotipo posible/patológico. El nieto no portador tampoco está afectado. Los 5 sobrinos de la probando a los que se le ha realizado el estudio genético son *wildtype*.

- **FAMILIA 26** (H1361)

Características clínicas de la familia

Familia en la que hasta ahora únicamente se ha estudiado al probando, una mujer de 66 años afectada de MCD cuyo único dato clínico del que disponemos es que fue trasplantada en Madrid a los 46 años.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, p.Arg321*/g.21219C>T, está localizada en el exón 6 del gen LMNA. Está catalogada en las bases de datos como variante asociada a la patología.

Se han descrito 2 familias europeas de raza caucásica (Alemania y Dinamarca) con un total de 5 portadores de la mutación. Además, se han descrito más de 900 controles sanos negativos para esta mutación.

El cambio de C a T en la posición g.21219 de la secuencia genómica de LMNA da lugar a un transcrito aberrante que si se tradujera provocaría un

codón de stop prematuro en el aminoácido 321. El aminoácido R321 de LMNA se encuentra en dominio central alfa-helicoidal (aminoácidos 34-388).

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como causal de la enfermedad con un score de 1 (rango de probabilidad de 0-1). Polyphen-2 y PMut no reconocen la variante por lo que no podemos valorar su patogenicidad con estos software (Tabla 9).

La variante p.Arg321* afecta al residuo R321 que se encuentra conservado en humano y 6 especies más: Ptrogodites, Mmulata, Mmusculus, Drerio, Dmelanogaster y Xtropicalis. El dominio es idéntico en Ptrogodites, Mmulata y Mmusculus y se encuentra parcialmente conservado en Ggallus, Trubripes, Drerio, Dmelanogaster, Celegans y Xtropicalis.

Correlación fenotipo-genotipo

No es posible calcular la penetrancia ni estudiar la cosegregación ya que únicamente contamos con un individuo en esta familia.

- **FAMILIA 27** (H1493)

Características clínicas de la familia

Familia en la que hasta ahora únicamente se ha estudiado al probando, una mujer de 41 años afectada de MCD. Sufre de palpitations y presincopec sin disnea pero rechaza DAI y medicación (sintrom). Holter 2 rachas de TVNS lentas de 15 y 18 latidos a 117 y 123 lpm. Pausas de hasta 3 segundos y fibrilación auricular (FA) durante todo el registro.

Variante identificada y estudio de patogenicidad

La variante identificada en esta familia, p.Arg225*/g.20132C>T, está localizada en el exón 4 del gen LMNA. Está catalogada en las bases de datos como variante asociada a la patología.

El cambio de C a T en la posición g.20132 de la secuencia genómica de LMNA da lugar a un transcrito aberrante que si se tradujera provocaría un codón de stop prematuro en el aminoácido 225.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Se ha realizado el estudio bioinformático del efecto de la sustitución del aminoácido R por un codón de stop en el residuo 225 utilizando 3 software:

Mutation Taster, Polyphen-2 y PMut. Mutation Taster reconoce la variante como causal de la enfermedad con un score de 1 (rango de probabilidad de 0-1). Polyphen-2 y PMut no reconocen la variante por lo que no podemos valorar su patogenicidad con estos software (Tabla 9).

La variante p.Arg225* afecta al residuo R225 que se encuentra conservado en humano y 7 especies más: Ptroglodites, Mmulata, Mmusculus, Ggallus, Trubripes, Drerio y Xtropicallis. El dominio es idéntico en Ptroglodites, Mmulata y Mmusculus y se encuentra parcialmente conservado en Ggallus, Trubripes, Drerio, Dmelanogaser, Celegans y Xtropicalis.

Correlación fenotipo-genotipo

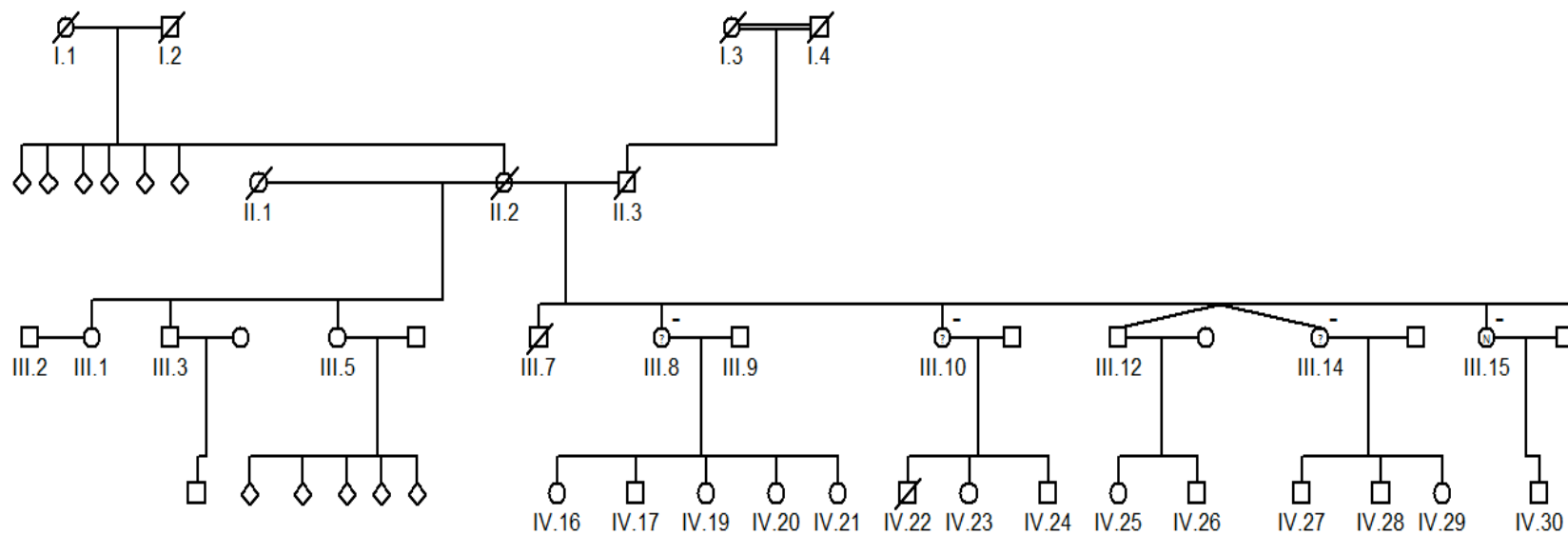
No es posible calcular la penetrancia ni estudiar la cosegregación ya que únicamente contamos con un individuo en esta familia.

2.3 FAMILIAS DIAGNOSTICADAS DE SADS CON GENOTIPO POSITIVO

- **FAMILIA 28** (H471)

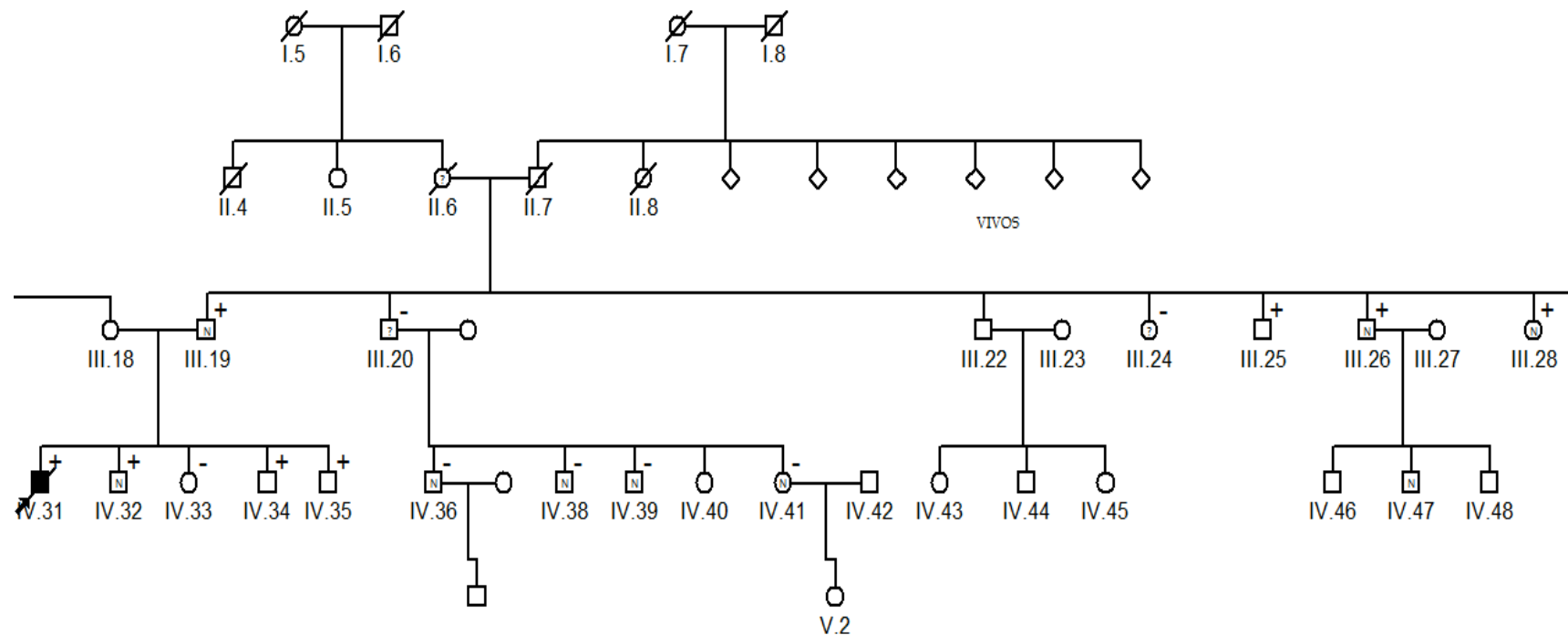
Familia 28

p.Gly712Arg. Exón 10 PKP2



Familia 28

p.Gly712Arg. Exón 10 PKP2



Familia 28

p.Gly712Arg. Exón 10 PKP2

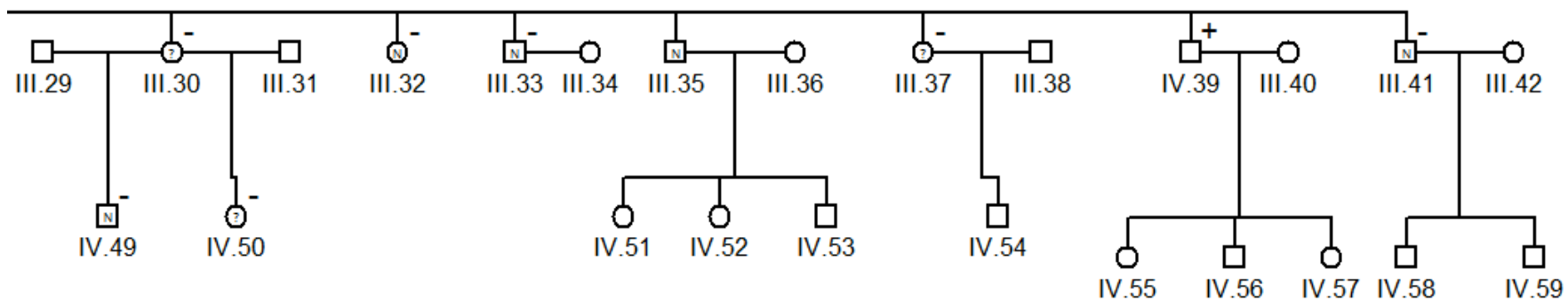


Figura 43. Árbol genealógico de la familia 28.

Características clínicas de la familia

El caso índice de esta familia es un varón que sufre una MS a los 27 años. Deportista y sin síntomas previos. Primo por vía materna de una MS del lactante.

La madre del probando sufre síncope, la mayoría de ellos vasovagales (diagnóstico de SB aunque con alteraciones en VD y potenciales tardíos positivos). Familia paterna (aunque no el padre) con ECGs sugestivos de QTL.

Tipo de variante identificada. Estudio molecular

La variante identificada en esta familia, *p.Gly712Arg/g.75480G>A*, está localizada en el exón 10 del gen PKP2.

No está catalogada en las bases de datos NCBI/HGMD. Mutación no descrita previamente.

Esta variante del tipo missense afecta al dominio armadillo 7 de la PKP2.

Estudios “in silico” y conservación filogenética

Mutation Taster reconoce la variante como variante causal de la enfermedad con un score de 0.78 (rango de probabilidad de 0-1). La predicción con Polyphen-2 es de sustitución probablemente dañina con un score de 0.995 (rango de score de 0-1). La predicción con PMut es cambio patológico con una fiabilidad de 4 (rango de fiabilidad de 0-9) (Tabla 9).

La variante *p.Gly712Arg* afecta al residuo G712 que se encuentra conservado en humano y 4 especies más: chimpancé, macaco, ratón y pollo.

Correlación fenotipo-genotipo

Se ha realizado el estudio genético de 29 de los 32 individuos identificados en esta familia. El caso índice (IV.31), afectado de MCD, era además portador de la variante *p.Gly712Arg*. Su madre (III.18), también afectada es *wildtype*. De los 20 individuos sanos, 7 son portadores de la variante, y de los 10 individuos con fenotipo posible/dudoso, solo uno es portador, el resto son *wildtype*.

La penetrancia en esta familia es de 22.2% y la variante no cosegrega con la enfermedad.

3. ESTUDIO DE MICROSATÉLITES EN TRES FAMILIAS PORTADORAS DE LA MUTACIÓN *p.Gln447**

Se ha realizado el estudio de búsqueda de un antecesor común en tres familias (H238, H264 y H780) afectadas de MCD con afectación del VI y con un fenotipo severo muy similar.

En las 3 familias se ha detectado la misma variante *p.Gln447** localizada en el exón 11 del gen DSP y que parece ser la responsable de la patología.

Hemos comprobado mediante seis marcadores microsatélites (D6S1640, D6S1574, D6S1674, D6S1660, Des.mic1 y Des.mic3), que los individuos de las 3 familias comparten haplotipo (Figura 44A, B y C) por lo que presuntamente están emparentados y tienen un antecesor común. Todos los individuos portadores de la mutación *p.Gln447** tienen el mismo haplotipo patogénico, incluso entre individuos de diferentes familias (efecto fundador). Cada uno de los alelos representados en la figura 47, son el resultado de los *loci* que se transmiten juntos.

Para el cálculo del número de generaciones que han transcurrido desde el momento en que se originó la variante hasta la actualidad, hemos utilizado 25 individuos control y el marcador que posiblemente sufría algún hecho de recombinación (D6S1574). Hemos utilizado la fórmula $G = \log \delta / \log (1-\theta)$; $\delta = (P_d - P_n) / (1 - P_n)$, en la que G = número de generaciones transcurridas, δ = medida de desequilibrio de ligamiento entre la mutación y cada uno de los microsatélites recombinantes más cercanos, θ = fracción recombinante entre un marcador y el gen (la unidad son los cM; 1cM=1Mb 1 millón de pares de bases aprox.), P_d = frecuencia del alelo microsatélite ancestral entre los cromosomas portador de la mutación, P_n = frecuencia del mismo alelo microsatélite en el cromosoma no portador de la mutación. Se asume para el cálculo que cada generación son 25 años aproximadamente.

En nuestro caso, el alelo recombinante está presente en 7 de los 25 controles, por lo tanto en 14 de 50 alelos ($P_n = 14/50 = 0.28$) y en 3 de los 4 casos de individuos con la mutación por lo tanto en 6 de 8 alelos ($P_d = 6/8 = 0.75$). La distancia del marcador recombinante al gen DSP es de $\theta = 1.53 \text{ MB} = 1.53 \text{ cM} = 0.0153 \text{ M}$. Por lo tanto $\delta = (0.75 - 0.28) / (1 - 0.28)$; $\delta = 0.652$.

$G = \log 0.652 / \log (1-0.0153)$; $G = 26.90 \times 25 = 673.5$ años
aproximadamente han transcurrido desde el momento en que se originó la
mutación.

Haplotipos familia 15

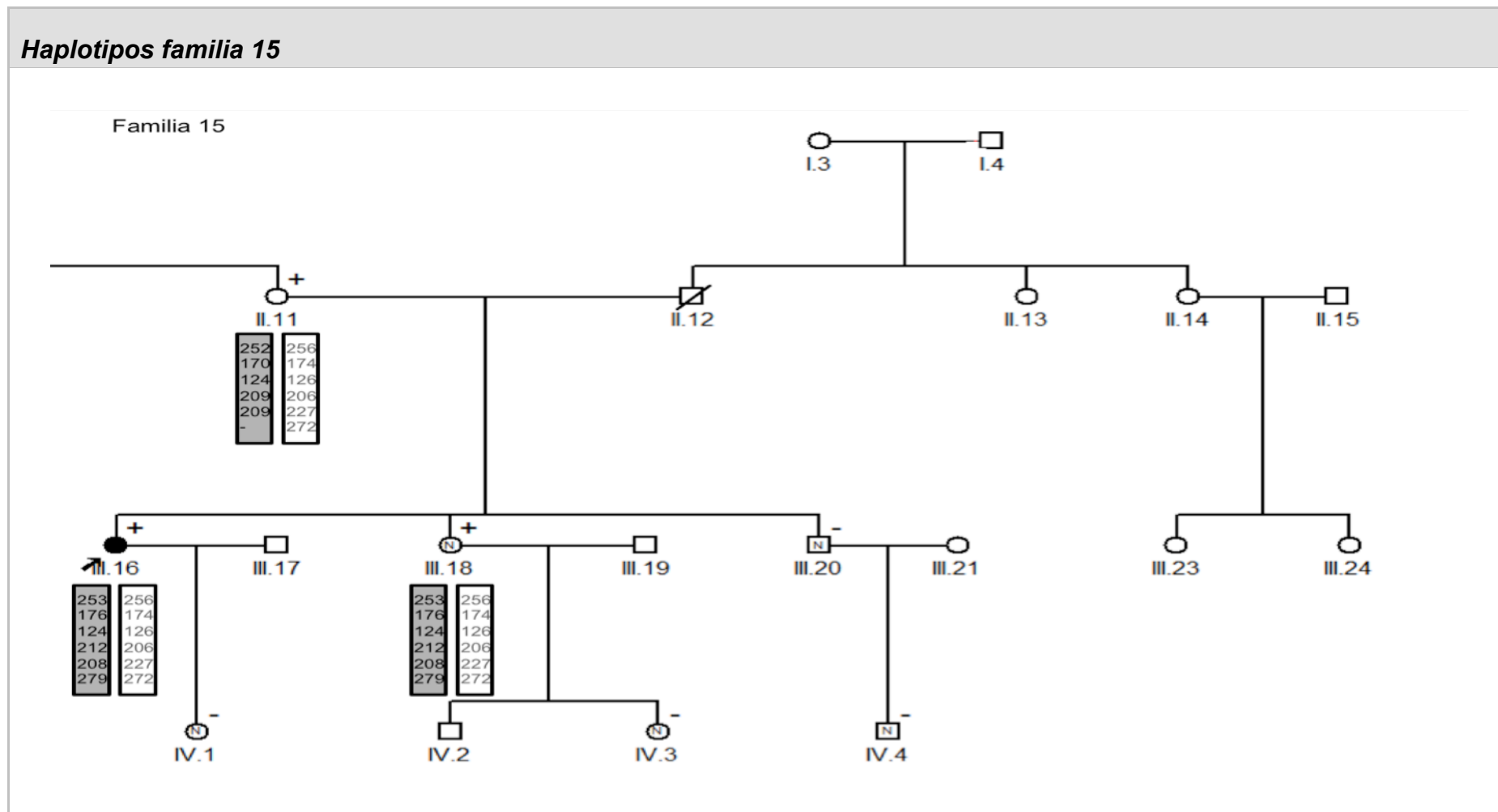


Figura 44 A.

