

## TESIS DOCTORAL



Facultad de Medicina

Universidad de Granada

Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

### **TITULO**

**Desmina y Miocardiopatía Arritmogénica: descripción clínica y funcional de la variante p.Glu401Asp en desmina como causa de miocardiopatía arritmogénica biventricular**

### **AUTOR**

Francisco José Bermúdez Jiménez

### **DIRECTOR**

Dr. Juan Jiménez Jáimez

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Francisco José Bermúdez Jiménez  
ISBN: 978-84-9163-914-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52389>







## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada durante los últimos años de mi formación especializada como cardiólogo en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a todos los profesionales (médicos, enfermeros, auxiliares, etc.) que forman de este hospital y, en especial, el servicio de Cardiología. Todos ellos han contribuido de alguna u otra forma a la consecución de este proyecto.

A todos los pacientes a los que he podido asistir durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Juan Jiménez Jáimez, Director de esta tesis y “padre” de la Unidad de Cardiopatías Familiares del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. A lo largo de estos últimos tres años de mi residencia me ha transmitido lo apasionante y gratificante que es este campo de la cardiología. Su capacidad de liderazgo, y brillantes dotes para la investigación me han guiado desde el compañerismo y el trabajo en equipo hasta la realización de esta tesis doctoral.

También quiero transmitir mi gratitud a los Dres. Campos, Carriel y Alaminos por su inestimable y brillante colaboración. Su compromiso y capacidad de trabajar en equipo resalta su valía científica y humana. A los Dres. Brodehl, Schirmer y Milting por su valiosa contribución y compromiso en este proyecto. A los Dres. Lorenzo Monserrat, García-Giustiniani y demás compañeros de *Health in Code*, por su colaboración invaluable en la realización e interpretación genética.

A mi familia, testigos de mis logros y fracasos, consuelo y fuerza para poder seguir caminando hacia una vocación de servicio y amor al prójimo. Ellos son los máximos responsables de lo que soy hoy.

A mis amigos, que durante esta dura trayectoria han sido siempre la mejor válvula de escape

A Ana, por su apoyo total. Has sido mi descanso y amparo, mi aliento y mi impulso. Has sabido entender lo arduo de este camino y siempre estuviste ahí.



**ABREVIATURAS**

- ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AHA: American Heart Association.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARVD: Displasia arritmogénica de ventrículo derecho.
- ARVD/C: Miocardiopatía / displasia arritmogénica de ventrículo derecho.
- BAV: Bloqueo auriculoventricular.
- BNP: Péptido natriurético atrial.
- cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.
- CMTA: Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo
- CPK: Creatin-quinasa.
- *CRYAB*: Gen *CRYAB*, codifica la proteína  $\alpha\beta$ -cristalina.
- dbSNP: The Single Nucleotide Polymorphism database.
- *DES*: Gen *DES*, codifica la proteína desmina.
- DMEM: Medio artificial basal de Eagle modificado por Dulbecco.
- *DSC2*: Gen *DSC2*, codifica la proteína desmocolina 2.
- *DSG2*: Gen *DSG2*, codifica la proteína desmogleína 2.
- *DSP*: Gen *DSP*, codifica la proteína desmoplaquina.
- ECG / ECGs: Electrocardiograma / s.
- ESC: European Society of Cardiology.
- EVS: Exome Variant Server Database.
- ExAC: The Exome Aggregation Consortium Database.
- FEVI: fracción de eyección sistólica de ventrículo izquierdo.
- FI: Filamento intermedio.

- *FLNC*: Gen *FLNC*, codifica la proteína filamina C.
- FEVD: fracción de eyección sistólica de ventrículo derecho.
- HGMD: Human Gene Mutation Database.
- *JUP*: Gen *JUP*, codifica para la proteína placoglobina.
- *KCNE1*: Gen *KCNE1*, codifica para un canal de potasio.
- *KCNH2*: Gen *KCNH2*, codifica para un canal de potasio.
- *KCNQ1*: Gen *KCNQ1*, codifica para un canal de potasio.
- *LMNA*: Gen *LMNA*, codifica la proteína lamina A/C.
- MCA: Miocardiopatía arritmogénica.
- MSC: muerte súbita cardiaca.
- mg/dL: Miligramos/decilitro.
- mL: Mililitros
- mm: Milímetros.
- NF-H: Neurofilamento pesado.
- NF-L: Neurofilamento ligero.
- NF-M: Neurofilamento mediano.
- NGS: Next-generation-sequencing.
- NYHA: New York Heart Association.
- PBS: tampón fosfato salino.
- *PKP2*: Gen *PKP2*, codifica la proteína placofilina 2.
- *PLN*: Gen *PLN*, codifica la proteína fosfolambán.
- PR: intervalo PR del electrocardiograma de superficie.
- QRS: complejo QRS del electrocardiograma de superficie.
- qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.
- QT: intervalo QT del electrocardiograma de superficie.
- RPG: retención patológica de gadolinio
- RM: resonancia magnética.
- *RyR2*: Gen *RyR2*, codifica el receptor 2 de rianodina.
- *SCN1B*: Gen *SCN1B*, codifica para un canal de sodio.

- *SCN5A*: Gen *SCN5A*, codifica para un canal de sodio.
- SFB: suero fetal bovino.
- *TGFβ3*: Gen *TGFβ3*, codifica el factor de crecimiento transformante β 3
- *TMEM43*: Gen *TMEM43*, codifica la proteína luma.
- *TNNT2*: proteína troponina T 2.
- *TTN*: Gen *TTN*, codifica la proteína titina.
- μL: microlitro.



**INDICE**

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
a.	<u>Miocardopatía arritmogénica.....</u>	15
	i. <i>Historia y definición.....</i>	15
	ii. <i>Clínica y diagnóstico.....</i>	21
	iii. <i>Tratamiento.....</i>	31
b.	<u>Bases genéticas de la miocardopatía arritmogénica.....</u>	40
	i. <i>Conceptos básicos en genética.....</i>	40
	ii. <i>Utilidad práctica del diagnóstico genético... </i>	45
	iii. <i>Disco intercalar y desmosoma: bases moleculares y fisiológicas.....</i>	47
	iv. <i>Genes implicados. Relación genotipo-fenotipo.....</i>	49
	1. Desmosomales.....	51
	2. No desmosomales.....	53
c.	<u>Desmina.....</u>	56
	i. <i>Filamentos intermedios.....</i>	56
	ii. <i>Desmina: estructura y funcionamiento.....</i>	58
	iii. <i>Desminopatías: espectro clínico.....</i>	60
	iv. <i>Desmina y miocardopatía arritmogénica... </i>	63
	v. <i>Variante p. Glu401Asp en DES.....</i>	68
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
a.	<u>Población de estudio.....</u>	74
b.	<u>Evaluación clínica.....</u>	74
c.	<u>Evaluación genética.....</u>	81
d.	<u>Evaluación funcional.....</u>	87
e.	<u>Análisis estadístico.....</u>	97

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>99</b>
a.	<u>Caracterización del caso índice.....</u>	101
b.	<u>Resultado del estudio genético.....</u>	109
c.	<u>Fenotipo de los pacientes portadores de la mutación Glu401Asp en DES. Estudio de cosegregación, supervivencia y eventos desfavorables.....</u>	112
d.	<u>Caracterización tisular mediante resonancia magnética cardiaca: descripción de un patrón de retención patológica de gadolinio específico.....</u>	126
e.	<u>Análisis funcional.....</u>	128
	i. <i>Análisis histológico.....</i>	128
	ii. <i>Estudio de células madre mesenquimales y qRT-PCR.....</i>	131
	iii. <i>Estudio de plásmidos y microscopía confocal.....</i>	133
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>145</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>149</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>165</b>



---

# 1. INTRODUCCIÓN

Miocardiopatía arritmogénica

Bases genéticas de la miocardiopatía arritmogénica

Desmina



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **A. MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA**