Haplotipos familia 16

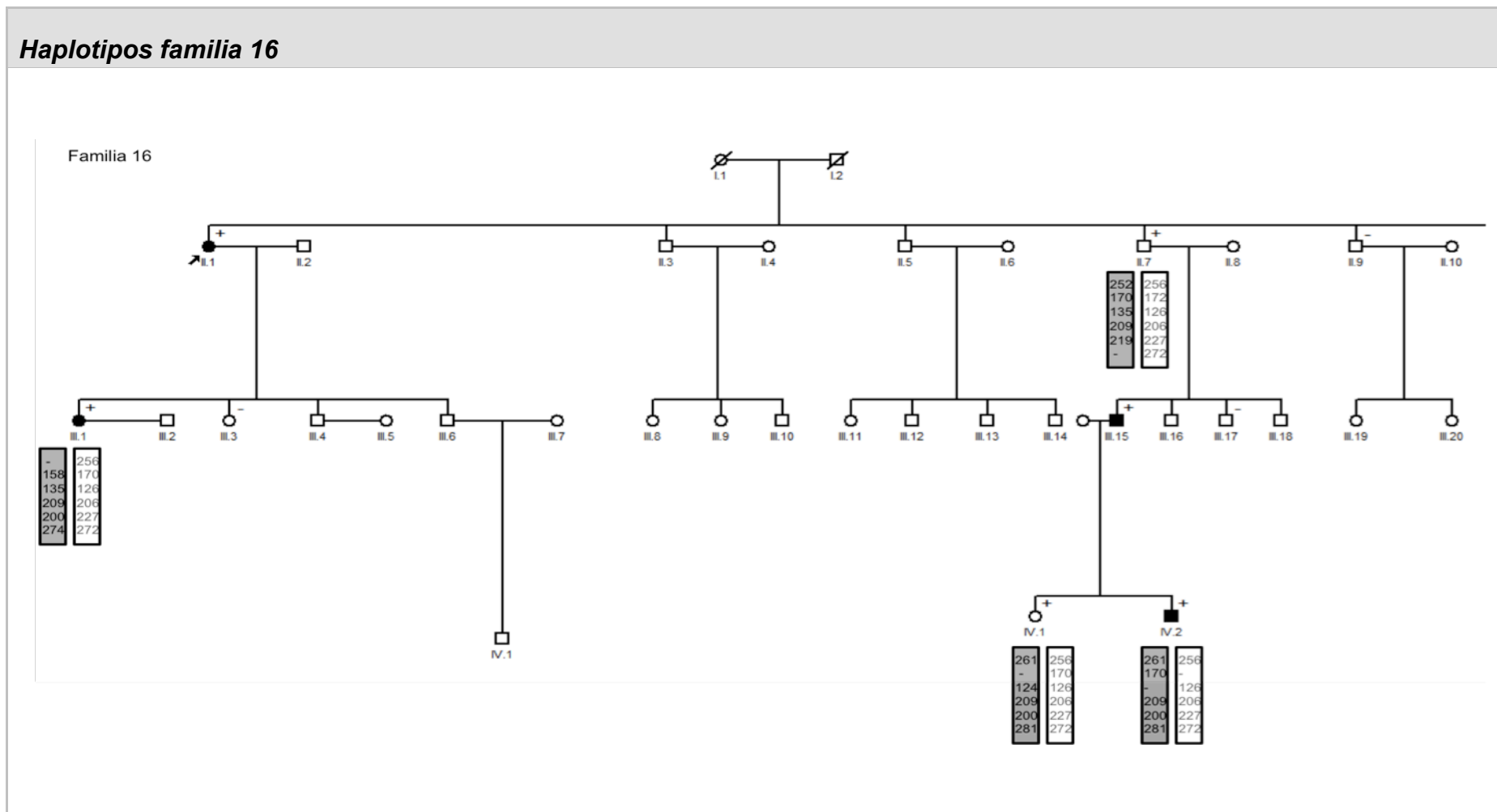


Figura 44 B.

Haplotipos familia 22

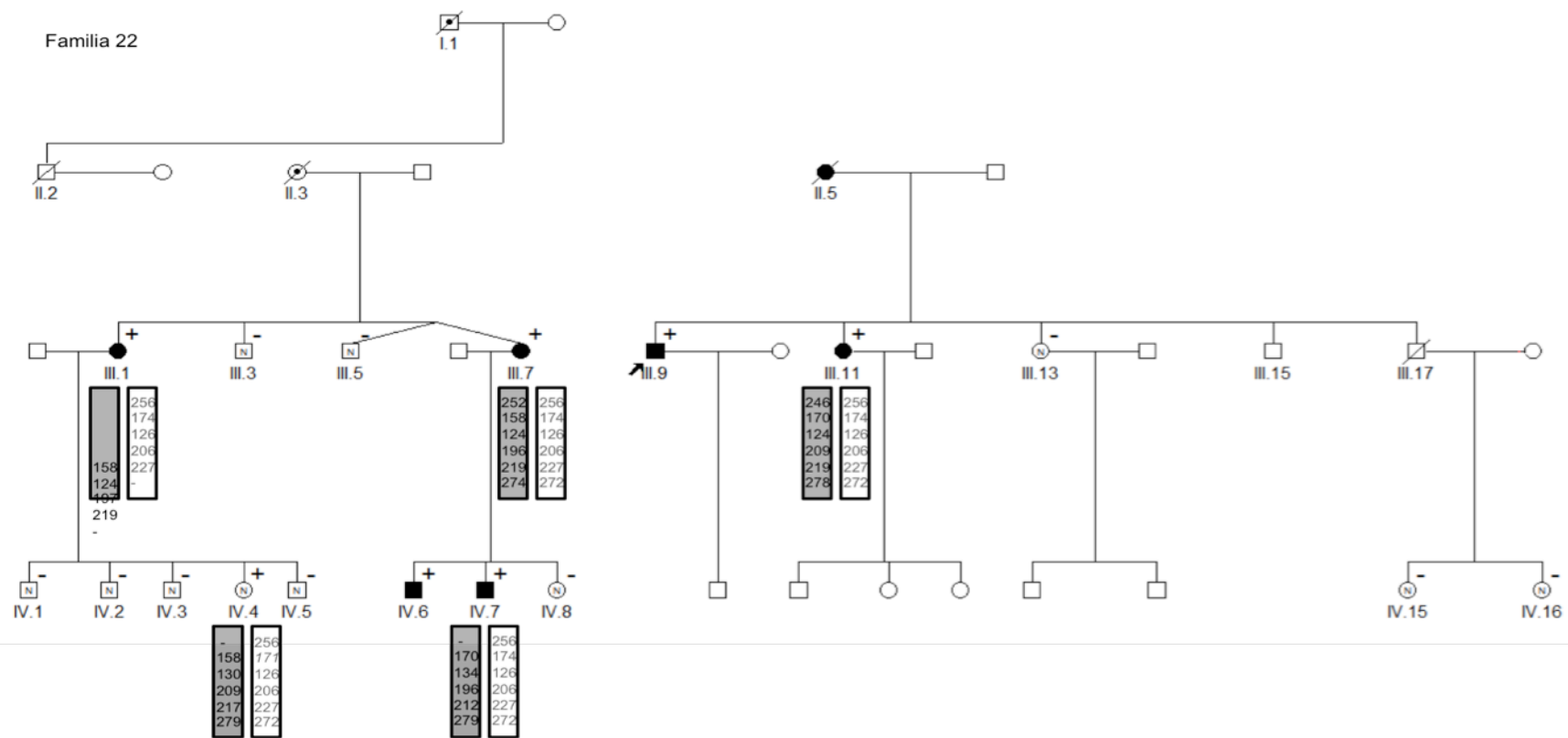


Figura 44 C.

4. GRANDES REORDENAMIENTOS EN LOS GENES DESMOSÓMICOS

Las muestras de 17 casos índice pertenecientes a familias diagnosticadas de MAVD en los que no se detectó ninguna mutación causal en ninguno de los genes desmosómicos ni en los genes candidatos incluidos en este estudio fueron analizados mediante la técnica MLPA para la detección de posibles deleciones o duplicaciones en alguno de estos genes.

Familia 29

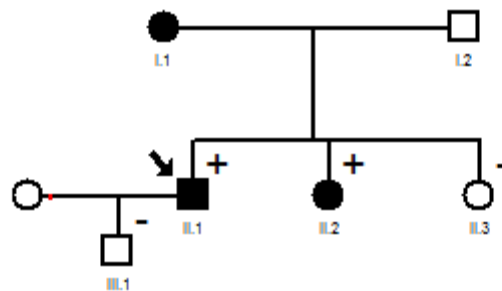


Figura 45. Árbol genealógico de la familia 29.

No se detectó ningún gran reordenamiento génico en los genes desmosómicos de estas familias excepto en una familia (familia 29) afectada de MAVD en el que en el caso índice se halló una gran deleción del exón 8 del gen PKP2 (NC_000012.11:g.32976092_32978401del). Esta mutación provoca la deleción en heterocigosis del exón 8 de PKP2 e incluye parte de los intrones adyacentes (intrones 7 y 8). El fragmento delecionado es de un total de 2309 pares de bases de las que 118 pertenecen al exón 8.

Se realizó el estudio genético del exón 8 del gen PKP2 en todos los individuos de esta familia (2 hermanas, madre e hijo del caso índice), en la que además del probando, también estaban afectadas de MAVD su hermana y su madre. La hermana que no está afectada y el hijo del probando tienen un fenotipo probable/dudoso, pero no son portadores de la gran deleción del caso índice, la otra hermana, además de estar afectada de MAVD, es también portadora de la variante.

En la Figura 46 se muestran mediante diagramas de barras los resultados de una muestra *wildtype* y de la muestra que presenta la delección del exón 8. Todas las barras corresponden a las sondas y tienen un valor normalizado cercano a 1 en el caso de los *wildtype* y un valor de 0.5 en el caso de la muestra que tiene la delección.

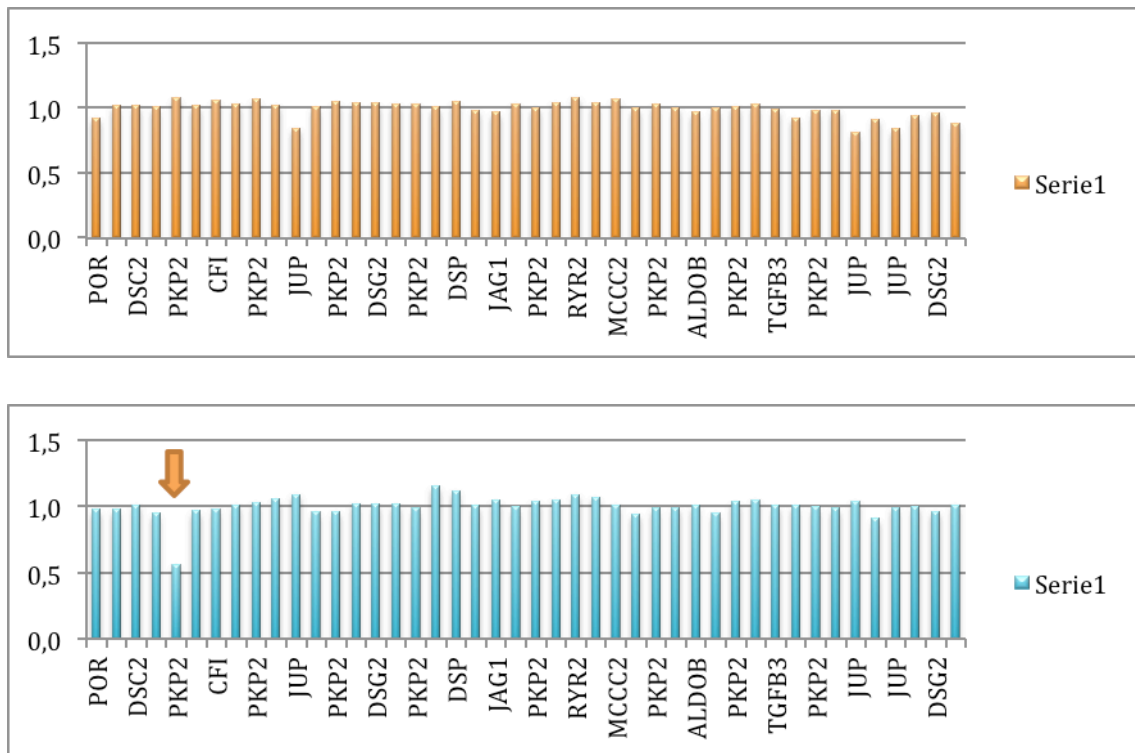


Figura 46: Representación gráfica de los resultados del MLPA en una muestra *wildtype* y una muestra que presenta una delección.

La delección hallada por MLPA fue confirmada posteriormente mediante NGS. La cobertura de las sondas que se utilizan en este tipo de secuenciación nos sirve para determinar la región en la que se ha producido una duplicación (la sonda tendrá el doble de cobertura) o como en nuestro caso una delección, en la que la sonda tendrá la mitad de cobertura que las demás. (Figura 47).

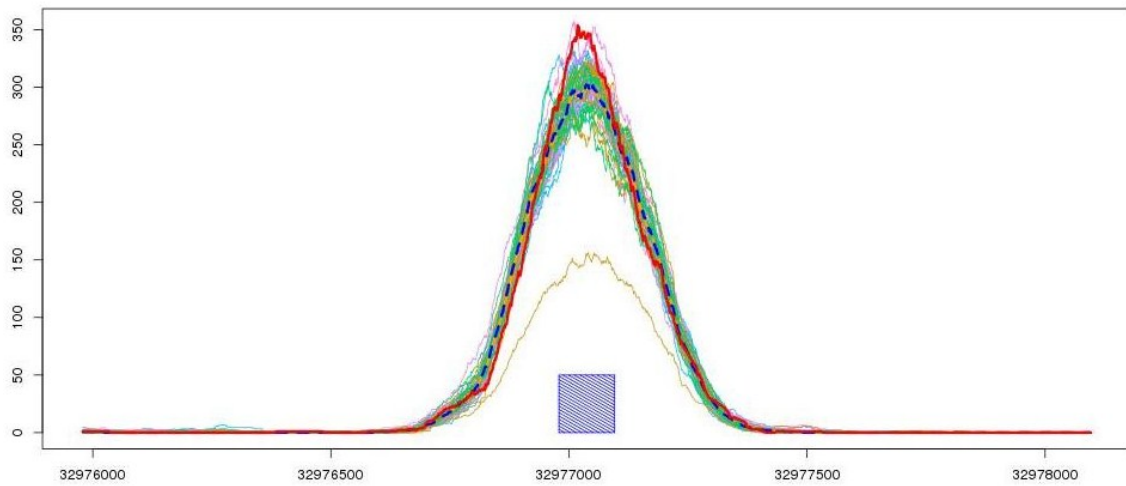


Figura 47: Confirmación de la delección del exón 8 del gen PKP2 en heterocigosis de acuerdo con los datos de cobertura de NGS. La muestra delecionada (de color verde) tiene la mitad de cobertura que el resto de muestras incluidas en esta “carrera”. La delección comienza en el intrón 7 y termina dentro del intrón 8.

DISCUSIÓN

1. IMPLICACIÓN DESMOSOMAL EN LAS MIOCARDIOPATÍAS

Debido a su papel central en el mantenimiento de la integridad de tejidos sólidos, la interrupción del ensamblaje o estructura del desmosoma, conduce a situaciones debilitantes, infecciones y enfermedades autoinmunes y hereditarias (Al-Jassar et al., 2013a). Las consecuencias moleculares incluyen la pérdida de adhesión entre células, desorganización celular, comunicación y regulación celular defectuosa y desarrollo de tejido equivocado. Las condiciones patológicas resultantes son diversas e incluyen las miocardiopatías, epidermolisis bullosa, formación de ampollas en la epidermis y mucosa, displasia ectodermal, keratderma palmoplantar, queratosis, pelo lanoso y alopecia.

Las mutaciones que se dan en los desmosomas de los cardiomiocitos dan lugar a patologías tales como la MAVD/I y la MCD con arritmias. El fundamento al que se llega a través de estudios estructurales, celulares y mutacionales, proporciona una base para predecir los efectos de las variantes desmosómicas que aparecen en 1 de cada 200 personas de algunas cohortes (Lahtinen et al., 2011).

2. RENTABILIDAD DE LA GENÉTICA EN EL ESTUDIO DE LAS MIOCARDIOPATÍAS (MCD, MAVD y SADS)

2.1 Variantes desmosómicas encontradas en la población de estudio

Se han detectado 14 variantes en las familias afectadas por MAVD incluidas en este estudio: 4 en el gen DSP, 6 en el gen PKP2, 2 en JUP, 1 en DSG2 y 1 en DSC2.

Se han detectado 12 variantes en las familias afectadas por MCD incluidas en este estudio: 3 en el gen DSP, 2 en el gen PKP2, 1 en JUP, 2 en el gen DSG2, 3 en el gen LMNA y 1 en el gen PLN.

También se ha detectado una variante en la familia afectada de SADS incluida en este estudio. Esta variante se ha encontrado en el gen PKP2.

2.1.1 Variantes detectadas en los genes que codifican para las cadherinas desmosómicas (DSG2 y DSC2)

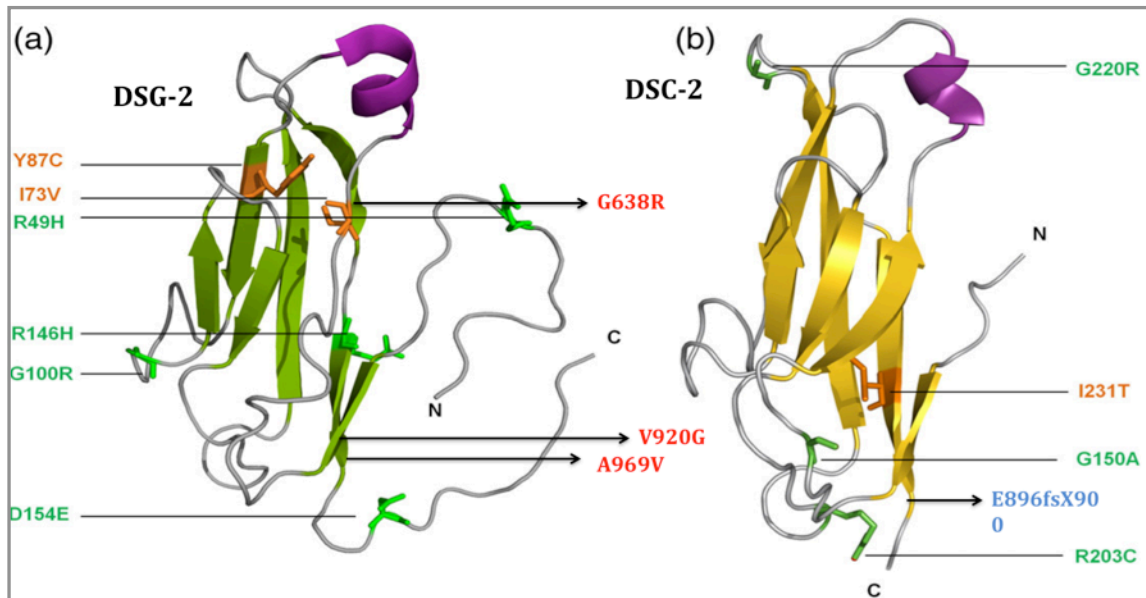


Figura 48.

En común con las cadherinas clásicas, las desmogleínas y desmocollinas se expresan con el extremo N-terminal y pro-péptidos que se escinden durante la maduración. Los pro-péptidos de las desmogleínas (26 residuos) son más cortos que los de las desmocollinas (108 residuos). Las proteínas maduras atraviesan la membrana con el extremo N-terminal de sus dominios extracelulares y sus colas C-terminales quedan incrustadas en la placa citoplasmática. Estas cadherinas contienen 5 dominios cadherina extracelulares (EC1-EC5) con sitios de unión a Ca^{2+} (Nagar et al., 1996), seguidos de una región transmembrana en hélice y una región C-terminal desordenada.

La estructura del dominio EC-1 en humanos fue determinada por Yokohama *et al.* (resultados que no fueron publicados) y contiene el característico “sándwich plegado β ” y una hélice β firme (Overduin et al., 1995).

Los dominios extracelulares de las cadherinas median dos tipos de interacciones proteicas, según lo revelado por las estructuras cristalinas de los

dominios extracelulares de C-, E- y N-cadherinas (Shapiro and Weis, 2009; Harrison et al., 2011; Boggon et al., 2002).

El mecanismo por el cual las cadherinas desmosómicas interactúan en el espacio intercelular aún no está claro. La fuerte adhesión célula-célula puede ocurrir a través de dos interacciones homofílicas y heterofílicas entre desmocollinas y desmogleínas que cruzan la línea divisoria entre células.

Se ha detectado una variante en DSG2 y otra en DSC2 en el grupo de familias afectadas de MAVD:

La variante *p.Ala969Val/g.48084C>T*, localizada en el exón 15 del gen DSG2, ha sido detectada en una familia afectada por MAVD (familia 14). Teniendo en cuenta la gran cantidad de muestras secuenciadas para este gen (pacientes y controles), es probable que no se trate de una variante frecuente en la población.

Hay otras variantes genéticas de tipo *missense* que afectan al extremo C-terminal de la desmogleína-2 (Figura 48) y que han sido indentificadas con muy baja frecuencia (<0.5%) en sujetos control aparentemente sanos. Al respecto, Kapplinger et al. (Kapplinger et al., 2011) estableció un algoritmo para la probabilidad de que una variante *missense* en los genes desmosomales sea patogénica y determinaron que la ubicación en el extremo N-terminal disminuía esta posibilidad. Por otro lado, si una variante como esta se identifica en un sujeto de raza caucásica o afecta a un residuo altamente conservado en la evolución (como sucede con la alanina en posición 969 de DSG2), la probabilidad de que sea patogénica aumenta.

En el caso de la familia afectada de MAVD en la que aparece esta variante, no es posible establecer una cosegregación, por lo que no podemos afirmar que sea la causante de la misma, a pesar de que la mayoría de los programas bioinformáticos con los que se ha analizado predigan que es causal con un rango de probabilidad relativamente alto.

La variante *p.Ala897Lysfs*4*, localizada en el exón 16 del gen DSC2, se ha detectado en 3 familias afectadas de MAVD (familias 2, 3 y 11).

Esta variante genética fue inicialmente identificada en familias con MAVD procedentes de Reino Unido, Italia y Estados Unidos. En un comienzo fue interpretada como una mutación asociada con la enfermedad; sin embargo,

posteriormente ha sido también identificada entre controles sanos con una frecuencia de aproximadamente 2% (20 de 1078). En las tres primeras familias descritas por Syrris et al (Syrris et al., 2006), había varios portadores con afectación ventricular izquierda predominante. El estudio de haplotipos determinó que estas familias no estaban relacionadas, indicando que la variante *p.Ala897Lysfs*4* se presentaba en forma recurrente en esa población. Los autores la consideraron mutación patogénica por estar ausente en 200 voluntarios y porque produciría un codón de *stop* prematuro 4 aminoácidos más adelante.

Posteriormente, den Haan y colaboradores (den Haan et al., 2009) detectaron esta variante genética en una cohorte de pacientes norteamericanos con MAVD, pero la consideraron no relacionada con la enfermedad por estar presente también entre los controles sanos (no se dan datos de frecuencia). Recientemente, un grupo italiano identificó la variante *p.Ala897Lysfs*4* en 5 de 112 casos índice con MAVD, cuatro de ellos tenía una o más mutaciones adicionales en otros genes del desmosoma probablemente patogénicas y presentaban un fenotipo severo. Estas familias no estaban relacionadas según el análisis de haplotipos, y la variante aparecía de forma recurrente, confirmando los hallazgos previos de Syrris et al. en una población distinta. Por otro lado, no había diferencias significativas en la frecuencia alélica con la que se identificó esta variante entre controles sanos con respecto a los pacientes. Estos autores demostraron mediante estudios funcionales que la alteración producida por esta variante afecta a aminoácidos muy poco conservados en la evolución y no altera la estructura de la isoforma que más se expresa en el corazón (DSC2 isoforma b). De Bortoli y colaboradores (De et al., 2010) sugirieron entonces que la variante *p.Ala897Lysfs*4* podría actuar como un posible factor modificador en presencia de otra mutación patogénica.

Finalmente, esta variante ha sido identificada en el Exome Variant Server (proyecto 5000 genomas) con una frecuencia similar a la reportada en los estudios previos. En esta base datos aparece en heterocigosis en 111 de 4127 individuos europeo-americanos (MAF: 1.34%) y en 9 de 2132 sujetos afro-americanos (MAF: 0.2%).

En el caso de nuestras familias estudiadas portadoras de la variante, ésta cosegrega con la enfermedad en las 3 familias analizadas, por lo tanto podríamos afirmar que probablemente tenga un papel fundamental en el desarrollo del fenotipo (teoría del doble “hit”).

En el grupo de familias afectadas por MCD se han detectado dos variantes en el gen DSG2:

La variante *p.Gly638Arg/g.43017G>A*, localizada en el exón 13 del gen DSG2, ha sido detectado en una familia afectada de MCD (familia 18).

Esta alteración, fue descrita en un principio en una familia italiana cuyo probando, si bien cumplía criterios diagnósticos propuestos por la *Task Force* (2010), también era portador de otras dos variantes en otros genes desmosómicos: *p.Ala897Lysfs*4* en *DSC2* y *p.Asn375Ile* en *DSP*. Un familiar de 58 años, que solo era portador de *p.Gly638Arg*, no se encontraba afectado. Otros dos familiares eran portadores de esta variante junto con *p.Ala897Lysfs*4*. Si bien esta última es considerada un polimorfismo de baja frecuencia, uno de los portadores de ambas variantes (varón de 42 años) cumplía criterios diagnósticos de miocardiopatía arritmogénica (4 criterios menores), mientras que otro familiar (mujer de 54 años), también portadora de ambas, no los cumplía (el fenotipo de hecho era normal).

Estos datos podría sugerir que la variante *p.Gly638Arg* no sería factor suficiente para producir enfermedad aunque existe la posibilidad que contribuya al fenotipo, en asociación con otros factores genéticos y no genéticos (por ejemplo ser edad, sexo, práctica deportiva, etc).

También fue identificada en un paciente español con diagnóstico de miocardiopatía dilatada e hipertrabeculación, portador de otras dos variantes raras en otros genes desmosómicos.

Esta información sugiere que la variante *p.Gly638Arg* no constituiría un factor suficiente para producir enfermedad aunque no podemos descartar que su presencia actúe como modificador de otras variantes genéticas, contribuyendo de este modo al desarrollo de enfermedad. Por tal motivo la consideramos de patogenicidad incierta. De nuevo podríamos atribuir esto a la teoría del doble “hit” explicando de esta manera el desarrollo del fenotipo por la contribución de una segunda variante no identificada hasta el momento.

En nuestro caso, el probando de la familia, además de ser portador de esta variante, es también portador de otra variante en el gen PKP2 *p.Asp26Asn/g.191G>A*. Esta segunda variante, que parece no patogénica por sí sola, podría estar modulando el efecto patológico de la variante en DSG2 pero no se ha conseguido hasta la fecha más muestras de ADN de familiares del probando, por lo que no podemos estudiar la cosegregación y por lo tanto no podemos afirmar que la variante *p.Gly638Arg* sea la causante de la patología en esta familia.

La otra variante detectada en el gen DSG2 es la *p.Val920Gly/g.47937T>G*, localizada en el exón 15 y detectada en una familia afectada de MCD (familia 25).

Esta variante fue descrita por primera vez por Biedermann y cols en su trabajo sobre el patrón de expresión de la desmogleína-2 en el cáncer gástrico (Biedermann et al., 2005). *p.Val920Gly* fue identificada en uno de 63 controles utilizados, pero que no habían sido estudiados desde el punto de vista cardiovascular. Posteriormente, esta variante genética fue descrita en 3 familias de raza caucásica y asociada casi en la mitad de los portadores con afectación ventricular izquierda predominante (fenotipo que se confunde con el de MDC). En una de las familias descritas por Posch et al. la variante V920G no cosegregaba con la enfermedad (había familiares afectados con MCD que no eran portadores) (Posch et al., 2008). Además, esta variante se identificó en 2 de 432 controles sin dilatación ni disfunción ventricular izquierda (frecuencia 0,5%). El tercer caso índice fue descrito por Sirrys y cols.: falleció súbitamente sin disponer de estudio genético; el hallazgo de la variante causal se realizó a través del estudio de su padre que tenía signos compatibles con MAVD. Los autores interpretaron a esta variante como patogénica debido a su ausencia en 200 controles sanos y a que afectaba un aminoácido conservado entre distintas especies (Sirrys et al., 2007). Christensen et al detectaron esta variante en un paciente con posible diagnóstico de MA que no cumplía criterios definitivos de la enfermedad y en 3 de 650 controles sanos (0,5%). Sin embargo, estos autores sugirieron que no se puede descartar la contribución de esta variante en la patogénesis de la enfermedad (Christensen et al., 2010). Más recientemente, Cox et al han encontrado la misma *p.Val920Gly* en 1 paciente

holandés afectado por MAVD que cumplía los criterios diagnóstico de la Task Force del 2010 y la han clasificado como variante de significado incierto, a pesar de su ausencia en 200 controles sanos (Cox et al., 2011).

En nuestro caso, la variante no cosegrega con la enfermedad, ya que hay individuos con fenotipo patológico que no son portadores de la mutación. Por lo tanto no podemos concluir que la variante sea la causal de la patología en este caso.

2.1.2 Variantes detectadas en el gen que codifica para las proteínas armadillo o placoglobinas (JUP)

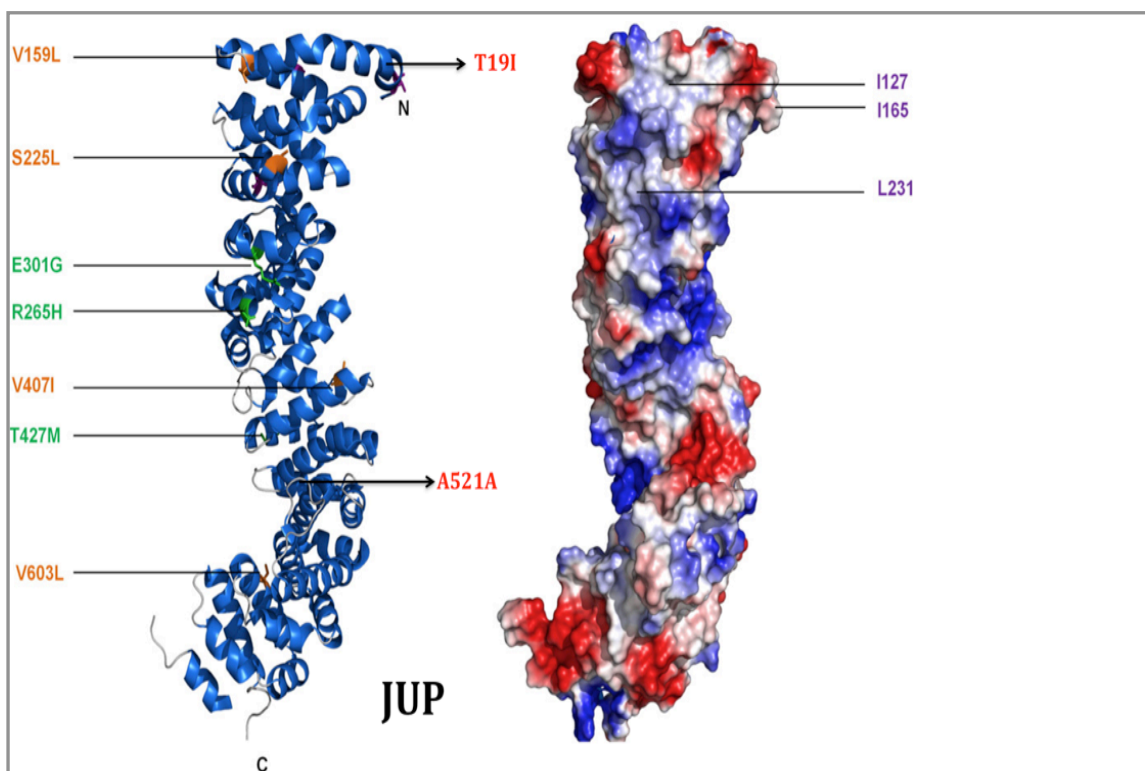


Figura 49.

La placoglobina está estrechamente relacionada con las β -cateninas, es un componente importante de las uniones adherens y de la vía de señalización Wnt/ β -catenina que interactúa con el dominio citoplasmático de las cadherinas clásicas como la E-cadherina.

Placoglobinas y β -cateninas comparten un dominio “armadillo” central flanqueado por una cabeza y una cola N y C-t respectivamente. Los dominios

cabeza y cola son sensibles a la proteólisis y pueden ser flexibles. Las estructuras de la placoglobina y β -cateninas son similares; ambas son moléculas alargadas con brazos repetidos que consisten en 3 α -hélices (Huber and Weis, 2001).

Tanto la placoglobina como la β -catenina se unen fuertemente a E-cadherina, sin embargo la placoglobina interactúa mucho más fuertemente con DSG1 de lo que lo hace β -catenina, la cual está ausente en los desmosomas (Choi et al., 2009). Los sitios de unión de las cadherinas desmosómicas que coinciden con placoglobina en los brazos 1-3 son importantes tanto para la unión con desmogleínas como con desmocollinas. Los residuos Ile127, Ile165 y Leu231 en estos brazos son totalmente necesarios para la unión con desmogleínas y desmocollinas (Chitaev et al., 1998). Además, la placoglobina también media la interacción con placofilina y desmoplaquina (Kowalczyk et al., 1997).

En el grupo de familias afectadas por MAVD se han encontrado dos variantes en JUP:

La variante *p.Ala521Ala/g.27908A>G*, localizada en el exón 13 del JUP ha sido identificada en una familia afectada de MAVD (familia 15).