#### **I. Historia y definición**

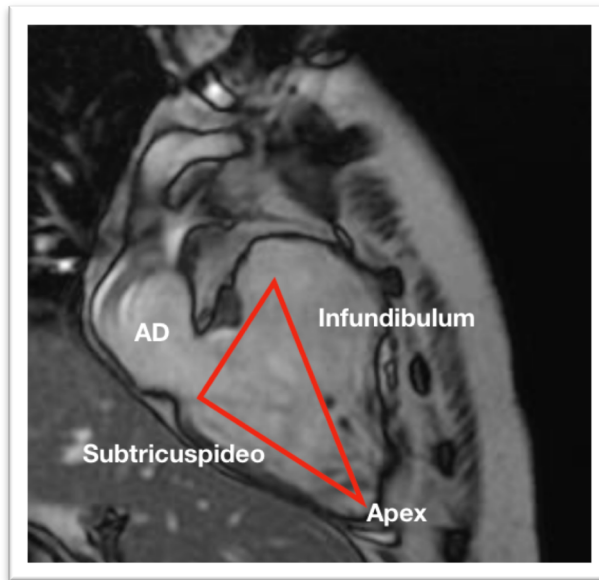
La miocardiopatía arritmogénica (MCA) es una enfermedad “redescubierta”, ya que su conocimiento se remonta a siglos atrás. La primera descripción se le reconoce al patólogo Giovanni Maria Lancisi, quien describió por primera vez su carácter hereditario en su libro *“De Motu Cordis et Aneurysmatibus”* [1]. En él describió la historia de una familia de cuatro generaciones, caracterizadas por palpitaciones y muerte súbita cardiaca (MSC). Los hallazgos más característicos en las autopsias fueron la presencia de aneurismas y la dilatación del ventrículo derecho.

René Laennec, el inventor del estetoscopio, en el libro *“De láusculattion mediate ou traite´du diagnostic des maladies des poumons et du Coeur”* de 1819, llamó la atención sobre la relación entre el tejido graso en el ventrículo derecho y la MSC [2], y describió las paredes ventriculares como extremadamente delgadas. En el siglo XX, concretamente en 1952, el doctor Uhl describió el caso fatal de una lactante que murió a consecuencia de un fallo cardiaco grave describiéndose en la autopsia casi ausencia total de miocardio en el ventrículo derecho. El epónimo de anomalía de Uhl se ha empleado en pacientes con paredes de ventrículo derecho muy delgadas, con apariencia papirácea. Hoy conocemos que este aspecto es la etapa final de una MCA [3].

El comienzo de la historia reciente de la enfermedad podemos ubicarla en la Universidad de Padua hacia la década de los 60, donde el profesor Dalla Volta publicó una serie de casos

caracterizados hemodinámicamente por una “auricularización de las presiones del ventrículo derecho” destacando la ausencia de una contracción sistólica efectiva del ventrículo derecho [4].

A principios de los años 80, Frank Marcus y Guy Fontaine describieron detalladamente una serie de 24 pacientes adultos con esta enfermedad, a la que llamaron “displasia arritmogénica de ventrículo derecho” (ARVD) [5]. Una de las características clínicas de estos pacientes era que presentaban arritmias ventriculares con morfología de bloqueo de rama izquierda del haz de His, sugiriendo el origen en el ventrículo derecho de las mismas. Los análisis a nivel microscópico del tejido miocárdico de estos pacientes mostrarían la sustitución fibroadiposa del miocardio funcional. Esto se interpretó como un defecto en el desarrollo, motivo por el que acuñaron el término displasia. Esta descripción solo incluyó a pacientes adultos con arritmias y no apuntó un posible origen hereditario de la enfermedad. En este trabajo también describen el perfil de paciente típico: varón joven con síntomas consistentes en palpitaciones, taquicardia o síncope, que puede presentar taquicardias con morfología de bloqueo de rama izquierda. El electrocardiograma (ECG) muestra inversión de la onda T en precordiales derechas (V1-V4) y el ventrículo derecho se encuentra dilatado. También describen con técnicas de imagen el “triángulo de la displasia”, que abarca el subepicardio del ápex, el infundíbulo y la zona subtricuspidéa del ventrículo derecho [Figura 1.1].



**Figura 1.1. Triángulo de la displasia.** Visión de las cámaras derechas de un paciente con miocardiopatía arritmogénica. Áreas más frecuentemente afectadas en miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho. Nótese el gran aneurisma infundibular. AD: aurícula derecha.

La malignidad arrítmica de la enfermedad fue abordada por Gaetano Thiene a finales de los años 80 [6]. Tras recopilar la información relativa a casos de MSC en menores de 35 años en la región del *Véneto* italiano, demostraron que la ARVD es una de las principales causas de MSC en jóvenes atletas. Estos sujetos presentaban inversión de la onda T en las derivaciones precordiales derechas y extrasistolia ventricular frecuente.

Poco tiempo después, fue publicado un trabajo que describió un síndrome cardiocutáneo con un patrón de herencia autosómico recesivo que combinaba el fenotipo de ARVD, pelo lanoso y queratosis palmoplantar en sujetos de la isla de Naxos, Grecia [7]. De esta forma se apuntó hacia el desmosoma como responsable de la enfermedad, ya que es una estructura compartida por la piel y el

miocardio. Más tarde se demostraría que modelos animales que ratones *knock-out* para placoglobina (gen *JUP*) desarrollan enfermedad miocárdica grave con casi desaparición completa de los desmosomas y ruptura cardíaca espontánea en la etapa fetal [8]. Esto condujo al reconocimiento de un defecto en la proteína placoglobina como responsable de la enfermedad de Naxos [9].

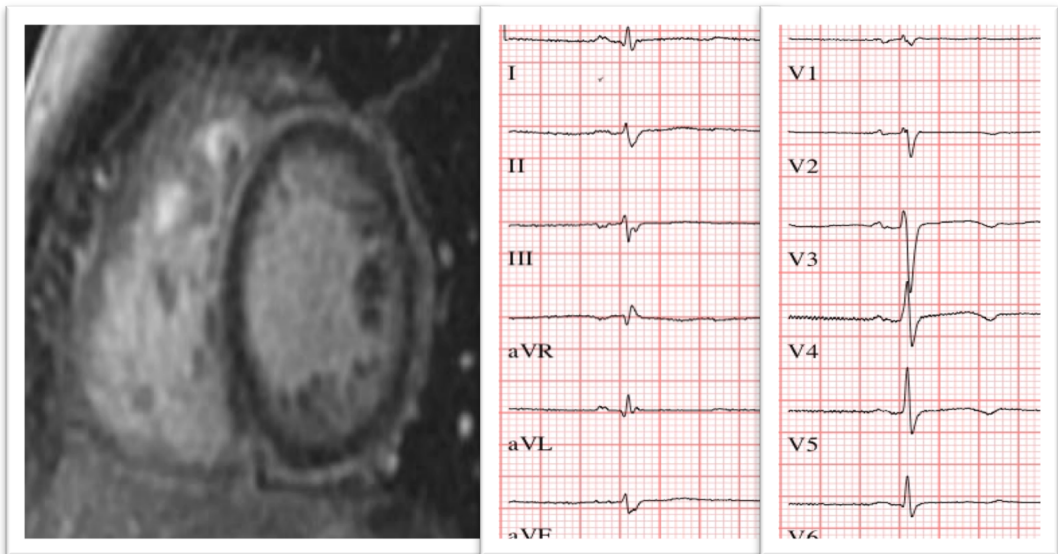
Muy cercano en el tiempo, el dermatólogo ecuatoriano, Luis Carvajal describió otro síndrome cardiocutáneo recesivo semejante a la enfermedad de Naxos. En el síndrome de Carvajal era evidente una afectación biventricular y la muerte era principalmente debida a insuficiencia cardíaca [10]. Un defecto en la desmoplaquina (gen *DSP*) se identificó como responsable del trastorno [11]. Esto estimularía la investigación de alteraciones de *DSP* como candidato de la forma autosómica dominante de la enfermedad, aspecto que confirmaría el grupo italiano de Padua [12] y más tarde relacionarían con formas de la enfermedad con afectación predominante o exclusiva del ventrículo izquierdo [13].