Previamente fue identificada en 2 pacientes de una cohorte Holandesa que incluyó casos con diagnóstico definitivo de MAVD (cumplían criterios diagnósticos según Task Force 2010). En esta serie no fue identificada en ninguno de los 200 controles evaluados. Tampoco ha sido informada en la base de datos de polimorfismos del NCBI (PubMed/HapMAp) por lo que se trataría de una variante probablemente infrecuente. No se han descrito estudios funcionales. Se desconoce si el hallazgo de esta variante en los dos pacientes informados fue un hecho fortuito, ya que debido al carácter silente no sería esperable su asociación con enfermedad. Por otro lado, si fuera muy poco prevalente el número de casos-controles estudiados podría ser insuficiente para poder establecer esta asociación.

En nuestro caso, no podemos determinar si la variante es causal o no ya que el único individuo afectado y portador de la variante es el probando, por lo que el estudio de co-segregación no se puede realizar. Se podría valorar como una variante no causal si tenemos en cuenta los dos pacientes portadores y no

afectados por la patología y el análisis bioinformático que determina que la variante es benigna.

La variante *p.Thr19Ile/g.14914C>T* ha sido encontrada tanto en una familia afectada de MAVD (familia 8) como en otra afectada de MCD (familia 22).

Está localizada en el exón 2 de JUP ha sido descrita previamente en un varón blanco norteamericano, diagnosticado a los 17 años de MAVD, sin historia familiar. La mutación no se ha encontrado en 200 controles sanos y afecta a un residuo conservado en la evolución.

En la familia afectada de MAVD en la que hemos encontrado esta variante no podemos concluir que esta variante sea la causa de la patología, ya que, a pesar de que la mayoría de los software con los que la hemos testado nos dicen que posiblemente sea patogénica, no hemos podido realizar completamente el estudio de cosegregación familiar, por lo que no podemos concluir su patogenicidad en esta familia.

En la familia afectada de MCD en la que hemos encontrado esta variante hemos encontrado además otra variante en PKP2 que no parece que sea causa de la patología (*p.Arg79Gln/g.17826C>T*).

Al tener 3 afectados (dos de ellos con parada cardiaca resucitada) portadores de la variante podríamos determinar que la misma es posiblemente patogénica.

2.1.3 Variantes detectadas en el gen que codifica para la proteína desmoplaquina (DSP).

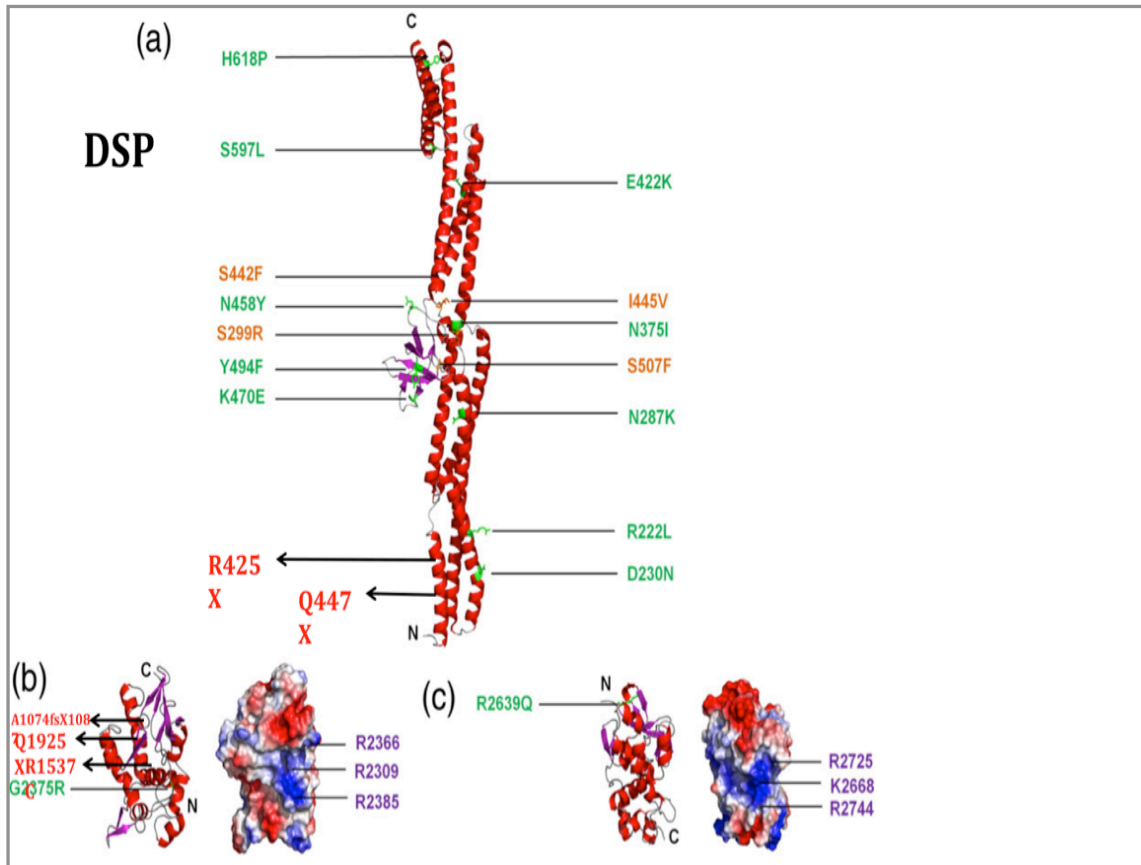


Figura 50.

La desmoplaquina, al igual que otros miembros de la familia de las plaquinas, tiene una estructura tripartita formada por un dominio plaquina globular N-t, un dominio central en espiral y una cola C-t constituida por 3 dominios plaquina (A, B y C).

El dominio plaquina, junto con una pequeña región del extremo N-t de la proteína, es el responsable de las uniones con placoglobina y placofilina.

En el grupo de familias afectadas de MAVD incluidas en este estudio se han detectado 4 variantes en el gen DSP:

Hasta la fecha, se han descrito 42 mutaciones en desmoplaquina que llevan a la terminación prematura de la traducción. Existe información clínica disponible de 120 portadores provenientes de 44 familias. 86 (72%) de los 120 portadores estaban afectados, y 18 (15%) sufrieron MS. Todos ellos tenían alguna de estas mutaciones. En las 14 familias en las que fue posible realizar

un screening, la penetrancia fue >50% en 10 familias (71%) y >90% en 7 (50%) (Lopez-Ayala et al., 2014).

La variante *p.(Arg425*)/g.26807C>T*, localizada en el exón 11 del gen DSP ha sido reportada una sola vez en literatura científica describiéndose como mutación causal en un individuo de 14 años afectado de MAVD.

En la familia afectada de MAVD en la que hemos encontrado esta variante, esta cosegrega con la enfermedad, y al ser una alteración que trunca la proteína la consideramos como claramente causal de la patología.

La variante *p.(Gln1925*)/g.41399C>T*, localizada en el exón 24 del gen DSP no ha sido previamente descrita. Afecta al dominio "rod" o vara de la desmoplaquina comprendido entre los aminoácidos 1057 a 1945.

En este dominio han sido descritas hasta el momento una docena de mutaciones *nonsense* con mecanismo fisiopatológico similar: *p.Gln1085**, *p.Arg1113**, *p.Arg1267**, *p.Arg1269**, *p.Gln1301**, *p.Trp1342**, *p.Gln1446**, *p.Leu1486**, *p.Glu1493**, *p.Gln1810**, *p.Gln1866** y *p.Arg1934**. Algunas de ellas se identificaron en pacientes que no solo cumplían criterios diagnósticos de MAVD sino que también presentaban compromiso ventricular izquierdo (dilatación y disfunción leves, en algunos casos hipertrabeculaculación) como por ejemplo *p.Arg1113**, *p.Gln1085** y *p.Gln1866**. Otras mutaciones han tenido un comportamiento de tipo recesivo o bien se manifestaron clínicamente en presencia de una segunda mutación (heterocigotos dobles o compuestos). En estos casos los pacientes tuvieron una presentación precoz que incluyó no solo el compromiso biventricular sino también manifestaciones cutáneas de la enfermedad (hiperqueratosis palmoplantar, pelo lanoso y epidermiolisis bullosa), con MS a muy temprana edad. Por tanto, si bien esta mutación no ha sido previamente descrita, la alteración proteica estructural que se deduce de su efecto y la información disponible sobre mutaciones próximas con efecto similar, hacen suponer que muy probablemente esté asociada con el desarrollo de MAVD

En la familia afectada de MAVD en la que hemos encontrado esta variante no es posible estudiar la cosegregación de la misma con la patología. Solo hay un individuo afectado que porta la variante y hasta el momento no se ha encontrado ninguna segunda mutación que podamos pensar que pueda

modular o este modulada por ésta para producir la patología y no se ha visto a ningún familiar afectado al que se le pudiera realizar el estudio genético.

La variante *p.Ala1074Serfs*/g.37773_37774insA* pertenece a un tipo de mutaciones que resultan del truncamiento de la molécula de desmoplaquina. Son frecuentemente patogénicas y en general se las asume como causa de la enfermedad aunque no hayan sido previamente reportadas. Hay varias mutaciones descritas, y asociadas a MAVD, que están ubicadas muy cerca de la posición 1074 y que producen un efecto de similar. Entre ellas, *p.F1016fs*, *p.E1068Vfs*1086* y *p.R1113** producen un truncamiento de la proteína muy próximo al que se observaría con *p.A1074Sfs*1087* y que han sido asociadas con MS a edad temprana y compromiso ventricular izquierdo (fundamentalmente dilatación, deterioro ligero de la fracción de eyección y, en algunos casos, hipertrabeculación apical). Otras mutaciones descritas que afectan los mismos dominios también han sido asociadas con afectación dérmica en forma de hiperqueratosis palmoplantar.

Por lo tanto, si bien esta variante genética no ha sido previamente descrita, la alteración proteica estructural que se deduce de su efecto y la información disponible sobre mutaciones próximas con efecto similar, hacen suponer que muy probablemente esté asociada con el desarrollo de MAVD.

En la familia afectada de MAVD en la que hemos encontrado esta variante, todos los afectados o posiblemente afectados por la patología son portadores de la variante. Ésta co-segrega claramente con la enfermedad y además los software predictores la valoran como causal.

La variante *p.Arg1537Cys/g.39163C>T*, localizada en el exón 23 del gen DSP ha sido identificada con frecuencia baja en población control. En el proyecto 5000 Genomas fue detectada en 120 (3 de ellos homocigotos) de 4300 sujetos de origen europeo-americano (MAF: 1,43) y en 13 (no se describen homocigotos) de 2203 sujetos afro-americanos (MAF: 0,2951). Además, aparece recogida en la base de datos Reference SNP (NCBI, PubMed/HapMap) con una frecuencia media de heterocigosidad de 0,019 y en varios artículos fue detectada en controles sanos con una frecuencia de 0,5-1%. Esta información sugiere que *p.Arg1537Cys* es un polimorfismo de baja

frecuencia en la población blanca y probablemente no está asociado al desarrollo de enfermedad.

En la familia afectada de MAVD en la que aparece esta variante (familia 6) se ha detectado previamente la variante p.Asp26Asn en el exón 1 del gen PKP2. Esto nos sugiere que quizás podamos volver a atribuir la teoría del doble “hit” a esta familia, pudiendo estar el polimorfismo modulando la patogenicidad de la variante p.Asp26Asn.

En el grupo de familias afectadas de MCD incluidas en este estudio se han detectado 3 variantes en el gen DSP:

La variante p.Gln447*/g.26873C>T está localizada en el exón 11 del gen DSP. No tenemos constancia de que esta variante genética haya sido descrita previamente.

Varias mutaciones en este gen se han asociado con el desarrollo de miocardiopatía arritmogénica de predominio ventricular izquierdo e incluso con afectación aislada de este ventrículo y simulando una MCD idiopática. En otros casos, se han descrito mutaciones en este gen con patrón de herencia autosómico dominante y asociadas con queratosis palmo-plantar y pelo lanoso (fenotípico asociado al síndrome de Carvajal).

Las mutaciones de truncamiento en DSP, independientemente de su posición exacta, se comportan de una manera agresiva y se caracterizan por una presentación inicial de la enfermedad, una alta carga de arritmias y MS (Lopez-Ayala *et. al*, 2014).

Tras el término “miocardiopatía arritmogénica” se encuentra un amplio espectro de fenotipos que van desde las formas clásicas de la enfermedad en la que está afectado el VD, pasando por formas de afectación biventricular hasta la afectación del VI. La variante p.Gln447* afecta predominantemente al VI.

Las 3 familias de este estudio en las que se ha encontrado esta variante están caracterizadas por que sus pacientes tienen afectación del VI excepto dos pacientes que tienen involucrado el VD. En las 3 familias la variante cosegrega con la enfermedad ya que todos los afectados son portadores y manifiestan una penetrancia particularmente alta (93%).

Las 3 familias se caracterizan por tener un fenotipo severo y muy similar por lo que se les realiza un estudio de marcadores microsatélites con el que se comprueba mediante el análisis de haplotipos que las 3 familias están emparentadas y tienen un antecesor común. En la búsqueda de un efecto fundador calculamos la edad de la mutación p.Gln447* y cuántas generaciones han pasado desde su origen.

La variante *IVS8-1G>A*, localizada en el intrón 8 del gen DSP no ha sido identificada hasta la fecha en bases de datos públicas de genotipado de población general. Las herramientas informáticas sugieren que el proceso de corte y empalme podría verse afectado. Hay poca constancia de variantes intrónicas que afecten al proceso de corte y empalme y que sean posiblemente patogénicas.

En la familia afectada de MCD en la que se ha encontrado esta variante no se puede concluir que esta sea causal de la patología, ya que la penetrancia es incompleta y solo tenemos un individuo afectado y portador.

En la familia afectada de MCD en la que aparece la variante *p.Arg1537Cys/g.39163C>T*, ésta cosegrega con la enfermedad (3 afectados y los 3 portadores), además, en esta familia se ha detectado otra variante en MYBPC3 que no cosegrega con la enfermedad (solo son portadores el probando y otro afectado). De esta manera no queda claro cuál es el efecto de la variante en DSP que está catalogada como benigna o variante moduladora en presencia de otra mutación.

2.1.4 Variantes detectadas en el gen que codifica para la proteína placofilina (PKP2).

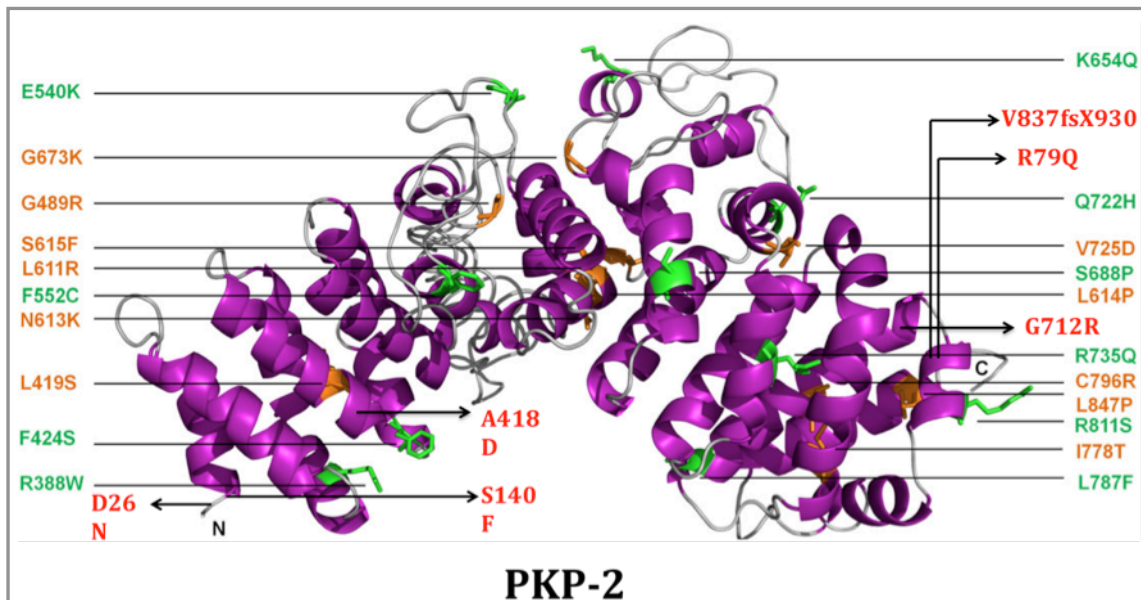


Figura 51.

Al igual que la placoglobina, las placofilinas interactúan con las cadherinas desmosómicas aunque existen diferencias de afinidad entre las diferentes placofilinas y las desmogleínas (Bonne et al., 2003; Hatzfeld et al., 2000). Las mutaciones en PKP2 son la causa más común del desarrollo de la MAVD. Hasta la fecha hay descritas en bases de datos más de 130 mutaciones patogénicas a lo largo del gen PKP2 implicadas en esta patología (van der Zwaag et al., 2009).

En el grupo de familias afectadas de MAVD incluidas en este estudio se han detectado 7 variantes en el gen PKP2:

La variante *p.Val837fs*930/g.104134delA*, localizada en el exón 13 del gen PKP2, es una mutación recurrente en las familias caucásicas occidentales de diferentes países y ha sido claramente asociada a la MAVD. La cosegregación con este fenotipo se ha demostrado en numerosas familias y su penetrancia parece ser incompleta (solo 2/3 de los portadores parecen afectados).

Una segunda mutación posiblemente patogénica fue identificada en 3 familias y los estudios de cosegregación demostraron en una de esas 3 familias

que sólo los portadores de las 2 variantes estaban clínicamente afectados a edad temprana y que los familiares que solamente portaban la variante Val837fs no estaban afectados. En la literatura hay descritos más de 1500 controles sanos que no son portadores de esta variante. La edad media del diagnóstico es de 23 años y la mayoría de afectados portadores están asintomáticos, sin embargo 2 pacientes presentaron síncope y otros dos MS como primer síntoma de la enfermedad. Principalmente está afectado el VD; solamente hay datos de que el VI esté involucrado en un paciente. La sustitución fibroadiposa quedó demostrada en dos pacientes que se sometieron a trasplante.

En la familia afectada de MAVD portadora de esta mutación (familia 4) no se ha encontrado hasta la fecha una segunda mutación que se considere moduladora, hay penetrancia incompleta y aunque no se ha podido concluir el estudio de cosegregación porque en la familia solo hay un afectado portador, consideramos la mutación como causa probable de la enfermedad. Los estudios bioinformáticos también consideran a la variante la causa de la patología.