Con posterioridad, otros genes del complejo desmosomal serían relacionados con el desarrollo de ARVD: placofilina-2 (*PKP2*), desmogleína-2 (*DSG2*) y desmocolina-2 (*DSC2*) [14-16]. Todo esto se traduce en alteraciones ultraestructurales en el desmosoma que conducen a la disrupción de los discos intercalares, siendo la vía final común de un proceso genéticamente determinado que resulta en la muerte de miocitos y su sustitución cicatricial por tejido fibroadiposo [17]. Además, recientemente, genes no desmosomales como el *TGF- $\beta$ 3*, *TMEM43*, *PLN*, *LMNA (A/C)* o *DES* han sido relacionados con el desarrollo de ARVD [18-22] [Tabla 1.1]. Como peculiaridad, estos genes con frecuencia se han asociado con

afectación biventricular y con signos orientativos en el ECG (inversión de onda T en cara inferolateral ó bajos voltajes en derivaciones frontales) [23] [Figura 1.2].

**TABLA 1.1. GENES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE MIOCARDIOPATIA ARRITMOGÉNICA**

Gen	Locus	Proteína	Localización	Prevalencia	Referencia
<i>JUP</i>	17q21	Placoglobina	Desmosoma	Rara	9
<i>DSP</i>	6p24	Demoplaquina	Desmosoma	6-16%	12,13
<i>PKP2</i>	12p11	Placofilina-2	Desmosoma	7-70%	14
<i>DSG2</i>	18q12	Desmogleína-2	Desmosoma	5-25%	15
<i>DSC2</i>	18q12	Desmocolina-2	Desmosoma	Rara	16
<i>FLNC</i>	7q32.1	Filamina C	Citoplasma	Rara	73
<i>PLN</i>	6q22.1	Fosfolamban	R. Sarcoplásmico	Rara	20
<i>LMNA</i>	1q21.2-q21.3	Lamina A/C	Envoltura nuclear	Rara	21
<i>TGFβ3</i>	14q23-124	Factor de crecimiento transformador β3	Secretada	Rara	18
<i>TMEM43</i>	3p25	LUMA	Disco intercalar	Rara	19
<i>DES</i>	2q35	Desmina	Filamento intermedio	Rara	22
<i>SCN5A</i>	3p22.2	Subunidad alfa del canal de sodio	Membrana celular	Rara	74
<i>TTN</i>	2q31	Titina	Sarcómero	Rara	70
<i>RYR2</i>	1q42-143	Receptor 2 de rianodina	R. Sarcoplásmico	Rara	75



**Figura 1.2. Miocardiopatía arritmogénica biventricular con predominio de ventrículo izquierdo.** Izquierda: imagen de resonancia magnética cardiaca que muestra miocardiopatía arritmogénica de predominio izquierdo con gran fibrosis subepicárdica en ventrículo izquierdo. Derecha: electrocardiograma de 12 derivaciones del mismo paciente con bajos voltajes en derivaciones frontales, así como inversión de la onda T generalizada.

Aunque inicialmente se acuñó el término displasia, con el progresivo conocimiento de la enfermedad se ha generado cierta controversia en relación con la denominación de displasia frente cardiomiopatía. En este sentido, el amplio espectro descrito en esta patología ha conducido al mayor reconocimiento en la práctica clínica diaria y en la literatura científica de la definición de miocardiopatía / displasia arritmogénica de ventrículo derecho (ARVD/C) o MCA. La patología de esta enfermedad no se limita a una zona displásica en el ventrículo derecho, incluyendo el concepto de miocardiopatía todas las alteraciones funcionales potencialmente arritmogénicas (aun sin anomalías estructurales evidentes) en el miocardio.

Durante la primera década del presente siglo ha ido



asentándose la idea de que la extensión de la enfermedad va más allá del ventrículo derecho, reconociéndose la forma de afectación predominante del ventrículo izquierdo como 1 de los 3 patrones de expresión de la enfermedad. En contraste con la forma clásica y la forma biventricular (con afectación paralela de ambos ventrículos), la forma con predominio izquierdo es caracterizada por una afectación temprana y predominante del ventrículo izquierdo [24].

## **II. Clínica y diagnóstico.**

La MCA suele manifestarse en la adolescencia o en adultos jóvenes, siendo inusual en la infancia y prepúberes. Los síntomas son muy variados y pueden diferir incluso dentro de la misma familia dada su penetrancia incompleta y su gran variabilidad en la expresión. Los síntomas clásicos son las palpitaciones, dolor torácico, disnea, síncope y MSC. Marcus y colaboradores pusieron de manifiesto en un estudio prospectivo con 108 pacientes con reciente diagnóstico de MCA, que los síntomas arrítmicos son los más frecuentes (palpitaciones 56%, mareos 27%, y síncope 21%) [25]. Añadido a la inespecificidad de los síntomas, con frecuencia la presentación de la enfermedad es silente, tomando especial relevancia la evaluación familiar para identificar a pacientes en riesgo. Aunque las alteraciones histológicas pueden encontrarse en el ventrículo izquierdo, no suele haber alteraciones del sistema específico de conducción, lo que tendrá que alertar al médico sobre un diagnóstico alternativo, ya que es un dato no esperado en la forma clásica desmosomal de la enfermedad.

La incidencia de arritmias ventriculares parece guardar relación con la extensión de la afectación miocárdica [26]. La muerte súbita cardiaca puede ser la primera manifestación de la

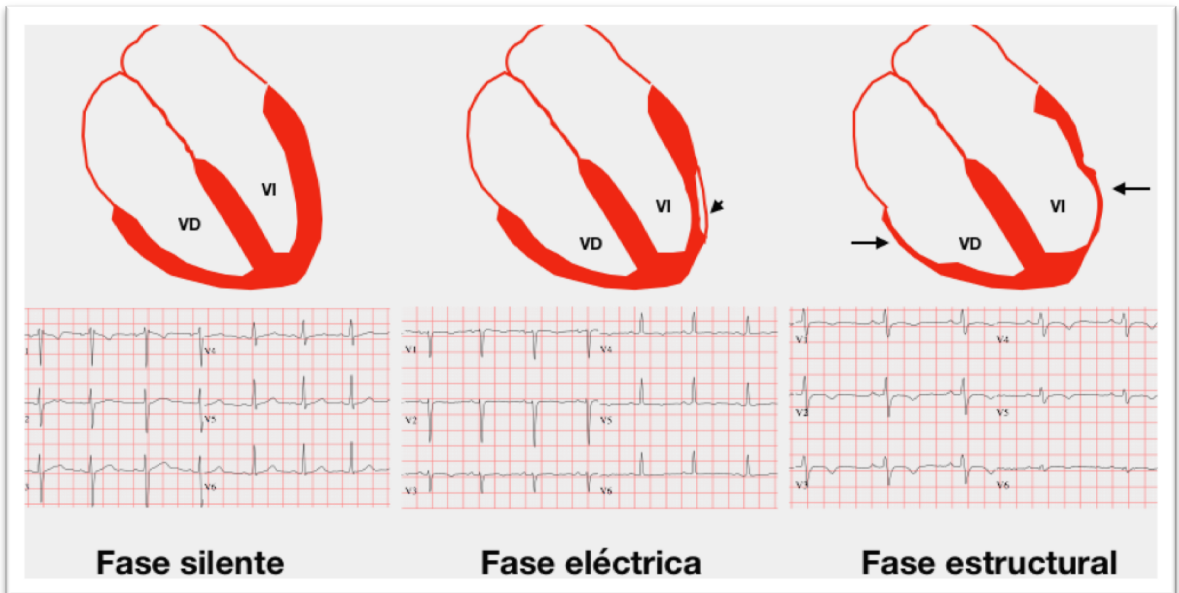
enfermedad, especialmente en jóvenes atletas. Corrado y colaboradores identificaron a esta enfermedad como la principal responsable de muerte súbita entre los atletas jóvenes (<35 años) italianos en un trabajo prospectivo de 17 años con 209 muertes súbitas cardíacas. Sin embargo, esta conclusión no se ha podido extrapolar a otros países, si bien continuaría siendo una de las primeras causas [27-28]. En el trastorno cardiocutáneo de Naxos la incidencia de arritmias ventriculares fue del 92% en los portadores homocigotos [29].