La variante *IVS4-11T>C/g.45863T>C*, localizada en el intrón 4 del gen PKP2 no ha sido descrita previamente en artículos médicos, sin embargo aparece en una base de datos de un grupo de investigación holandés (<http://arvcdatabase.info>) y se la interpretó como de patogenicidad incierta, sin controles sanos disponibles.

Aparece recogida en la base de datos pública del NHLBI ESP con una frecuencia genotípica (heterocigosis de 0,6%) y como no afecta al splicing probablemente sea un polimorfismo y no esté asociada con el desarrollo de la enfermedad.

En la familia afectada de MAVD portadora de esta variante solo se ha realizado el estudio del caso índice, por lo que no es posible hablar de penetrancia ni de causalidad de esta variante en esta familia hasta que no se concluya el estudio.

La variante *p.Arg79*/g.17826C>T*, localizada en el exón 2 del gen PKP2 ha sido descrita en al menos 10 publicaciones científicas donde se la relaciona directamente con el desarrollo de la MAVD. El truncamiento temprano de

PKP2, en este caso en la posición 79 impide su interacción física con la desmoplaquina y conexina 43. Además la expresión de esta mutación se correlacionó con la pérdida de expresión de la HSP90, una proteína relevante para la apoptosis de los cardiomiocitos (Mukherjee *et. Al*, 2008).

En la familia afectada de MAVD portadora de esta variante no es posible calcular la cosegregación ya que solamente hay un individuo afectado, pero consideramos la alteración como claramente causal de la patología.

La variante *p.Asp26Asn/g.191G>A*, localizada en el exón 1 del gen PKP2 fue hallada por van Tintelen y cols. en un paciente perteneciente a una cohorte holandesa de casos índice con diagnóstico de MAVD (van Tintelen *et al.*, 2006). Los autores no pudieron establecer con certeza su patogenicidad (no afecta una región o aminoácido altamente conservado, está localizada fuera de los dominios funcionales y no produce un cambio de polaridad) y la denominaron “variante no clasificada”.

En un estudio de Cox *et al.* acerca de los parámetros de la taquicardia ventricular en pacientes con miocardiopatía arritmogénica (Cox *et al.*, 2008), encontraron esta variante en uno de los casos utilizados como controles (paciente con taquicardia del tracto de salida del VD y sin cardiopatía estructural).

Koopmann *et al.* identificaron esta variante y la clasificaron como polimorfismo en su estudio de 38 pacientes con síndrome de Brugada sin mutaciones identificadas en el gen SCN5A y en quienes se realizó screening de mutaciones en genes candidatos (Koopmann *et al.*, 2006) (Caveolin-3, Irx-3, Irx-4, Irx-5, Irx-6, JUP, PKP2, SCN1B, SCN2B, SCN3B, y SCN4B).

Rampazzo A., en una comunicación personal del año 2007, detectó esta variante en 5 de 105 controles sanos italianos. Los datos disponibles indican que esta variante no sería la causa de la enfermedad (Rampazzo, 2006). Ha sido encontrada en pacientes con otras patologías distintas de la miocardiopatía arritmogénica e incluso en casi el 5% de controles sanos de una serie. Por otro lado, ha sido identificada con una frecuencia mayor al 1% en bases de datos públicas que incluyen información genética de miles de individuos de distintas etnias. En la base de datos Exome Sequencing Project

(Exome Variant Server) ha sido identificada hasta ahora en heterocigosis en 56 de 4100 sujetos de origen Europeo y en 4 de 2072 Afroamericanos.

La variante *p.Ser140Phe/g.18386C>T*, localizada en el exón 3 del gen PKP2 ha sido descrita previamente en 22 artículos o comunicaciones. Hay información sobre esta mutación en 23 familias con acerca de 54 portadores (37 afectados o posiblemente afectados, 8 no afectados o sanos y 9 sin estudio fenotípico). se ha identificado hasta la fecha en heterocigosis en 25 de 4300 sujetos de origen Europeo (0.6%) y en 1 de 2203 sujetos Afro-Americanos pertenecientes al proyecto 5000Genomas (Exome Sequencing Project). También aparece reportada en dbSNP del NCBI (rs150821281) con frecuencias alélicas similares. Se ha identificado en controles sanos con una frecuencia media aproximada de heterocigosis de 0,5% pero no parece tener una distribución poblacional homogénea.

Además, esta variante ha sido identificada en pacientes con un fenotipo no asociado a mutaciones en PKP2. Un estudio realizado para buscar genes candidatos en 38 casos índice holandeses de raza caucásica con Síndrome de Brugada (SB) (mutaciones en el gen SCN5A previamente excluidas) detectó la *p.Ser140Phe* en uno de los pacientes y también en 75 controles sanos. También se ha identificado mediante NGS en un paciente de una familia española afectado de SB familiar.

Por otro lado hay datos que indican que esta variante es inocua. En un estudio publicado por Christensen *et al.* la variante fue identificada en 3/53 casos con MAVD y en 5/650 controles, indicando una distribución significativamente mayor entre los pacientes vs controles (5,7% vs 0,8%, $p=0.02$). La presencia de esta variante en pacientes portadores de otras mutaciones, determino en algunos casos un fenotipo más severo y en otros podría haber permitido la expresión de la enfermedad.

En la familia afectada de MAVD en la que se ha encontrado esta variante no se han encontrado hasta la fecha más variantes que puedan estar siendo moduladas por ésta.

La variante *p.Ala418Asp/g.45956C>A*, localizada en el exón 5 del gen PKP2, no ha sido aun descrita por lo que teniendo en cuenta las miles de muestras secuenciadas hasta la fecha se considera mutación. Se localiza en el

dominio ARM2 de la placofilina donde se han descrito varias mutaciones missense (por ejemplo p.Arg388Trp, p.Leu419Ser y p.Phe424Ser) que también producirían alteraciones físico-químicas en la proteína, y fueron asociadas al desarrollo de MAVD (confirmada clínica e histológicamente). El probando y uno de los hermanos portadores de una de estas mutaciones, p.Arg388Trp, presentaban la mutación en heterocigosis compuesta (junto a otra mutación en PKP2) determinando un fenotipo severo, con una presentación de la enfermedad en la infancia y evolución hacia el trasplante cardíaco a los 15 y 17 años de edad. Los familiares que presentaban la mutación en heterocigosis simple desarrollaron un fenotipo más leve y en algunos casos con diagnóstico "borderline". Respecto a los portadores de las otras 2 mutaciones (en heterocigosis simple) tampoco se describen pacientes con fenotipo severo o presentación muy precoz.

En la familia afectada de MAVD en la que se ha encontrado esta variante (familia 11) no ha podido realizarse el estudio de cosegregación ya que solo hay un individuo afectado y portador (probando), pero la variante, que según la mayoría de software predictores es causal (con un score próximo al máximo) probablemente sea la responsable de la enfermedad. Hay penetrancia incompleta (la hermana del probando es asintomática y portadora).

La variante *g.32976092_32978401del*, localizada en el exón 8 y abarcando parte de los intrones 7 y 8 del gen PKP2 está considerada una mutación no presente en controles sanos y probablemente asociada a la enfermedad.

Hay información sobre otra delección del exón 8 completa que fue identificada por Cox et al. en 1 de 169 casos índice con diagnóstico de MAVD (Holandeses de raza blanca) (Cox et al., 2011). El estudio de cosegregación en la familia no fue realizado ni se aportan más detalles clínicos del fenotipo. La técnica utilizada por los autores para la detección de esta mutación (MLPA) no permitió conocer el tamaño exacto del fragmento delecionado (solo se sabe que incluye también al exón 8). Este tipo de mutaciones que ocasionan grandes delecciones no están asociados de manera obligada a un fenotipo severo (por lo que se recomienda el estudio de cosegregación familiar) y son

poco frecuentes en PKP2, aunque se han descrito más casos relacionados directamente con la patología.

En la familia afectada de MAVD portadora de esta variante (familia 28) primero se detectó la variante mediante MLPA y posteriormente se confirmó mediante NGS en Health in Code con lo que además se pudo conocer el tamaño del fragmento deleciónado. La mutación cosegrega con la enfermedad (los dos individuos afectados son portadores) y podemos afirmar que posiblemente la mutación encontrada en esta familia sea la misma descrita anteriormente en la cohorte holandesa (a pesar de que no se conocía el tamaño de la misma) y por lo tanto la causante de la enfermedad.

En el grupo de familias afectadas de MCD incluidas en este estudio se han detectado 2 variantes en el gen PKP2:

La variante *p.Asp26Asn/g.191G>A* se ha encontrado en una familia afectada de MCD y que además es portadora de otra variante en DSG2 (ver

La variante *p.Arg79Gln/g.17826C>T*, localizada en el exón 2 del gen PKP2 no ha sido descrita en la literatura. En la región donde se localiza la mutación, se han descrito algunas variantes de tipo missense, algunas de ellas asociadas a la enfermedad.

En la familia afectada de MCD donde se ha encontrado esta mutación, hay que destacar que todos los individuos afectados y portadores de la mutación, también eran portadores de una segunda variante probablemente patogénica en JUP (*p.Thr19Ile*).

En el grupo de familias afectadas de SADS incluidas en este estudio se ha detectado 1 variante en el gen PKP2:

La variante *p.Gly712Arg/g.75480G>A*, localizada en el exón 10 del gen PKP2 no ha sido previamente descrita ni hay datos de que haya aparecido en controles sanos. Se han descrito mutaciones en zonas cercanas en la proteína que contribuyen a la desestabilización de la misma (*p.Cys796Arg*, *p.Ser615Phe* y *p.Lys654Gln*) (Al-Jassar et al., 2013b) y al desarrollo de la patología. El efecto de esta variante podría ser similar.

En la familia afectada de SADS incluida en este estudio (familia 27) la variante no cosegrega con la enfermedad, aunque con los datos aportados por

los software predictores (que la clasifican como causal) y basándonos en el efecto de las variantes de zonas cercanas podríamos considerarla como la causa de la patología en esta familia.

2.1.5. Variantes identificadas para los genes que codifican para el PLN y la LMNA

En el grupo de familias afectadas de MCD incluidas en este estudio se han detectado 1 variante en el gen PLN y 3 variantes en el gen LMNA:

La variante *p.Arg545His/g.22973G>A*, localizada en el exón 10 del gen LMNA no ha sido descrita en la literatura. Sin embargo, fue identificada en el estudio del exoma completo de más de 5000 individuos. Hasta el momento ha sido detectada en heterocigosis en 3 de 4241 sujetos de origen europeo (MAF: 0.0354) y en 0 de 2167 sujetos afro-americanos. No se dan detalles del fenotipo de estos portadores (Proyecto 5000 Genomas/Exome Variant Server).

Por otro lado, hay otra mutación de tipo missense que también afecta al residuo de arginina en posición 545 pero con cambio a cisteína (*Arg545Cys*). Esta mutación ha sido identificada en un paciente con un cuadro severo de distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Aparentemente la mutación se presentó "de novo" (no hay otros afectados en la familia y su madre no es portadora). Este niño presentaba debilidad muscular húmero-peroneal y contractura de los tendones del codo y de Aquiles (requirió extensión quirúrgica). A los 18 años desarrolló insuficiencia cardíaca. Acabó en silla de ruedas y con escoliosis marcada. Kander et al. estudiaron las consecuencias funcionales de esta mutación demostrando que la variante *Arg545Cys* producía lobulaciones y defectos en la estructura nuclear. Se alteraba la organización de las 2 proteínas que componen la membrana interna nuclear lamina A/C y emerina, mostrando una estructura en panal de abejas en el microscopio electrónico. También sugirieron un impacto en la expresión génica por alteraciones en la distribución de la histona trimetilada en la lisina 27 y de la ARN-polimerasa II fosforilada (indicadores de los dominios de cromatina inactivos y activos, respectivamente). Los mioblastos cultivados de un paciente con esta mutación

presentaron un índice elevado de envejecimiento y deficiencias en la formación de microtúbulos. Los autores concluyen que la mutación Arg545Cys alteraba tanto la proliferación como la diferenciación de los mioblastos.

En la familia afectada de MCD incluida en este estudio (familia 19), la variante no parece ser la causa de la patología. No se ha podido concluir el estudio de cosegregación, y a pesar de que los software predictores la catalogan como causal.

La variante *p.Arg321*/g.21219C>T*, localizada en el exón 6 del gen LMNA ha sido claramente asociada con el desarrollo de patología en la literatura internacional. Se han descrito 2 familias europeas de raza caucásica (Alemania y Dinamarca) con un total de 5 portadores de la mutación. Sólo uno de los portadores no presentaba hallazgos compatibles con la enfermedad en el momento del estudio clínico, probablemente debido a penetrancia incompleta relativa a la edad (mujer de 23 años). Todos los demás estaban afectados y se demostró clara cosegregación de la variante *p.Arg321** con el fenotipo en ambas familias. Además, se describen más de 900 controles sanos negativos para esta mutación.

Disponemos datos adicionales de una familia de León en la que el caso índice tiene 52 años y presenta disfunción ventricular severa (con ligera hipertrabeculación inferolateral, sin cumplir criterios diagnósticos), fibrilación auricular lenta y ACV a los 40 años; se le implantó un desfibrilador. Su padre había fallecido a los 61 años, pendiente de marcapasos; su tía paterna falleció súbitamente a los 35 años y su prima (hija de ésta última) ha recibido un trasplante cardíaco. El caso índice tiene dos hijas gemelas de 20 años, ambas portadoras, asintomáticas, con ecocardiogramas normales.

El fenotipo asociado a esta mutación es el de MCD, con presencia de trastornos de conducción aurículo-ventricular y/o de fibrilación auricular en algunos portadores, hallazgo frecuente en pacientes con mutaciones en el gen LMNA. Es de destacar que, en la mayoría de los casos, no se describen entre los portadores otros fenotipos extra-cardíacos asociados a mutaciones en este gen (distrofias musculares, lipodistrofias, progeria, etc.); incluso en la familia de origen danés se descartó la presencia de alteraciones sub-clínicas del músculo esquelético por resultados normales del nivel plasmático de CPK. Únicamente

en un caso proveniente de Reino Unido, se describe la presencia de miopatía asociada, pero no disponemos de más datos fenotípicos sobre el caso índice o la familia. La edad de diagnóstico está por encima de los 25-30 años, aunque hubo un paciente que progresó rápidamente con disfunción ventricular severa y precisó trasplantarse a los 34 años. La prevalencia de MS en las familias descritas es elevada, ocurriendo entre los 38 y 69 años; uno de estos casos falleció a pesar de tener implantado un marcapasos.

Geiger et al. investigaron aspectos funcionales de esta mutación analizando biopsias de tejido miocárdico y fibroblastos cultivados de pacientes portadores. Demostraron una reducción marcada en la cantidad relativa del transcrito mutado con respecto al salvaje. Esta reducción drástica estaría producida por la vía de degradación del ARN mensajero defectuoso (del inglés "nonsense-mediated mRNA decay"), que se considera un mecanismo de vigilancia para prevenir la acumulación de proteínas truncadas o erróneas potencialmente perjudiciales. En correspondencia con estos hallazgos, los autores no detectaron péptidos truncados de lamina A por análisis de Western Blot en las muestras de pacientes, que en cambio expresaban cantidades normales del péptido salvaje. Además, los estudios por inmuno-histoquímica demostraron una distribución normal de la lamina A/C y de otras proteínas de la membrana nuclear, como así también ausencia de alteraciones en la distribución de la cromatina o en la forma del núcleo. Sin embargo, la sobreexpresión de lamina A mutada en células HeLa provocó alteraciones mayores en la organización de la lamina A, tanto a nivel del núcleo como del citoplasma. Estos hallazgos sugirieron a los autores que la expresión del alelo mutado estaba disminuida significativamente pero no completamente abolida, y que la vía de degradación del ARNm defectuoso no podía prevenir completamente la síntesis de proteínas truncadas que, aun en pequeñas cantidades, influirían negativamente en las funciones estructurales y/o reguladoras de la lamina A/C.

La familia afectada de MCD incluida en este estudio solo consta hasta el momento de un individuo por lo que no podemos hablar de penetrancia ni cosegregación con la patología aunque seguramente la mutación sea la responsable de la enfermedad.

La variante *p.Arg225*/g.20132C>T*, localizada en el exón 4 del gen LMNA ha sido referenciada en al menos 6 publicaciones científicas. Se trata de una alteración que trunca la proteína y que da lugar a enfermedad de conducción cardiaca con desarrollo tardío o nulo de MCD. La alteración también se ha encontrado en sujetos afectados de MCD de una misma familia con enfermedad de conducción progresiva de inicio temprano, disritmias ventriculares, agrandamiento del VI y disfunción sistólica con MS o muerte por insuficiencia cardiaca.

La familia afectada de MCD incluida en este estudio solo consta hasta el momento de un individuo por lo que no podemos hablar de penetrancia ni cosegregación con la patología, pero consideramos la alteración como probablemente causal ya que se trata de un codón stop que trunca la proteína y además en los casos descritos se cataloga como variante patogénica causal.

La variante *p.Arg14del/g.15683_15685delAGA*, localizada en el exón 2 del gen PLN, ha sido descrita previamente en 32 artículos o comunicaciones. Esta mutación ha sido descrita en 111 familias. Hay información disponible acerca de 146 portadores de la mutación (120 afectados o posiblemente afectados, 18 no afectados o sanos, 8 sin estudio fenotípico). También disponemos de información acerca de 53 no portadores de la mutación (52 no afectados o sanos, 1 sin estudio fenotípico). Además se han encontrado 168 familiares sin estudio genético (6 pacientes con posible miocardiopatía dilatada, 42 pacientes con miocardiopatía dilatada, 1 paciente con posible miocardiopatía dilatada + posible miocardiopatía no compactada-hipertrabeculación, 1 paciente con posible miocardiopatía hipertrófica, 1 paciente con miocardiopatía hipertrófica, 1 paciente con extrasístoles ventriculares frecuentes, 4 pacientes con miocardiopatía arritmogénica, 3 pacientes con posible miocardiopatía arritmogénica, 19 MS por causa desconocida, 53 no afectados o sanos, 35 sin estudio fenotípico).