Se han propuesto tres fases distintas de la enfermedad [30] [Figura 1.3]:

1. Fase subclínica o silente: el paciente se encuentra asintomático y no hay alteraciones en las distintas pruebas diagnósticas. El estudio genético puede ayudar a identificar a estos sujetos.

2. Fase eléctrica: los cambios eléctricos en el ECG (inversión de onda T V1-V2, cambios en la despolarización) o en la monitorización con Holter (extrasistolia ventricular) generalmente son los primeros signos de la enfermedad, donde los pacientes permanecen asintomáticos, pero pueden sufrir un evento arrítmico grave o muerte súbita. Puede haber cambios estructurales muy sutiles difíciles de identificar.

3. Fase estructural: fase final de la enfermedad, donde las alteraciones estructurales (dilatación y disfunción sistólica ventricular) son evidentes y las alteraciones eléctricas se agravan.



**Figura 1.3. Esquema de las distintas fases propuestas para la miocardiopatía arritmogénica.** Una fase inicial o silente sin manifestaciones fenotípicas; una fase eléctrica donde hay cambios electrocardiográficos o en Holter, pero no estructurales o son muy sutiles; y fase estructural donde los cambios electrocardiográficos y estructurales son patentes.

Conforme la enfermedad progresa hay un aumento progresivo y heterogéneo de la infiltración fibroadiposa del miocardio, lo que conduce se ha considerado el sustrato para la generación de arritmias por reentrada [31].

En la forma de predominio de la afectación de ventrículo izquierdo los síntomas son semejantes a la forma clásica de la enfermedad, sin embargo, el síncope parece menos frecuente. Se ha sugerido que algunas alteraciones eléctricas diferentes (inversión de la onda T en V5, V6, I y aVL, ó taquicardia ventricular con morfología de bloqueo de rama derecha), así como alteraciones estructurales (aneurismas en ventrículo izquierdo, así como dilatación ligera o disfunción sistólica leve, retención patológica de gadolinio (RPG) sub o mesoepicárdica) [32].

En general, la MCA debe sospecharse en presencia de sujetos jóvenes o de mediana edad supervivientes a una muerte súbita abortada, pacientes con arritmias ventriculares y sin enfermedad coronaria u otra cardiopatía estructural, y en aquellos con anomalías en ventrículo derecho halladas de forma incidental en el ecocardiograma o resonancia magnética (RM).

En sus descripciones iniciales a principios y mediados de los 80 la enfermedad se reconoció como ARVD [5], y taquicardia ventricular con morfología de bloqueo de rama izquierda [33]. Además, pronto sería descrita en Europa, América y Asia. Hacia principios de los años 90 se realizó un documento para agrupar una serie de criterios diagnósticos que facilitara la identificación de estos pacientes [34]. Hasta el momento, el diagnóstico estaba exclusivamente basado en la histología, siendo por tanto muy complejo por el gran número de limitaciones (carácter segmentario de la enfermedad, falsos negativos, riesgos propios de la biopsia endomiocárdica, ...etc.). En estos primeros criterios diagnósticos, elaborados por un grupo internacional de expertos, se recoge el término ARVD/C y se proponen una serie de criterios diagnósticos mayores y menores para alcanzar el diagnóstico de la enfermedad (2 mayores ó 1 menor más 2 mayores ó 4 menores). Estos criterios se basaban en anomalías estructurales, histológicas, electrocardiográficas, arrítmicas y familiares características de la enfermedad.

Estos primeros criterios diagnósticos reflejaban la reciente y escasa experiencia clínica hasta la fecha, estando basados en casos índices con una expresión de la enfermedad avanzada, o supervivientes de muertes súbitas abortadas. De esta manera,

estos primeros criterios diagnósticos gozaban de una gran especificidad, sin embargo, no conseguían identificar aquellos casos o familiares con expresión ligera o incipiente de la enfermedad.

En 2010, tras 15 años, se propusieron nuevos criterios diagnósticos apoyados en nuevos marcadores electrocardiográficos, la identificación de determinantes genéticos de la enfermedad, la mejora en la pericia y tecnología en imagen cardiovascular (RM) y avances en electrofisiología (mapeo electroanatómico) [Tabla 1.2] [35]. Ningún aspecto de la enfermedad es diagnóstico de forma aislada, requiriendo varios de estos criterios para alcanzar el diagnóstico. En estos nuevos criterios se reestructura la terminología de la siguiente manera:

- Diagnóstico definitivo: dos criterios mayores o un criterio mayor y dos menores, o cuatro criterios menores de categorías diagnósticas diferentes.
- Diagnóstico limítrofe: un criterio mayor y un criterio menor, o tres criterios menores de categorías diagnósticas diferentes.
- Diagnóstico posible: un criterio mayor o dos criterios menores de categorías diagnósticas diferentes.

Un aspecto importante a la hora de considerar los criterios diagnósticos modificados es que tienen un carácter dinámico, estando en una constante evolución, y por tanto deben ser reevaluados en cada visita médica.

**TABLA 1.2. CRITERIOS DE 2010 DE LA TASK FORCE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA VENTRICULAR DERECHA**

<b>Criterio Mayor</b>	<b>Criterio Menor</b>
<b>1. Disfunción global o segmentaria y alteraciones estructurales</b>	
<p><i>Por ecocardiografía bidimensional</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acinesia, discinesia o aneurismas en segmentos de VD.</li> <li>- Y uno de los siguientes en telediástole: PELP TSVD <math>\geq 32</math> mm (corregido por tamaño corporal [PELP/ASC] <math>\geq 19</math> mm/m<sup>2</sup>) PECP TSVD <math>\geq 36</math> mm (corregido por tamaño corporal [PECP/ASC] <math>\geq 21</math> mm/m<sup>2</sup>) o cambio del área fraccional <math>\geq 33\%</math></li> </ul> <p><i>Por Resonancia Magnética</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acinesia, discinesia o contracción disincrónica de VD</li> <li>- Y uno de los siguientes VTDVD corregido por superficie corporal <math>\geq 110</math> mL/m<sup>2</sup> (hombres o <math>\geq 100</math> mL/m<sup>2</sup> (mujeres) FE de VD <math>\leq 40\%</math></li> </ul> <p><i>Por angiografía</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acinesia, discinesia o aneurismas en segmentos de VD</li> </ul>	<p><i>Por ecocardiografía bidimensional</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acinesia, discinesia en segmentos de VD</li> <li>- Y uno de los siguientes en telediástole: PELP TSVD <math>\geq 29</math> a <math>&lt; 32</math> mm (corregido por tamaño corporal [PELP/ASC] <math>\geq 16</math> a <math>&lt; 19</math> mm/m<sup>2</sup>) PECP TSVD <math>\geq 32</math> a <math>&lt; 36</math> mm (corregido por tamaño corporal [PECP/ASC] <math>\geq 18</math> a <math>&lt; 21</math> mm/m<sup>2</sup>) O cambio del área fraccional <math>&gt; 33</math> a <math>\leq 40\%</math></li> </ul> <p><i>Por Resonancia Magnética</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acinesia, discinesia o contracción disincrónica de VD</li> <li>- Y uno de los siguientes: VTDVD corregido por superficie corporal <math>\geq 100</math> a <math>&lt; 110</math> mL/m<sup>2</sup> (hombres o <math>\geq 90</math> a <math>&lt; 100</math> mL/m<sup>2</sup> (mujeres) FE de VD <math>&gt; 40\%</math> a <math>\leq 45\%</math></li> </ul>
<b>2. Caracterización tisular de las paredes</b>	
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	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
<b>3. Alteraciones de la repolarización</b>	
Ondas T negativas en derivaciones precordiales derechas (V1-V3), en pacientes mayores de 14 años, en ausencia de bloqueo de rama derecha	Ondas T negativas en derivaciones V1 y V2, en pacientes mayores de 14 años, en ausencia de bloqueo de rama derecho o en V4-V6.  Ondas T negativas en derivaciones V1-V4, en pacientes mayores de 14 años, en ausencia de bloqueo de rama derecha.
<b>4. Alteraciones de la despolarización</b>	
Ondas epsilon en las derivaciones precordiales de V1 a V3	Potenciales tardíos mediante SAECG en al menos uno de tres parámetros, en ausencia de una duración del QRS $\geq 110$ ms en el ECG estándar: duración del QRS filtrado $\geq 114$ ms; duración del QRS terminal $< 40$ $\mu$ V (duración de señal de baja amplitud) $\geq 38$ ms; raíz de la media cuadrados de los voltajes de los 40 ms terminales $\leq 20$ $\mu$ V Duración de la activación terminal del QRS $\geq 55$ ms medida desde el mínimo de la onda S hasta el final del QRS, incluyendo R', en V1, V2 o V3, en ausencia de BRDH completo
<b>5. Arritmias</b>	
TV sostenida o no sostenida con imagen de bloqueo de rama izquierda con eje superior	TV sostenida o no sostenida con morfología de TSVD  Extrasistolia ventricular frecuente ( $> 500/24$ h en registro Holter)

6. Historia familiar	
Caso familiar de primer grado confirmado por criterios diagnósticos	Caso familiar de primer grado no confirmado por criterios diagnósticos
Caso familiar de primer grado confirmado por autopsia o cirugía	Historia familiar de muerte súbita prematura (<35 años) y sospecha de ARVD/C
Identificación de una mutación asociada a ARVD/C en un paciente en estudio	Caso familiar de segundo grado confirmado por autopsia o criterios diagnósticos

ASC: área de superficie corporal; aVF: aumento de voltaje en derivación unipolar del pie izquierdo; aVL: aumento de voltaje en derivación unipolar de brazo izquierdo; BRDH: bloqueo de rama derecha del haz; BRIH: bloqueo de rama izquierda del haz; ECG: electrocardiograma; ARVD/C: miocardiopatía/displasia arritmogénica ventricular derecha; PECP: proyección de eje corto paraesternal; PELP: proyección de eje largo paraesternal; RM: resonancia magnética; SAEKG: electrocardiograma de promediación de señal; TSVD: tracto de salida del ventrículo derecho; VD: ventrículo derecho.

La ARVD/C se recoge como una sola entidad en el documento de consenso que la American Heart Association (AHA) publicó en el año 2006 con una nueva clasificación de las miocardiopatías [36]. Del mismo modo ocurriría con la clasificación propuesta por el Grupo de Trabajo de Enfermedades Pericárdicas y Miocárdicas de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) en 2008, las cuales incluyen consideraciones genotipo-fenotipo [37].

Argumentando que las clasificaciones de la AHA y ESC presentaban limitaciones para aplicarse a un campo en constante progreso, Arbustini y colaboradores propusieron una nueva clasificación de las miocardiopatías basada en el conocimiento actual de la correlación fenotipo-genotipo que denominan MOGE(S), guardando un paralelismo con la clasificación TNM empleada en oncología [38]. Esta clasificación pretende incorporar información del fenotipo presente además de información pronóstica. La letra “M” se corresponde al fenotipo morfofuncional (MH: hipertrófica; MD: dilatada; MA: arritmogénica; MR: restrictiva; MNC: no compactada; mixtos: MR+H). La letra “O” ha creferencia a la afectación extracardiaca (OH: corazón; OM: músculo esquelético;

OK: riñón). La letra “G” se corresponde con el patrón de herencia (GAD: autosómica dominante; GAR: autosómica recesiva; GXL: ligado al X; GS: para casos esporádicos; GU: desconocida; GM: mitocondrial; GO: familia no estudiada). A continuación, la letra “E” hace referencia a la etiología (EG: genética; EO: no genética; EDN: de novo; EM: miocarditis). La última letra, la “S”, describe la presencia de insuficiencia cardiaca según la AHA (A a D) y la NYHA (I a IV).

A pesar de que esta reciente clasificación propuesta para universalizar y unificar la nomenclatura alrededor de las miocardiopatías, y en un futuro se espera que sea aplicable a las canalopatías, se trata de una clasificación compleja para su implementación y no es habitual su uso en la práctica clínica diaria. Para extender y facilitar su uso, existe una herramienta online en la web <http://moges.biomeris.com/>.

- Patología.

La característica principal para el diagnóstico de MCA es la evidencia histológica de la sustitución transmural de tejido miocárdico por tejido fibroadiposo [39]. Se trata de un fenómeno progresivo que se dirige desde epicardio hacia endocardio. La atrofia del miocardio finaliza en el desarrollo de aneurismas ventriculares, localizados en el ápex, infundibulum y pared posteroinferior (triángulo de la displasia). Esta última (subtricuspidéa) es considerada un hallazgo casi patognomónico de la enfermedad.

Al examen macroscópico, el ventrículo derecho tiene una apariencia amarillenta o blanquecina por la sustitución fibroadiposa.



En general, tiene un peso próximo a la normalidad ó límite superior, con una dilatación evidente, especialmente en aquellos obtenidos a raíz de una muerte súbita. En pacientes sometidos a trasplante cardiaco el corazón suele mostrar dilatación biventricular, con un peso claramente superior a la normalidad. En ocasiones, en el contexto de insuficiencia cardíaca avanzada, puede identificarse material trombótico en el ventrículo o en las orejuelas, asemejando engrosamiento de la pared ventricular en aquellos casos en los que se encuentra organizado.

En general, el proceso patológico es difuso ó segmentario con zonas aisladas afectadas. Esto último no es infrecuente en aquellos casos con afectación ventricular izquierda, la cual se puede detectar en cerca del 70% de los casos [40]. La afectación del septo interventricular es poco frecuente, debiéndose a que la enfermedad está presente preferencialmente en el epicardio más que en el endocardio.

La proporción de tejido fibroso y adiposo es variable. En los casos en que la grasa es predominante puede haber una pseudohipertrofia ventricular, aunque siempre se identifica tejido fibroso en el subendocardio. La infiltración grasa del ventrículo derecho en sí misma de forma aislada no debe considerarse diagnóstico de MCA. El tejido adiposo es un hallazgo normal en el ventrículo derecho, especialmente en la capa más superficial de la pared libre. Este tejido graso es más frecuente en mujeres añosas y sujetos obesos, siendo común encontrarlo en personas que mueren por otros motivos distintos a los cardiacos. En estos casos el tejido miocárdico aparenta ser desplazados por el tejido graso en lugar de ser sustituido [41]. Por otro lado, la fibrosis generalmente

se asocia a un adelgazamiento de la pared libre ventricular y es predominante en los casos de afectación exclusiva izquierda.

Microscópicamente se aprecian fenómenos degenerativos y muerte de miocardiocitos, asociados a datos de adipogénesis. Esta información es consistente con daño celular y la activación de mecanismos de reparación. Se pueden identificar con frecuencia infiltrados inflamatorios, dando pie a hipótesis acerca del papel de la inflamación o de un componente viral en la etiopatogénesis de la enfermedad, sin resultados definitivos. Sin embargo, sí parece que una reacción inflamatoria, primaria o secundaria, puede actuar como desencadenante de inestabilidad arrítmica súbita o muerte arrítmica.

El fenómeno básico es la muerte celular progresiva de los miocardiocitos que puede ser irregular a través de una descomposición mecánica de los mismos como resultado del estiramiento físico de la pared ventricular durante el esfuerzo o debido a la apoptosis. Una manifestación como infarto o miocarditis, con escara o afectación a nivel epicárdico se ha descrito especialmente en casos de afectación aislada de ventrículo izquierdo [42;43].