Recientemente, la mutación Arg14del ha sido identificada como mutación con efecto fundador en hasta el 14% de los casos en una numerosa cohorte de pacientes holandeses con miocardiopatía dilatada o arritmogénica. Estos últimos se caracterizaban por ondas T negativas en cara

lateral (V4-V6) y bajos voltajes, diferenciándose de los portadores de mutaciones desmosomales (onda T negativas en precordiales derechas). En un caso la Arg14del fue relacionada con miocardiopatía no compactada, pero el estudio familiar no pudo confirmar esta asociación. Se ha descrito que la mutación tiene una alta penetrancia. La edad promedio de diagnóstico fue 44 años. Los fenotipos más frecuentes fueron de miocardiopatía dilatada y miocardiopatía arritmogénica, con frecuente afectación del VI.

En la familia afectada de MCD incluida en este estudio (familia 24), la variante cosegrega con la enfermedad y la consideramos como causal clara de la patología, al igual que en los pacientes de varios países, los cuales comparten con esta familia características clínicas típicas como la baja amplitud de los complejos QRS que puede ser una manifestación temprana de la enfermedad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El estudio mediante secuenciación directa de los genes DSP, PKP2, DSC2, DSG2, JUP, PLN y LMNA en nuestra población, llevó a la identificación de mutaciones causales o probablemente causales de patología en un 57,1% de los casos y a la confirmación de las alteraciones en los familiares de los probandos.

2. El porcentaje de identificación de mutaciones causales o probablemente causales en el grupo de miocardiopatía arritmogénica fue de 60,0% y en el de miocardiopatía dilatada de 50,0%.

3. Se identificó una mutación probablemente causal en el único paciente del estudio fallecido de forma súbita con autopsia informada como normal (SADS). La mutaciones en los desmosomas podrían facilitar la aparición de arritmias malignas en un corazón sin cardiopatía estructural evidenciable histológicamente.

4. La utilización de softwares predictores para la evaluación de la patogenicidad de las variantes detectadas no siempre es útil; se necesita realizar un estudio de cosegregación en la correlación fenotipo-genotipo para determinar la patogenicidad, pudiendo coincidir esta o no con los resultados de las herramientas bioinformáticas. En determinados casos la utilidad de los software puede ser orientativo a la hora de determinar si una alteración es dañina o no, pero hay otros casos en los que el resultado es totalmente contrario a lo que nos dice el estudio de cosegregación familiar.

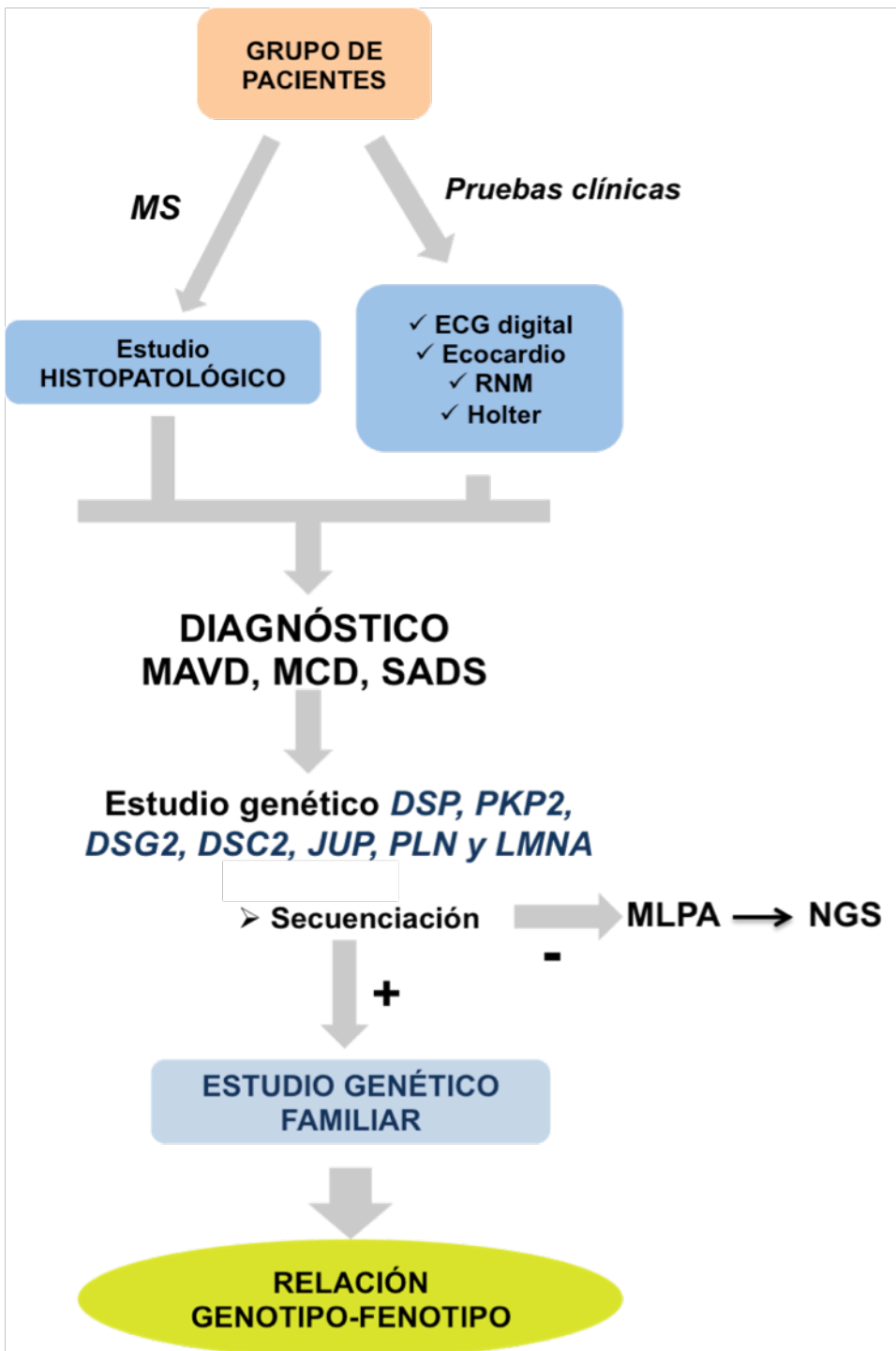
5. Se puede determinar el efecto fundador en familias que comparten una misma mutación para poder llegar al antecesor común y calcular el número aproximado de generaciones que han transcurrido desde que se originó la

mutación. Los años estimados que han pasado desde el origen de la mutación en DSP p.Gln447* son 673,5 años.

6. Se ha identificado un gran reordenamiento génico mediante la técnica del MLPA, lo que nos verifica su utilidad para los casos en los que el estudio genético familiar convencional por secuenciación directa es negativo tendiendo fenotipos que sugieren una alteración génica.

7. En nuestra cohorte no se han identificado variantes con comportamiento recesivo en ningún caso, aunque sí se sospecha que la presentación en doble heterocigosis pueda ser la causa de enfermedad en el 7,1% de los casos (dos familias).

ANEXO I



ANEXO II

ESTUDIO FAMILIAR DE MIOCARDIOPATIA ARRITMOGÉNICA DE VENTRÍCULO DERECHO

La miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho es una enfermedad que se caracteriza por la desaparición progresiva de parte del músculo del VD. En su lugar aparecen pequeñas cicatrices y zonas de grasa. Miocardiopatía quiere decir enfermedad del miocardio (músculo del corazón) y arritmogénica se refiere a la facilidad con que se producen arritmias o taquicardias. Estas arritmias, en ocasiones pueden ser graves. Es necesario por tanto realizar estudios para poner el tratamiento adecuado para prevenir la aparición de complicaciones. Al perder músculo del corazón puede aparecer debilidad, aunque la fuerza que necesita el VD para realizar su función es pequeña y no suele haber insuficiencia cardíaca (la bomba funciona habitualmente bien). El problema fundamental de esta enfermedad es la aparición de arritmias o taquicardias como consecuencia de zonas que quedan irritadas alrededor de las cicatrices.

La miocardiopatía arritmogénica de VD es una enfermedad rara (posiblemente afecta a una de cada 10000 personas en nuestra región). La causa de la enfermedad no es del todo conocida. Se sabe que hay alteraciones en proteínas necesarias para la unión de unas fibras musculares con otras. Existe un error en un gen que contiene la información necesaria para que estas proteínas se fabriquen en la cantidad o tengan la función de anclaje adecuada. Esta enfermedad puede ser hereditaria en un porcentaje del 30% aproximadamente. Cuando la enfermedad es hereditaria los afectados pueden pasarlo a sus hijos con una probabilidad de un 50% (herencia autonómica dominante). A pesar de ser hereditaria no se desarrolla hasta la adolescencia o edad adulta joven, con lo que los niños no suelen tener ninguna alteración en el corazón.

Una persona puede estar afectada y en cambio no tener ningún síntoma, es necesario, por lo tanto, realizar una exploración física, electrocardiograma y ecocardiograma, Holter y en ocasiones resonancia cardíaca para descubrirla. Esto es importante, porque es posible iniciar un tratamiento precoz que prevenga de complicaciones.

Usted o un familiar suyo ha sido diagnosticado de miocardiopatía arritmogénica de VD. Le ofrecemos la posibilidad de realizar una revisión que consideramos importante no solo para usted, sino también para el resto de su familia; ya que en caso de descubrir algún familiar con enfermedad es más importante realizar un seguimiento de sus descendientes y del resto de familiares.

La revisión consistiría en la elaboración de una historia clínica (preguntas sobre sus síntomas y antecedentes clínicos), una exploración física (auscultación, etc), un electrocardiograma y un ecocardiograma. Recogeremos una muestra de sangre para realización de estudios bioquímicos y genéticos sobre esta enfermedad, los datos recogidos serán almacenados en soporte informático y se conservará una muestra de sangre congelada para realizar un posterior análisis.

Para la realización de este estudio necesitaríamos su consentimiento. Agradeceríamos rellenara y firmara este documento. El médico firmante se responsabiliza de la confidencialidad de estos datos y asegura que no serán utilizados con otro objetivo diferente al que le hemos explicado.

Yo
D./D^a.,
DNI:, desearía formar parte del estudio de esta enfermedad, según las condiciones antes señaladas, y autorizo a los doctores Maria del Carmen Cerdán y Juan Ramón Gimeno para la realización de los análisis y pruebas oportunas.

Fdo:

Fdo:

Fecha:
estudio)

(médico responsable del

ANEXO III

ESTUDIO FAMILIAR DE MIOCARDIOPATIA DILATADA

La miocardiopatía dilatada es una enfermedad que se caracteriza por una disminución de la fuerza del corazón y un aumento de su tamaño. Miocardiopatía quiere decir enfermedad del miocardio (músculo del corazón) y dilatada se refiere al aumento de tamaño de sus cavidades. En muchas ocasiones, la miocardiopatía dilatada es consecuencia de una enfermedad de las arterias que llevan la sangre al músculo cardíaco (cardiopatía isquémica), otras veces es producida por enfermedades de las válvulas del corazón, y tiene muchas otras causas; pero casi en la mitad de los pacientes no es posible identificar ninguna. En estos casos decimos que la enfermedad es idiopática (de causa desconocida).

Se ha comprobado que en más de un 20% de las ocasiones, la miocardiopatía dilatada idiopática es una enfermedad familiar, que se puede transmitir genéticamente, y aparecer en algún miembro de la familia. En muchas familias se ha visto que es posible descubrir la enfermedad en sujetos que no presentan síntomas, mediante una exploración física, electrocardiograma y ecocardiograma. Esto es importante, porque es posible iniciar un tratamiento precoz que retrase la evolución de la enfermedad y evitar complicaciones importantes.

Usted o un familiar suyo ha sido diagnosticado de miocardiopatía dilatada. Le ofrecemos la posibilidad de realizar una revisión que consideramos importante no solo para usted, sino también para el resto de su familia; ya que en caso de descubrir algún familiar con enfermedad es más importante realizar un seguimiento de sus descendientes y del resto de familiares.

La revisión consistiría en la elaboración de una historia clínica (preguntas sobre sus síntomas y antecedentes clínicos), una exploración física (auscultación, etc), un electrocardiograma y un ecocardiograma. Recogeremos una muestra de sangre para realización de estudios bioquímicos y genéticos sobre esta enfermedad, los datos recogidos serán almacenados en soporte informático y se conservará una muestra de sangre congelada para realizar un posterior análisis.

Para la realización de este estudio necesitaríamos su consentimiento. Agradeceríamos rellenar y firmar este documento. El médico firmante se responsabiliza de la confidencialidad de estos datos y asegura que no serán utilizados con otro objetivo diferente al que le hemos explicado.

Yo
D./D^a.,
DNI:, desearía formar parte del estudio de esta
enfermedad, según las condiciones antes señaladas, y autorizo a los doctores
Maria del Carmen Cerdán y Juan Ramón Gimeno para la realización de los
análisis y pruebas oportunas.

Fdo:

Fdo:

Fecha:
estudio)

(médico responsable del

ANEXO IV

ESTUDIO FAMILIAR DE MUERTE SÚBITA

El 12% de los fallecimientos se producen de forma inesperada y súbita, la mayoría de estas son de origen cardiaco. La muerte cardiaca súbita tiene una incidencia baja en nuestro país. En más de la mitad de los casos se produce por la interrupción súbita de la circulación de sangre al músculo del corazón (cese del aporte de glucosa y oxígeno necesarios para la contracción del músculo) que en ocasiones llevan al infarto y en otras desencadenan arritmias malignas que llevan a la muerte. A pesar de que esta es la causa más importante en los adultos con factores de riesgo como hipertensión, diabetes, tabaquismo, niveles elevados de colesterol, y obesidad, son otras las causas más frecuentes en los individuos jóvenes (especialmente los menores de 35 años).

Algunas enfermedades del músculo cardiaco y algunas enfermedades del sistema eléctrico del corazón pueden condicionar la aparición de arritmias malignas en los individuos jóvenes. La miocardiopatía hipertrófica es la primera causa de MS en los menores de 35 años. Hay otras enfermedades del músculo que aunque más infrecuentes también pueden causar parada cardiaca como son la miocardiopatía dilatada y la miocardiopatía arritmogénica de VD. Entre las enfermedades del sistema eléctrico más frecuentemente asociadas a MS se encuentran el síndrome de QT largo y el síndrome de Brugada. En ocasiones las anomalías congénitas de las arterias coronarias son también causa de parada cardiaca.

En ocasiones el fallecimiento en estas enfermedades aparece en ausencia de síntomas previos en una persona aparentemente sana. En un porcentaje que oscila entre un 20% y un 50% estas enfermedades afectan a varios individuos en la misma familia y pueden por tanto heredarse. El diagnóstico adecuado es preciso para realizar una correcta valoración del riesgo y comenzar un tratamiento preventivo eficaz.

Un familiar suyo ha sufrido un episodio de parada cardiaca posiblemente como consecuencia de una arritmia maligna relacionada con alguna de estas enfermedades. Le ofrecemos la posibilidad de realizar una revisión que consideramos importante no solo para usted, sino también para el resto de su

familia. La revisión consistiría en la elaboración de una historia clínica (preguntas sobre sus síntomas y antecedentes clínicos), una exploración física (auscultación, etc), un electrocardiograma, un ecocardiograma, una prueba de esfuerzo y un electrocardiograma de 24 horas de duración (Holter). Es posible que además le aconsejemos la realización de una prueba de provocación con un fármaco para desenmascarar alteraciones ocultas en el electrocardiograma. Recogeremos una muestra de sangre para realización de estudios bioquímicos y genéticos sobre esta enfermedad, los datos recogidos serán almacenados en soporte informático y se conservará una muestra de sangre congelada para realizar un posterior análisis.

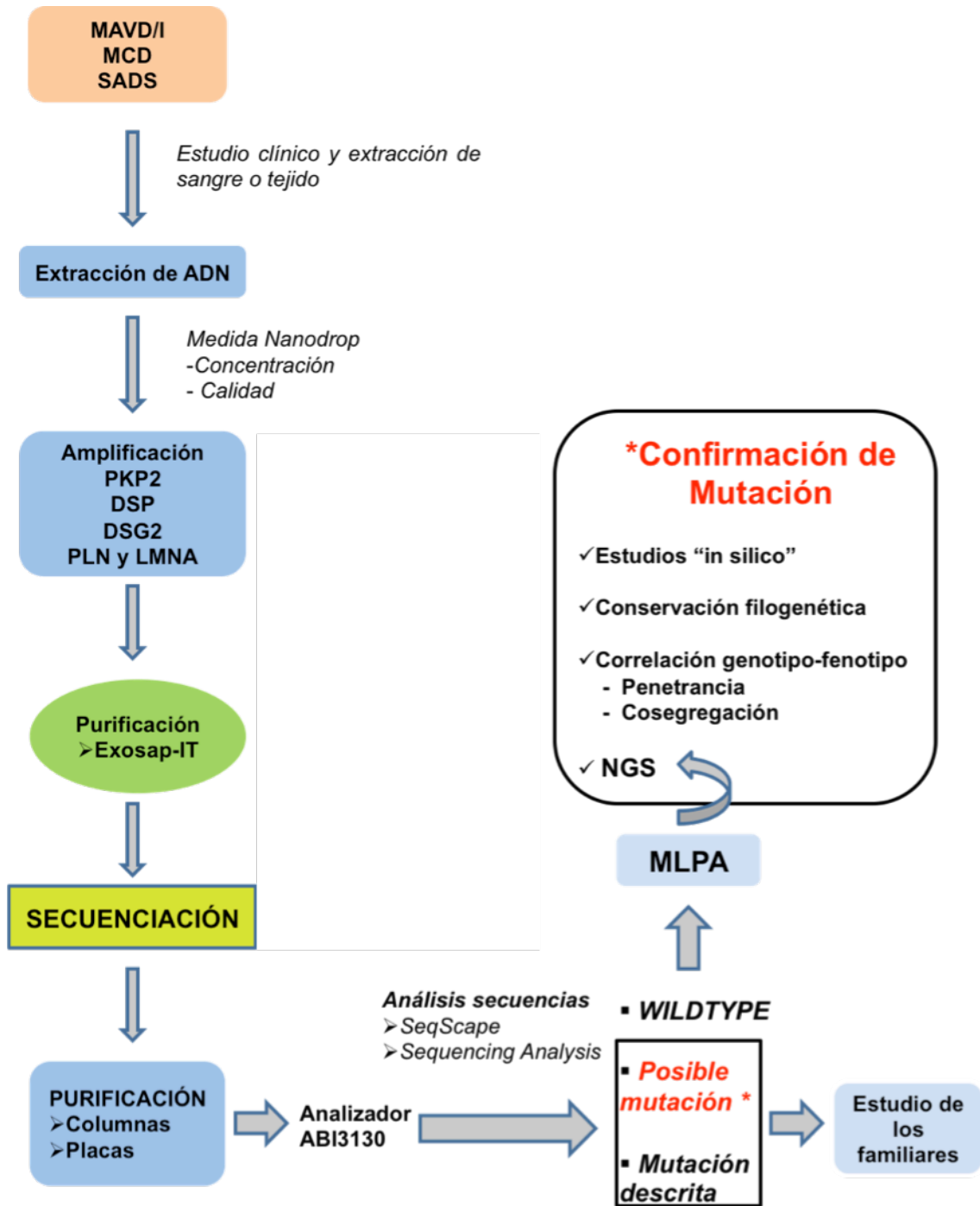
Para la realización de este estudio necesitaríamos su consentimiento. Agradeceríamos rellenara y firmara este documento. El médico firmante se responsabiliza de la confidencialidad de estos datos y asegura que no serán utilizados con otro objetivo diferente al que le hemos explicado.

Yo
D./D^a.,
DNI:, desearía formar parte del estudio de esta enfermedad, según las condiciones antes señaladas, y autorizo a los doctores Javier Lacunza Ruiz y Juan R Gimeno Blanes para la realización de los análisis y pruebas oportunas.

Fdo:

Fecha:

ANEXO V



ANEXO VI

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene							
		reference	PKP2	DSG2	DSP	TGFβ3	DSC2	JUP	RYR2
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA								
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation								
100	X-fragment: Specific for the X chromosome								
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome								
124	Reference probe 15370-L13762	7q11							
130	DSG2 probe 15483-L17323			Exon 1					
135	DSC2 probe 15484-L17324						Exon 1		
142	PKP2 probe 05383-L04780		Promoter						
148	PKP2 probe 05391-L04788		Exon 8						
160	TGFβ3 probe 05414-L04824					Exon 1			
166	Reference probe 09106-L09165	4q25							
172	PKP2 probe 05384-L04781		Exon 1						
178	PKP2 probe 05392-L04789		Exon 9						
183	DSP probe 05418-L16572				Exon 5				
196	JUP probe 14866-L16590						Exon 2		
202	PKP2 probe 05385-L17138		Exon 2						
207	PKP2 probe 05393-L04790		Exon 10						
212	DSP probe 05419-L04829				Exon 7				
220	DSG2 probe 15486-L17326			Exon 15					
232	DSC2 probe 15487-L17327						Exon 7		
238	PKP2 probe 05386-L04783		Exon 3						
247	DSP probe 14863-L16585				Exon 1				
256	DSP probe 05420-L04830				Exon 9				
265	TGFβ3 probe 05415-L04825					Exon 6			
274	Reference probe 05989-L05414	20p12							
282	PKP2 probe 05387-L04784		Exon 4						
288	PKP2 probe 15488-L18692		Exon 6						
292	PKP2 probe 05395-L04792		Exon 12						
301	RYR2 probe 05935-L04837							Exon 3	
310	DSP probe 05936-L04831				Exon 21				
319	Reference probe 06552-L06110	5q13							
330	PKP2 probe 05388-L04785		Exon 5						
337	PKP2 probe 05396-L04793		Exon 13						
352	RYR2 probe 05428-L04838							Exon 97	
361	Reference probe 08674-L08686	9q31							
373	DSC2 probe 15489-L17329						Exon 17		
381	PKP2 probe 05397-L04794		Exon 14						
391	DSP probe 05423-L04833				Exon 24				
400	TGFβ3 probe 14865-L16589					Exon 7			
409	Reference probe 05217-L04586	13q12							
420	PKP2 probe 05390-L15906		Exon 7						
427	PKP2 probe 05411-L04821		Exon 4						
436	JUP probe 05426-L04836							Exon 12	
445	Reference probe 14843-L16551	10q26							
454	JUP probe 05937-L04835							Exon 9	
463	PKP2 probe 05413-L04823		Exon 11						
481	DSG2 probe 15490-L17330			Exon 6					
490	Reference probe 15547-L17402	22q11							

REFERENCIAS

Al-Jassar C, Bikker H, Overduin M and Chidgey M (2013a) Mechanistic Basis of Desmosome-Targeted Diseases. *J Mol Biol* **425**:4006-4022.

Albina G, Laiño R, Giniger A (2009). Displasia Arritmogénica de Ventrículo Derecho: Revisión de una enfermedad poco común con un espectro variado de presentaciones clínicas. *Rev Electro y Arritmias* **4**:139144.

Angst BD, Nilles L A and Green K J (1990) Desmoplakin II Expression Is Not Restricted to Stratified Epithelia. *J Cell Sci* **97 (Pt 2)**:247-257.

Antoniades L, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Syrris P, Asimaki A, Panagiotakos D, Zambartas C, Stefanadis C, McKenna W J and Protonotarios N (2006) Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by Deletions in Plakophilin-2 and Plakoglobin (Naxos Disease) in Families From Greece and Cyprus: Genotype-Phenotype Relations, Diagnostic Features and Prognosis. *Eur Heart J* **27**:2208-2216.

Awad MM, Dalal D, Tichnell C, James C, Tucker A, Abraham T, Spevak P J, Calkins H and Judge D P (2006) Recessive Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia Due to Novel Cryptic Splice Mutation in PKP2. *Hum Mutat* **27**:1157.

Bannon LJ, Cabrera B L, Stack M S and Green K J (2001) Isoform-Specific Differences in the Size of Desmosomal Cadherin/Catenin Complexes. *J Invest Dermatol* **117**:1302-1306.

Basso C, Thiene G, Corrado D, Angelini A, Nava A and Valente M (1996) Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. Dysplasia, Dystrophy, or Myocarditis? *Circulation* **94**:983-991.

Bauce B, Rampazzo A, Basso C, Mazzotti E, Rigato I, Steriotis A, Beffagna G, Lorenzon A, De B M, Pilichou K, Marra M P, Corbetti F, Daliento L, Iliceto S, Corrado D, Thiene G and Nava A (2011) Clinical Phenotype and Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Pediatric Patients Carrying Desmosomal Gene Mutations. *Heart Rhythm* **8**:1686-1695.

Behr E, Wood D A, Wright M, Syrris P, Sheppard M N, Casey A, Davies M J and McKenna W (2003) Cardiological Assessment of First-Degree Relatives in Sudden Arrhythmic Death Syndrome. *Lancet* **362**:1457-1459.

Biedermann K, Vogelsang H, Becker I, Plaschke S, Siewert J R, Hofler H and Keller G (2005) Desmoglein 2 Is Expressed Abnormally Rather Than Mutated in Familial and Sporadic Gastric Cancer. *J Pathol* **207**:199-206.

Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner B M and Shapiro L (2002) C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms. *Science* **296**:1308-1313.

Bonne S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green K J and van R F (2003) Defining Desmosomal Plakophilin-3 Interactions. *J Cell Biol* **161**:403-416.

Bonne S, van H J, Nollet F, Kools P and van R F (1999) Plakophilin-3, a Novel Armadillo-Like Protein Present in Nuclei and Desmosomes of Epithelial Cells. *J Cell Sci* **112 (Pt 14)**:2265-2276.

Bornslaeger EA, Godsel L M, Corcoran C M, Park J K, Hatzfeld M, Kowalczyk A P and Green K J (2001) Plakophilin 1 Interferes With Plakoglobin Binding to Desmoplakin, Yet Together With Plakoglobin Promotes Clustering of Desmosomal Plaque Complexes at Cell-Cell Borders. *J Cell Sci* **114**:727-738.

Brooke MA, Nitoiu D and Kelsell D P (2012) Cell-Cell Connectivity: Desmosomes and Disease. *J Pathol* **226**:158-171.

Burke AP, Farb A, Tashko G and Virmani R (1998) Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and Fatty Replacement of the Right Ventricular Myocardium: Are They Different Diseases? *Circulation* **97**:1571-1580.

Cabral RM, Wan H, Cole C L, Abrams D J, Kelsell D P and South A P (2010) Identification and Characterization of DSPla, a Novel Isoform of Human Desmoplakin. *Cell Tissue Res* **341**:121-129.

Calabrese F, Angelini A, Thiene G, Basso C, Nava A and Valente M (2000) No Detection of Enteroviral Genome in the Myocardium of Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Clin Pathol* **53**:382-387.

Calabrese F, Basso C, Carturan E, Valente M and Thiene G (2006) Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Is There a Role for Viruses? *Cardiovasc Pathol* **15**:11-17.

Carboni N, Sardu C, Cocco E, Marrosu G, Manzi R C, Nissardi V, Isola F, Mateddu A, Solla E, Maioli M A, Oppo V, Piras R, Coghe G, Lai C and Marrosu M G (2012) Cardiac Involvement in Patients With Lamin A/C Gene Mutations: a Cohort Observation. *Muscle Nerve* **46**:187-192.

Chitaev NA, Averbakh A Z, Troyanovsky R B and Troyanovsky S M (1998) Molecular Organization of the Desmoglein-Plakoglobin Complex. *J Cell Sci* **111 (Pt 14)**:1941-1949.

Choi HJ, Gross J C, Pokutta S and Weis W I (2009) Interactions of Plakoglobin and Beta-Catenin With Desmosomal Cadherins: Basis of Selective Exclusion of Alpha- and Beta-Catenin From Desmosomes. *J Biol Chem* **284**:31776-31788.

Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe L T, Green K J and Weis W I (2002) Structures of Two Intermediate Filament-Binding Fragments of Desmoplakin Reveal a Unique Repeat Motif Structure. *Nat Struct Biol* **9**:612-620.

Christensen AH, Benn M, Bundgaard H, Tybjaerg-Hansen A, Haunso S and Svendsen J H (2010) Wide Spectrum of Desmosomal Mutations in Danish

Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Med Genet* **47**:736-744.

Chugh SS, Kelly K L and Titus J L (2000) Sudden Cardiac Death With Apparently Normal Heart. *Circulation* **102**:649-654.

Corrado D, Basso C, Thiene G, McKenna W J, Davies M J, Fontaliran F, Nava A, Silvestri F, Blomstrom-Lundqvist C, Wlodarska E K, Fontaine G and Camerini F (1997) Spectrum of Clinicopathologic Manifestations of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: a Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol* **30**:1512-1520.

Corrado D, Thiene G, Nava A, Rossi L and Pennelli N (1990) Sudden Death in Young Competitive Athletes: Clinicopathologic Correlations in 22 Cases. *Am J Med* **89**:588-596.

Cox MG, Nelen M R, Wilde A A, Wiesfeld A C, van der Smagt J J, Loh P, Cramer M J, Doevendans P A, van Tintelen J P, de Bakker J M and Hauer R N (2008) Activation Delay and VT Parameters in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: Toward Improvement of Diagnostic ECG Criteria. *J Cardiovasc Electrophysiol* **19**:775-781.

Cox MG, van der Zwaag P A, van der Werf C, van der Smagt J J, Noorman M, Bhuiyan Z A, Wiesfeld A C, Volders P G, van Langen I M, Atsma D E, Dooijes D, van den Wijngaard A, Houweling A C, Jongbloed J D, Jordaens L, Cramer M J, Doevendans P A, de Bakker J M, Wilde A A, van Tintelen J P and Hauer R N (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.

Dalla VS, Battaglia G and ZERBINI E (1961) "Auricularization" of Right Ventricular Pressure Curve. *Am Heart J* **61**:25-33.

Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, Adler Y, Anastasakis A, Böhm M, Duboc D, Gimeno J, de Groote P, Imazio M, Heymans S, Klingel K, Komajda M, Limongelli G, Linhart A, Mogensen J, Moon J, Pieper PG, Seferovic PM, Schueler S, Zamorano JL, Caforio AL, Charron P. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* **37(23)**:1850-8

De BM, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Smaniotta G, Rigato I, Calore M, Li Mura I E, Basso C, Thiene G, Lanfranchi G, Danieli G A, Nava A and Rampazzo A (2010) The P.A897KfsX4 Frameshift Variation in Desmocollin-2 Is Not a Causative Mutation in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* **18**:776-782.

den Haan AD, Tan B Y, Zikusoka M N, Llado L I, Jain R, Daly A, Tichnell C, James C, Amat-Alarcon N, Abraham T, Russell S D, Bluemke D A, Calkins H, Dalal D and Judge D P (2009) Comprehensive Desmosome Mutation Analysis in North Americans With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* **2**:428-435.

Delva E, Tucker D K and Kowalczyk A P (2009a) The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**:a002543.

Delva E, Tucker D K and Kowalczyk A P (2009b) The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**:a002543.

Elliott P, O'Mahony C, Syrris P, Evans A, Rivera S C, Sheppard M N, Carr-White G, Pantazis A and McKenna W J (2010) Prevalence of Desmosomal Protein Gene Mutations in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* **3**:314-322.

Fontaine G, Frank R, Guiraudon G, Pavie A, Tereau Y, Chomette G and Grosogoeat Y (1984) [Significance of Intraventricular Conduction Disorders Observed in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **77**:872-879.

Fornes P, Ratel S and Lecomte D (1998) Pathology of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia--an Autopsy Study of 20 Forensic Cases. *J Forensic Sci* **43**:777-783.

Franke WW, Schumacher H, Borrmann C M, Grund C, Winter-Simanowski S, Schlechter T, Pieperhoff S and Hofmann I (2007) The Area Composita of Adhering Junctions Connecting Heart Muscle Cells of Vertebrates - III: Assembly and Disintegration of Intercalated Disks in Rat Cardiomyocytes Growing in Culture. *Eur J Cell Biol* **86**:127-142.

Gallicano GI, Bauer C and Fuchs E (2001) Rescuing Desmoplakin Function in Extra-Embryonic Ectoderm Reveals the Importance of This Protein in Embryonic Heart, Neuroepithelium, Skin and Vasculature. *Development* **128**:929-941.

Gallano P. Técnicas de diagnóstico molecular. *Neurol Supl* 1(3), 14-18. 2005.
Ref Type: Generic

Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo M J, Willerson J T, Schneider M D, Khoury D S and Marian A J (2006) Suppression of Canonical Wnt/Beta-Catenin Signaling by Nuclear Plakoglobin Recapitulates Phenotype of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Clin Invest* **116**:2012-2021.

Garcia-Pavia P, Syrris P, Salas C, Evans A, Mirelis J G, Cobo-Marcos M, Vilches C, Bornstein B, Segovia J, Alonso-Pulpon L and Elliott P M (2011) Desmosomal Protein Gene Mutations in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy Undergoing Cardiac Transplantation: a Clinicopathological Study. *Heart* **97**:1744-1752.

Garrod D and Chidgey M (2008) Desmosome Structure, Composition and Function. *Biochim Biophys Acta* **1778**:572-587.

Garrod DR, Merritt A J and Nie Z (2002) Desmosomal Cadherins. *Curr Opin Cell Biol* **14**:537-545.

Getsios S, Huen A C and Green K J (2004) Working Out the Strength and Flexibility of Desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:271-281.

Gimeno JR, Lacunza J, Garcia-Alberola A, Cerdan M C, Oliva M J, Garcia-Molina E, Lopez-Ruiz M, Castro F, Gonzalez-Carrillo J, de la Morena G and Valdes M (2009) Penetrance and Risk Profile in Inherited Cardiac Diseases Studied in a Dedicated Screening Clinic. *Am J Cardiol* **104**:406-410.

Green KJ and Gaudry C A (2000) Are Desmosomes More Than Tethers for Intermediate Filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**:208-216.

Hamid MS, Norman M, Quraishi A, Firoozi S, Thaman R, Gimeno J R, Sachdev B, Rowland E, Elliott P M and McKenna W J (2002) Prospective Evaluation of Relatives for Familial Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia Reveals a Need to Broaden Diagnostic Criteria. *J Am Coll Cardiol* **40**:1445-1450.

Harrison OJ, Jin X, Hong S, Bahna F, Ahlsen G, Brasch J, Wu Y, Vendome J, Felsovalyi K, Hampton C M, Troyanovsky R B, Ben-Shaul A, Frank J, Troyanovsky S M, Shapiro L and Honig B (2011) The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins. *Structure* **19**:244-256.

Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K and Vinzens U (2000) The Function of Plakophilin 1 in Desmosome Assembly and Actin Filament Organization. *J Cell Biol* **149**:209-222.

Hatzfeld M (2005) The P120 Family of Cell Adhesion Molecules. *Eur J Cell Biol* **84**:205-214.

Hatzfeld M (2007) Plakophilins: Multifunctional Proteins or Just Regulators of Desmosomal Adhesion? *Biochim Biophys Acta* **1773**:69-77.

Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K and Vinzens U (2000) The Function of Plakophilin 1 in Desmosome Assembly and Actin Filament Organization. *J Cell Biol* **149**:209-222.

Heid HW, Schmidt A, Zimbelmann R, Schafer S, Winter-Simanowski S, Stumpp S, Keith M, Figge U, Schnolzer M and Franke W W (1994) Cell Type-Specific Desmosomal Plaque Proteins of the Plakoglobin Family: Plakophilin 1 (Band 6 Protein). *Differentiation* **58**:113-131.

Heim A, Grumbach I, Stille-Siegener M and Figulla H R (1997) Detection of Enterovirus RNA in the Myocardium of a Patient With Arrhythmogenic Right

Ventricular Cardiomyopathy by in Situ Hybridization. *Clin Infect Dis* **25**:1471-1472.