Como ya se ha descrito previamente en el diagnóstico de la enfermedad, en el paciente vivo el análisis histológico de una biopsia endomiocárdica de ventrículo derecho puede darnos el diagnóstico de la enfermedad. La biopsia de esta localización es viable y razonable ya que, en general, la afectación suele ser transmural. Por otro lado, la obtención de una muestra de ventrículo izquierdo por abordaje retroaórtico no se aconseja ya que la afectación suele ser subepicárdica y no es rentable. Para el

diagnóstico es importante evaluar la cantidad de 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 [44]. Este número (60%) ha sido testado en *in vitro* y tiene una elevada precisión diagnóstica, siendo incluido en los criterios diagnósticos modificados de 2010. Aunque la obtención de una muestra endomiocárdica es compleja, puede resultar clave en el diagnóstico diferencial de cuadros clínicos semejantes como la miocarditis, la sarcoidosis o la taquicardia ventricular idiopática de tracto de salida.

Sabiendo que la enfermedad principalmente está determinada genéticamente por alteraciones en genes que codifican proteínas desmosomales, la evaluación de estas proteínas en el tejido tiene implicaciones. En un principio se postuló que una disminución de la presencia de placoglobina podría tratarse de un signo específico de la enfermedad, sin embargo, esos hallazgos no eran específicos ya que defectos en la señal de placoglobina ocurre en otras miocardiopatías no desmosomales [45].

### **III. Tratamiento**

Durante décadas ha habido muchos trabajos que han aportado conocimiento en la descripción de la patogénesis de la enfermedad, sus aspectos genéticos y sus manifestaciones clínicas. Sin embargo, su diagnóstico y manejo clínico sigue siendo un reto para el médico fundamentalmente debido a su heterogeneidad clínica, genética y a la escasez de evidencia científica robusta en cuanto al tratamiento de estos pacientes. Esta falta de solidez se explica fundamentalmente por la baja prevalencia de la enfermedad y la ausencia de estudios randomizados.

La historia de la enfermedad está predominantemente relacionada con los eventos arrítmicos fatales, especialmente en sujetos jóvenes. Como en otras enfermedades, el pronóstico adverso de la entidad fue sobreestimado inicialmente debido a la información obtenida de centros terciarios altamente especializados donde se acumulaban los pacientes con mayor riesgo o enfermedad más avanzada. Trabajos recientes sugieren una mortalidad anual menor al 1% [46].

Recientemente ha sido publicado un documento de consenso internacional en el abordaje de la terapéutica de esta enfermedad [47] y otro en la valoración del riesgo arrítmico [48]. En estos trabajos se han recogido una serie de trabajos publicados durante los últimos 25 años que buscan explicar la historia natural de la enfermedad e identificar una serie de factores de riesgo relacionados con el desarrollo de eventos arrítmicos mayores identificados en distintos estudios publicados en la literatura [Tabla 1.3 y Tabla 1.4 ].

**TABLA 1.3. VARIABLES CLÍNICAS RELACIONADAS CON AUMENTO DEL RIESGO DE EVENTOS ARRÍTMICOS (Ref. 47).**

Factor de riesgo	Definición
<i>Parada cardíaca</i>	Muerte súbita abortada debida a fibrilación ventricular
<i>Taquicardia ventricular sostenida hemodinámicamente inestable</i>	Taquicardia ventricular sostenida (>30 segundos) que causa síncope o colapso hemodinámico
<i>Taquicardia ventricular sostenida o fibrilación ventricular</i>	Taquicardia ventricular de >30 segundos o fibrilación ventricular
<i>Síncope</i>	Episodios sincopales no relacionados con causas extracardiacas y en ausencia de arritmias ventriculares documentadas y/o circunstancias claramente neuromediadas
<i>Taquicardia ventricular no sostenida</i>	≥3 latidos ventriculares consecutivos a >100 lpm, con <30 segundos de duración
<i>Disfunción ventricular izquierda</i>	Función sistólica ventricular izquierda disminuida por angiografía o ecocardiografía
<i>Disfunción ventricular derecha</i>	Función sistólica ventricular derecha disminuida por angiografía o ecocardiografía
<i>Dilatación de ventrículo derecho</i>	Área telediastólica de ventrículo derecho
<i>Dilatación de aurícula derecha</i>	Eje corto, aurícula derecha
<i>Disfunción biventricular</i>	Función ventricular izquierda y derecha <50%
<i>Insuficiencia cardíaca</i>	Signos clínicos de insuficiencia cardíaca
<i>Edad (joven)</i>	
<i>Sexo masculino</i>	
<i>Genotipo complejo</i>	Heterocigosis compuesta o digénica
<i>Sujeto probando</i>	Primer sujeto de la familia afecto
<i>Taquicardia ventricular o Fibrilación ventricular inducible</i>	
<i>Extensión de escara electroanatómica en ventrículo derecho</i>	Áreas de bajo voltaje (<0.5mV)
<i>Electrogramas fragmentados en el mapeo de voltaje endomiocárdico</i>	Deflexiones múltiples (>3) de amplitud <1.5 mV y duración >100 ms
<i>Inversión de onda T en derivaciones inferiores</i>	Ondas T negativas en derivaciones II, III, y aVF
<i>Extensión de onda T</i>	Inversión de la onda T en ≥3 derivaciones precordiales
<i>Fragmentación del QRS</i>	Deflexiones adicionales en el QRS en 1 derivación precordial derecha o >1 del resto de derivaciones
<i>Ratio de la amplitud del QRS en derivaciones precordiales</i>	Suma del voltaje del QRS de V1-V3 / suma del voltaje del QRS de V1-V6<0.48

**TABLA 1.4 RESULTADOS DE PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA EN LOS MAYORES ESTUDIOS RELATIVOS A SU HISTORIA NATURAL. (Ref. 48-54)**

Autor	Hulot	Pinamonti	Brun	Kimura	Groeneweg	Mazzanti
Nº pacientes	130	96	88	110	416	301
Seguimiento, años	8.1±7.8	10.6±7.7	9.1±7.7	10	7	5.8
Mortalidad, %	18.4	13.5	14	16	6	11.6
MSC, %	5.4		5.6	6.3	2.9	8.9
Arritmias ventriculares, %				64	72	
Predictores de mortalidad/arritmias ventriculares	FEVD gravemente reducida  FEVI gravemente reducida  TV	Disfunción sistólica ventricular izquierda o derecha  Síntomas de insuficiencia cardíaca  Onda epsilon  Diuréticos  Amiodarona	TV  TVNS  FEVI gravemente reducida	El género varón fue un predictor para TV y FV	Familiares portadores de mutaciones patogénicas	Sexo varón  Joven  Síncope  TV  FA  Probando  Ejercicio físico intenso

MSC: muerte súbita cardíaca; FEVD: fracción de eyección de ventrículo derecho; FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo; TV: taquicardia ventricular; TVNS: taquicardia ventricular no sostenida; FV: fibrilación ventricular; FA: fibrilación auricular.

Los pacientes con diagnóstico definitivo o probable de MCA deben estar bajo un seguimiento clínico periódico. Debe evaluarse la aparición o empeoramiento de síntomas, la progresión de alteraciones estructurales o funcionales y la aparición de arritmias ventriculares de cara a considerar el riesgo arrítmico y optimizar el tratamiento. La evaluación recomendada en estos pacientes consiste en la realización de un ECG de 12 derivaciones, un ecocardiograma, un registro electrocardiográfico ambulatorio o Holter, y una ergometría (en búsqueda de arritmias ventriculares inducidas por el ejercicio), y esto debe repetirse cada 1 o 2 años en función de la edad, síntomas y gravedad del fenotipo.

- Hábitos de vida

El deporte competitivo se ha asociado con un aumento del riesgo de muerte súbita [55], y puede favorecer el desarrollo o progresión del fenotipo de la enfermedad. Se recomienda que los pacientes con un diagnóstico definitivo de MCA no deben participar en competiciones deportivas, pudiendo realizar actividad física recreacional de baja intensidad. La restricción de familiares con fenotipo negativo del ejercicio competitivo puede ser considerada.

- Terapia farmacológica

La terapia farmacológica se apoya fundamentalmente en fármacos antiarrítmicos y la terapia convencional de la insuficiencia cardíaca crónica.

Los fármacos antiarrítmicos tienen como finalidad la mejoría de la calidad de vida de los pacientes previniendo la aparición de arritmias ventriculares, ya que no hay ensayos clínicos randomizados en esta población. No existe evidencia de la utilidad del tratamiento médico para reducir el riesgo de MSC. Generalmente, la indicación de terapia antiarrítmica y la elección del fármaco se basa en un abordaje empírico o extrapolación de otras enfermedades, la experiencia personal o decisiones individuales. Los betabloqueantes y la amiodarona son los fármacos antiarrítmicos más empleados [56] y se recomiendan fundamentalmente como terapia adyuvante en pacientes portadores de desfibrilador automático y múltiples descargas apropiadas o pacientes sometidos a ablación endocárdica de taquicardia ventricular. También pueden ser empleados en pacientes con extrasistolia ventricular frecuente sintomática. No se deben

recomendar a pacientes asintomáticos en los que no se haya documentado taquicardia ventricular o sin expresión fenotípica.

Puede considerarse el empleo de betabloqueantes para intentar evitar la facilitación del estímulo adrenérgico en la generación de arritmias ventriculares y en base a un teórico beneficio mostrado en el manejo de pacientes con insuficiencia cardíaca de otro origen. De tal forma que se recomienda implantar el el tratamiento estándar de los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y betabloqueantes) en pacientes con MCA que desarrollan disfunción sistólica ventricular. Por otra parte, no se recomienda la anticoagulación sistemática en estos pacientes por el riesgo de trombosis sobre dilataciones ventriculares o aneurismas.

- Ablación con catéter.

La ablación endocárdica con catéter de taquicardias ventriculares en pacientes con MCA es una alternativa potencialmente efectiva para los casos de taquicardia ventricular recurrente con descargas apropiadas del desfibrilador [57]. Sabiendo que se trata de una enfermedad con afectación predominante por el estrato epicárdico, puede requerirse este abordaje para una ablación efectiva. La imagen multimodal con el uso de técnicas como la RM cardíaca puede facilitar la identificación del sustrato. No se debe remitir a ablación a pacientes con la intención de ser una alternativa al implante de un desfibrilador, pues, al igual que sucede con el tratamiento médico, no hay datos que sustenten que la ablación de taquicardia ventricular reduzca el riesgo de MSC.



- Desfibrilador automático implantable.

El desfibrilador automático implantable sea el elemento más efectivo frente a la MSC en esta población teniendo en cuenta que la historia natural de la enfermedad está estrechamente relacionada con la MSC y las arritmias ventriculares [58].

La indicación de implante de un desfibrilador automático es compleja por la evolución continua de los factores de riesgo que pueden precipitar la aparición de un evento arrítmico y por la ausencia de información de peso en la literatura científica. Hoy, establecemos tres niveles de riesgo para la indicación de implante de un desfibrilador automático:

- Alto riesgo: incluye pacientes que han sufrido una parada cardíaca por fibrilación ventricular o taquicardia ventricular sostenida (riesgo  $>10\%$ /año) y pacientes con disfunción sistólica ventricular grave.

- Riesgo intermedio: se trata de pacientes con un riesgo estimado entre 1-10% anual. Entre ellos el síncope, la taquicardia ventricular no sostenida o la disfunción sistólica izquierda o derecha moderada inclinarían la balanza hacia el implante de un desfibrilador automático.

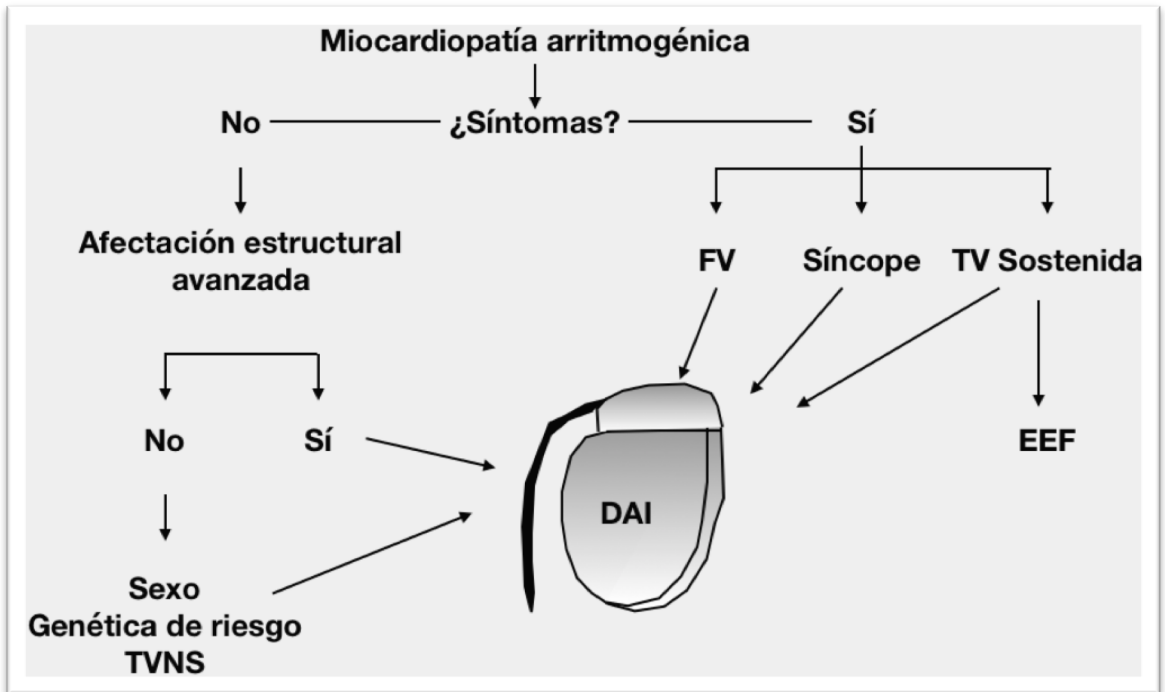
- Bajo riesgo: casos índice y familiares sin factores de riesgo.

En caso de indicarse el implante de un desfibrilador automático, se recomienda que el dispositivo sea un desfibrilador monocameral con el objetivo de disminuir las complicaciones a largo plazo relacionadas con el implante de electrodos múltiples intracardiacos. Es recomendable una adecuada programación del

desfibrilador ya que la terapia antitaquicardia puede evitar una descarga apropiada, así como retrasar la administración de terapias para evitar “sobretratar” episodios que serían no sostenidos.

A modo de resumen, podríamos concluir que ante un paciente con MCA y síntomas de evento arrítmico (síncope, parada cardiorrespiratoria por fibrilación ventricular, o taquicardia ventricular sostenida) debería implantarse un desfibrilador. Es valorable en aquellos casos de pacientes añosos con taquicardia ventricular sostenida aislada y bien tolerada la ablación con catéter. También puede ser una opción coadyuvante en la tormenta arrítmica o taquicardia incesante. En el paciente asintomático la afectación estructural avanzada (función sistólica ventricular derecha o izquierda gravemente reducida) debemos plantear el implante de un desfibrilador automático. Finalmente, en aquellos casos en que la afectación estructural no es muy marcada hay que ponderar parámetros como el sexo, la genética de riesgo, y la presencia de taquicardias ventriculares no sostenidas [Figura 1.4].

En definitiva, las medidas actuales en MCA son dirigidas a evitar las complicaciones arrítmicas de la enfermedad, con nulas opciones de tratamiento etiológico o curativo de la enfermedad. Como última alternativa permanece el trasplante cardiaco como solución a pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada o aquellos con tormenta arrítmica recurrente a ablación con catéter.