Hein S, Scholz D, Fujitani N, Rennollet H, Brand T, Friedl A and Schaper J (1994) Altered Expression of Titin and Contractile Proteins in Failing Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **26**:1291-1306.

Hershberger RE, Cowan J, Morales A and Siegfried J D (2009) Progress With Genetic Cardiomyopathies: Screening, Counseling, and Testing in Dilated, Hypertrophic, and Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* **2**:253-261.

Hodgkinson KA, Connors S P, Merner N, Haywood A, Young T L, McKenna W J, Gallagher B, Curtis F, Bassett A S and Parfrey P S (2013) The Natural History of a Genetic Subtype of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Caused by a P.S358L Mutation in TMEM43. *Clin Genet* **83**:321-331.

Hofmann I, Mertens C, Brettel M, Nimmrich V, Schnolzer M and Herrmann H (2000) Interaction of Plakophilins With Desmoplakin and Intermediate Filament Proteins: an in Vitro Analysis. *J Cell Sci* **113 (Pt 13)**:2471-2483.

Holthofer B, Windoffer R, Troyanovsky S and Leube R E (2007) Structure and Function of Desmosomes. *Int Rev Cytol* **264**:65-163.

Huber AH and Weis W I (2001) The Structure of the Beta-Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by Beta-Catenin. *Cell* **105**:391-402.

Janicki JS (1992) Myocardial Collagen Remodeling and Left Ventricular Diastolic Function. *Braz J Med Biol Res* **25**:975-982.

Joshi-Mukherjee R, Coombs W, Musa H, Oxford E, Taffet S, Delmar M (2008) Characterization of the molecular phenotype of two arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)-related plakophilin-2 (PKP2) mutations. *Heart Rythm* **5(12)**:1715-23

Kapplinger JD, Landstrom A P, Salisbury B A, Callis T E, Pollevick G D, Tester D J, Cox M G, Bhuiyan Z, Bikker H, Wiesfeld A C, Hauer R N, van Tintelen J P, Jongbloed J D, Calkins H, Judge D P, Wilde A A and Ackerman M J (2011) Distinguishing Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia-Associated Mutations From Background Genetic Noise. *J Am Coll Cardiol* **57**:2317-2327.

Kayvanpour E, Sedaghat-Hamedani F, Amr A, Lai A, Haas J, Holzer DB, Frese KS Keller A³, Jensen K, Katus HA, Meder B. Genotype-phenotype associations in dilated cardiomyopathy: meta-analysis on more than 8000 individuals. *Clin Res Cardiol*. 2017 Feb;106(2):127-139.

Kies P, Bootsma M, Bax J, Schalij M J and van der Wall E E (2006) Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: Screening, Diagnosis, and Treatment. *Heart Rhythm* **3**:225-234.

King IA, Sullivan K H, Bennett R, Jr. and Buxton R S (1995) The Desmocollins of Human Foreskin Epidermis: Identification and Chromosomal Assignment of a Third Gene and Expression Patterns of the Three Isoforms. *J Invest Dermatol* **105**:314-321.

Koopmann TT, Bezzina C R and Wilde A A (2006) Voltage-Gated Sodium Channels: Action Players With Many Faces. *Ann Med* **38**:472-482.

Kottke MD, Delva E and Kowalczyk A P (2006) The Desmosome: Cell Science Lessons From Human Diseases. *J Cell Sci* **119**:797-806.

Kowalczyk AP, Bornslaeger E A, Borgwardt J E, Palka H L, Dhaliwal A S, Corcoran C M, Denning M F and Green K J (1997) The Amino-Terminal Domain of Desmoplakin Binds to Plakoglobin and Clusters Desmosomal Cadherin-Plakoglobin Complexes. *J Cell Biol* **139**:773-784.

Kowalczyk AP and Green K J (2013) Structure, Function, and Regulation of Desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* **116**:95-118.

Kowalczyk AP, Hatzfeld M, Bornslaeger E A, Kopp D S, Borgwardt J E, Corcoran C M, Settler A and Green K J (1999) The Head Domain of Plakophilin-1 Binds to Desmoplakin and Enhances Its Recruitment to Desmosomes. Implications for Cutaneous Disease. *J Biol Chem* **274**:18145-18148.

Kowalczyk AP, Stappenbeck T S, Parry D A, Palka H L, Virata M L, Bornslaeger E A, Nilles L A and Green K J (1994) Structure and Function of Desmosomal Transmembrane Core and Plaque Molecules. *Biophys Chem* **50**:97-112.

Lahtinen AM, Lehtonen E, Marjamaa A, Kaartinen M, Helio T, Porthan K, Oikarinen L, Toivonen L, Swan H, Jula A, Peltonen L, Palotie A, Salomaa V and Kontula K (2011) Population-Prevalent Desmosomal Mutations Predisposing to Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Heart Rhythm* **8**:1214-1221.

Larsen MK, Nissen P H, Berge K E, Leren T P, Kristensen I B, Jensen H K and Banner J (2012) Molecular Autopsy in Young Sudden Cardiac Death Victims With Suspected Cardiomyopathy. *Forensic Sci Int* **219**:33-38.

Legan PK, Yue K K, Chidgey M A, Holton J L, Wilkinson R W and Garrod D R (1994) The Bovine Desmocollin Family: a New Gene and Expression Patterns Reflecting Epithelial Cell Proliferation and Differentiation. *J Cell Biol* **126**:507-518.

Li J and Radice G L (2010) A New Perspective on Intercalated Disc Organization: Implications for Heart Disease. *Dermatol Res Pract* **2010**:207835.

Lombardi R and Marian A J (2011) Molecular Genetics and Pathogenesis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: a Disease of Cardiac Stem Cells. *Pediatr Cardiol* **32**:360-365.

López-Ayala JM, Gómez-Milanés I, Sánchez Muñoz JJ, Ruiz-Espejo F, Ortíz M, González-Carrillo J, López-Cuenca D, Oliva-Sandoval MJ, Monserrat L, Valdés M, Gimeno JR (2014). Desmoplakin truncations and arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy: characterizing a phenotype. *Europace* **12**:1838-46

MacLennan DH, Asahi M and Tupling A R (2003) The Regulation of SERCA-Type Pumps by Phospholamban and Sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci* **986**:472-480.

Marcus FI, Fontaine G H, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau J L, Malergue C and Grosogogeat Y (1982) Right Ventricular Dysplasia: a Report of 24 Adult Cases. *Circulation* **65**:384-398.

Marcus FI, McKenna W J, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke D A, Calkins H, Corrado D, Cox M G, Daubert J P, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard M H, Protonotarios N, Saffitz J E, Sanborn D M, Steinberg J S, Tandri H, Thiene G, Towbin J A, Tsatsopoulou A, Wichter T and Zareba W (2010) Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Proposed Modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J* **31**:806-814.

Maron BJ, Shirani J, Poliac L C, Mathenge R, Roberts W C and Mueller F O (1996) Sudden Death in Young Competitive Athletes. Clinical, Demographic, and Pathological Profiles. *JAMA* **276**:199-204.

Matsumori A (2006) Role of Hepatitis C Virus in Cardiomyopathies. *Ernst Schering Res Found Workshop*99-120.

McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G and Camerini F (1994) 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**:215-218.

McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S and McKenna W J (2000a) Identification of a Deletion in Plakoglobin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy With Palmoplantar Keratoderma and Woolly Hair (Naxos Disease). *Lancet* **355**:2119-2124.

McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S and McKenna W J (2000b) Identification of a Deletion in Plakoglobin in Arrhythmogenic Right Ventricular

Cardiomyopathy With Palmoplantar Keratoderma and Woolly Hair (Naxos Disease). *Lancet* **355**:2119-2124.

Mertens C, Kuhn C and Franke W W (1996) Plakophilins 2a and 2b: Constitutive Proteins of Dual Location in the Karyoplasm and the Desmosomal Plaque. *J Cell Biol* **135**:1009-1025.

Mertens C, Kuhn C, Moll R, Schwetlick I and Franke W W (1999) Desmosomal Plakophilin 2 As a Differentiation Marker in Normal and Malignant Tissues. *Differentiation* **64**:277-290.

Morales A, Cowan J, Dagua J and Hershberger R E (2008) Family History: an Essential Tool for Cardiovascular Genetic Medicine. *Congest Heart Fail* **14**:37-45.

Morentin B, Suarez-Mier M P and Aguilera B (2003) Sudden Unexplained Death Among Persons 1-35 Years Old. *Forensic Sci Int* **135**:213-217.

Nagar B, Overduin M, Ikura M and Rini J M (1996) Structural Basis of Calcium-Induced E-Cadherin Rigidification and Dimerization. *Nature* **380**:360-364.

Norgett EE, Hatsell S J, Carvajal-Huerta L, Cabezas J C, Common J, Purkis P E, Whittock N, Leigh I M, Stevens H P and Kelsell D P (2000) Recessive Mutation in Desmoplakin Disrupts Desmoplakin-Intermediate Filament Interactions and Causes Dilated Cardiomyopathy, Woolly Hair and Keratoderma. *Hum Mol Genet* **9**:2761-2766.

Norman M, Simpson M, Mogensen J, Shaw A, Hughes S, Syrris P, Sen-Chowdhry S, Rowland E, Crosby A and McKenna W J (2005) Novel Mutation in Desmoplakin Causes Arrhythmogenic Left Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation* **112**:636-642.

North AJ, Chidgey M A, Clarke J P, Bardsley W G and Garrod D R (1996) Distinct Desmocollin Isoforms Occur in the Same Desmosomes and Show Reciprocally Graded Distributions in Bovine Nasal Epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:7701-7705.

O'Donovan MC, Oefner P J, Roberts S C, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer S S and McGuffin P (1998) Blind Analysis of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography As a Tool for Mutation Detection. *Genomics* **52**:44-49.

Vaughn CP, Lyon E and Samowitz W S (2008) Confirmation of Single Exon Deletions in MLH1 and MSH2 Using Quantitative Polymerase Chain Reaction. *J Mol Diagn* **10**:355-360.

Overduin M, Harvey T S, Bagby S, Tong K I, Yau P, Takeichi M and Ikura M (1995) Solution Structure of the Epithelial Cadherin Domain Responsible for Selective Cell Adhesion. *Science* **267**:386-389.

Peters S, Peters H and Thierfelder L (1999) Risk Stratification of Sudden Cardiac Death and Malignant Ventricular Arrhythmias in Right Ventricular Dysplasia-Cardiomyopathy. *Int J Cardiol* **71**:243-250.

Pieperhoff S, Borrmann C, Grund C, Barth M, Rizzo S and Franke W W (2010) The Area Composita of Adhering Junctions Connecting Heart Muscle Cells of Vertebrates. VII. The Different Types of Lateral Junctions Between the Special Cardiomyocytes of the Conduction System of Ovine and Bovine Hearts. *Eur J Cell Biol* **89**:365-378.

Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli G A and Rampazzo A (2006) Mutations in Desmoglein-2 Gene Are Associated With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation* **113**:1171-1179.

Posch MG, Posch M J, Perrot A, Dietz R and Ozcelik C (2008) Variations in DSG2: V56M, V158G and V920G Are Not Pathogenic for Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**:E1.

Protonotarios N, Anastasakis A, Antoniadis L, Chlouverakis G, Syrris P, Basso C, Asimaki A, Theopistou A, Stefanadis C, Thiene G, McKenna W J and Tsatsopoulou A (2011) Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia on the Basis of the Revised Diagnostic Criteria in Affected Families With Desmosomal Mutations. *Eur Heart J* **32**:1097-1104.

Protonotarios N and Tsatsopoulou A (2004) Naxos Disease and Carvajal Syndrome: Cardiocutaneous Disorders That Highlight the Pathogenesis and Broaden the Spectrum of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* **13**:185-194.

Puranik R, Chow C K, Duflou J A, Kilborn M J and McGuire M A (2005) Sudden Death in the Young. *Heart Rhythm* **2**:1277-1282.

Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin J A and Danieli G A (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.

Rampazzo A (2006) Genetic Bases of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Heart Int* **2**:17.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hedge M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **17(5)**:405-24

Roberts JD, Herkert J C, Rutberg J, Nikkel S M, Wiesfeld A C, Dooijes D, Gow R M, van Tintelen J P and Gollob M H (2013) Detection of Genomic Deletions of PKP2 in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Clin Genet* **83**:452-456.

Ross SE, Hemati N, Longo K A, Bennett C N, Lucas P C, Erickson R L and MacDougald O A (2000) Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* **289**:950-953.

Runswick SK, O'Hare M J, Jones L, Streuli C H and Garrod D R (2001) Desmosomal Adhesion Regulates Epithelial Morphogenesis and Cell Positioning. *Nat Cell Biol* **3**:823-830.

Saito M, Tucker D K, Kohlhorst D, Niessen C M and Kowalczyk A P (2012) Classical and Desmosomal Cadherins at a Glance. *J Cell Sci* **125**:2547-2552.

Schafer S, Stumpp S and Franke W W (1996) Immunological Identification and Characterization of the Desmosomal Cadherin Dsg2 in Coupled and Uncoupled Epithelial Cells and in Human Tissues. *Differentiation* **60**:99-108.

Sen-Chowdhry S, Lowe M D, Sporton S C and McKenna W J (2004) Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Clinical Presentation, Diagnosis, and Management. *Am J Med* **117**:685-695.

Sen-Chowdhry S, Syrris P and McKenna W J (2007a) Role of Genetic Analysis in the Management of Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **50**:1813-1821.

Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E and McKenna W J (2007b) Clinical and Genetic Characterization of Families With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Provides Novel Insights into Patterns of Disease Expression. *Circulation* **115**:1710-1720.

Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E and McKenna W J (2007c) Clinical and Genetic Characterization of Families With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Provides Novel Insights into Patterns of Disease Expression. *Circulation* **115**:1710-1720.

Shapiro L and Weis W I (2009) Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**:a003053.

Syrris P, Ward D, Asimaki A, Evans A, Sen-Chowdhry S, Hughes S E and McKenna W J (2007) Desmoglein-2 Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: a Genotype-Phenotype Characterization of Familial Disease. *Eur Heart J* **28**:581-588.

Syrris P, Ward D, Evans A, Asimaki A, Gandjbakhch E, Sen-Chowdhry S and McKenna W J (2006) Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Associated With Mutations in the Desmosomal Gene Desmocollin-2. *Am J Hum Genet* **79**:978-984.

Tabib A, Loire R, Chalabreysse L, Meyronnet D, Miras A, Malicier D, Thivolet F, Chevalier P and Bouvagnet P (2003) 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**:3000-3005.

Thiene G and Basso C (2006) Pathology and Pathogenesis of Infective Endocarditis in Native Heart Valves. *Cardiovasc Pathol* **15**:256-263.

Thiene G, Basso C, Calabrese F, Angelini A and Valente M (2005) Twenty Years of Progress and Beckoning Frontiers in Cardiovascular Pathology: Cardiomyopathies. *Cardiovasc Pathol* **14**:165-169.

Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L and Pennelli N (1988) Right Ventricular Cardiomyopathy and Sudden Death in Young People. *N Engl J Med* **318**:129-133.

Thiene G, Rigato I, Pilichou K, Corrado D and Basso C (2012) Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. What Is Needed for a Cure? *Herz* **37**:657-662.

Uzumcu A, Norgett E E, Dindar A, Uyguner O, Nisli K, Kayserili H, Sahin S E, Dupont E, Severs N J, Leigh I M, Yuksel-Apak M, Kellsell D P and Wollnik B (2006) Loss of Desmoplakin Isoform I Causes Early Onset Cardiomyopathy and Heart Failure in a Naxos-Like Syndrome. *J Med Genet* **43**:e5.

van der Zwaag PA, Jongbloed J D, van den Berg M P, van der Smagt J J, Jongbloed R, Bikker H, Hofstra R M and van Tintelen J P (2009a) A Genetic Variants Database for Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Hum Mutat* **30**:1278-1283.

van der Zwaag PA, Jongbloed J D, van den Berg M P, van der Smagt J J, Jongbloed R, Bikker H, Hofstra R M and van Tintelen J P (2009b) A Genetic Variants Database for Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Hum Mutat* **30**:1278-1283.

van der Zwaag PA, van Rijsingen I A, Asimaki A, Jongbloed J D, van Veldhuisen D J, Wiesfeld A C, Cox M G, van Lochem L T, de Boer R A, Hofstra R M, Christiaans I, van Spaendonck-Zwarts K Y, Lekanne dit Deprez R H, Judge D P, Calkins H, Suurmeijer A J, Hauer R N, Saffitz J E, Wilde A A, van den Berg M P and van Tintelen J P (2012) 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**:1199-1207.

van der Zwaag PA, Jongbloed J D, van den Berg M P, van der Smagt J J, Jongbloed R, Bikker H, Hofstra R M and van Tintelen J P (2009) A Genetic Variants Database for Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Hum Mutat* **30**:1278-1283.

van Tintelen JP, Entius M M, Bhuiyan Z A, Jongbloed R, Wiesfeld A C, Wilde A A, van der Smagt J, Boven L G, Mannens M M, van Langen I M, Hofstra R M, Otterspoor L C, Doevendans P A, Rodriguez L M, van Gelder I C and Hauer R N (2006) Plakophilin-2 Mutations Are the Major Determinant of Familial Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Circulation* **113**:1650-1658.

Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, Degenstein L and Fuchs E (2001) Desmoplakin Is Essential in Epidermal Sheet Formation. *Nat Cell Biol* **3**:1076-1085.

Vyas V and Lambiase P D (2013) The Investigation of Sudden Arrhythmic Death Syndrome (SADS)-the Current Approach to Family Screening and the Future Role of Genomics and Stem Cell Technology. *Front Physiol* **4**:199.

Wahl JK, III (2005) A Role for Plakophilin-1 in the Initiation of Desmosome Assembly. *J Cell Biochem* **96**:390-403.

Yin T and Green K J (2004) Regulation of Desmosome Assembly and Adhesion. *Semin Cell Dev Biol* **15**:665-677.

Yu CC, Yu C H, Hsueh C H, Yang C T, Juang J M, Hwang J J, Lin J L and Lai L P (2008) Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia: Clinical Characteristics and Identification of Novel Desmosome Gene Mutations. *J Formos Med Assoc* **107**:548-558.