**Figura 1.4. Algoritmo propuesto para la toma de decisiones en el implante de desfibrilador automático implantable en miocardiopatía arritmogénica.** FV: fibrilación ventricular; TV: taquicardia ventricular; EEF: estudio electrofisiológico; TVNS: taquicardia ventricular no sostenida; DAI: desfibrilador automático implantable.

## **B. BASES GENÉTICAS DE LA MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA.**

### **I. Conceptos básicos en genética.**

Sucintamente podemos referirnos a las enfermedades genéticas como cromosómicas, monogénicas o multifactoriales. La MCA es una enfermedad monogénica con un patrón de herencia autosómico dominante (herencia mendeliana) en la mayor parte de los casos, siendo una minoría aquéllos con herencia autosómica recesiva (Síndrome de Naxos y Carvajal). Esta entidad además se caracteriza por tener una gran heterogeneidad genética, lo que significa que puede ser debida a mutaciones en diferentes genes. A esto le acompaña una penetrancia variable (no todos los portadores genéticos expresan la enfermedad), una expresividad variable (diferentes grados en la severidad de las manifestaciones) y el solapamiento fenotípico, incluso entre individuos de una misma familia.

Podemos describir el diagnóstico genético como las acciones que van encaminadas a hallar la causa genética de una enfermedad, y generalmente comprende además del estudio genético, de una historia clínica del caso índice y familiares y la realización de un árbol familiar de al menos tres generaciones.

#### **- Métodos de diagnóstico genético**

En el estudio de la causa genética de las enfermedades hereditarias se incluye el análisis molecular, que consiste en la detección de los cambios en las secuencias de ADN y su interpretación. Disponemos de distintas técnicas para el análisis molecular de muestras de ADN [59]:

- Técnica Sanger: es más antigua, se considera la primera generación de la tecnología de secuenciación de ADN y el *gold standard*. Consiste en el empleo de una ADN polimerasa que sintetiza cadenas de ADN a raíz del uso de una cadena sencilla de ADN que actúa de molde, un primer o cebador, y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de ADN. Esta técnica se usa para secuenciar fragmentos de ADN que no sean muy grandes (500-1000 pares de bases) en enfermedades en las que la mayoría de mutaciones causales se encuentran en un único gen o un número reducido de genes o para analizar la existencia de mutaciones puntuales. Limitaciones: región a secuenciar muy grande, cuando hay que secuenciar muchos genes (heterogeneidad genética), y en enfermedades multifactoriales.

- Tecnología NGS (next-generation-sequencing): permite secuenciar en paralelo millones de fragmentos de ADN. El ADN es fragmentado, amplificado y purificado. A continuación, se realizan múltiples lecturas de cada fragmento de ADN en el secuenciador. Debe prestarse especial atención a la cobertura de cada una de las regiones de interés, ya que la sensibilidad de la técnica NGS es menor a la Sanger y pueden requerirse múltiples lecturas para identificar un cambio.

Con la técnica de NGS se pueden secuenciar regiones concretas del ADN mediante el empleo de paneles de genes (número de genes determinados según la enfermedad), el exoma (secuenciar todas las regiones codificantes del genoma) o todo su genoma (también zonas

no codificantes o intrones). Uno de los grandes problemas de esta técnica es la interpretación de la gran cantidad de información que genera.

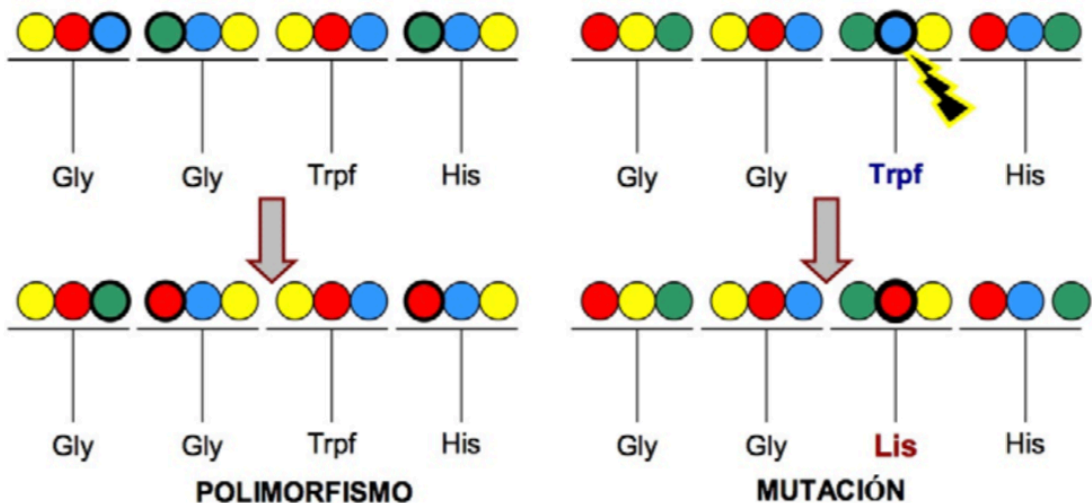
En MCA, generalmente, en pacientes sin una alteración genética conocida se emplea la tecnología NGS con paneles de genes predeterminados. En caso de identificar una mutación responsable de la enfermedad se realizarían secuenciaciones Sanger de la mutación puntual en cascada en los familiares.

- Consecuencias de las mutaciones

Clásicamente hemos denominado mutaciones a las variaciones en el código genético, que no estuvieran en población control y que pudieran desencadenar en el desarrollo de una patología. Esto relega a aquellas variaciones que no conllevaban patología o que estaban presentes en más del 1% de la población general como polimorfismos [Figura 1.5]. Hoy se prefiere hablar de variantes genéticas en general. Generalizando, estos polimorfismos no pueden producir enfermedad per sé, pero sí pueden modificar nuestra respuesta en la toma de fármacos o la expresión fenotípica de una enfermedad. Tanto las mutaciones como los polimorfismos pueden ser fruto del cambio de un solo nucleótido (también conocidas como mutaciones puntuales) correspondiéndose con una amplia variedad de efectos a nivel proteico. Si no supone ningún cambio las denominamos variantes sinónimas o silentes. Si el cambio de nucleótido conlleva un cambio en el significado del codón se trata de una variante *missense* o de cambio de sentido. Cuando el cambio de significado implica la generación de un codón de STOP, hablamos de una variante *nonsense* o sin sentido. Estas variantes *nonsense* suelen producir una detención precoz de la

lectura de ADN y, por tanto, una proteína anómala. Otro grupo de variantes son las inserciones o deleciones de nucleótidos, que cuando es múltiplo de tres se las denomina *in-frame* y no siempre modifica la pauta de lectura del ADN. Sin embargo, cuando no es múltiplo de 3, sí que suele modificar el marco de lectura y aparecen codones de STOP o con significado muy distinto, se las conoce como *frameshift*.

**Figura 1.5. Representación de polimorfismo y mutación.** A la izquierda (polimorfismo) en el ultimo triplete de nucleotidos hay un cambio de uno de ellos (verde por rojo), sin embargo, no cambia el significado del triplete. A la derecha (mutación) en el tercer triplete hay un cambio



de nucleótido que conlleva un cambio de sentido del codón.

#### - Interpretación de los resultados.

Como ya hemos comentado, uno de los problemas del empleo de la tecnología NGS es la interpretación de la información que genera y su aplicación a la práctica clínica, lo que requiere de una amplia experiencia [60].

Las variantes las podremos clasificar según su frecuencia en

polimorfismos (presentes en controles sanos, >1%), variantes raras (presentes en controles sanos en muy baja frecuencia, < 0.5%) y mutaciones (no aparecen en controles). Desde el punto de vista clínico las variantes pueden describirse como patogénicas (cuando se consideran causantes de la enfermedad), benignas (polimorfismos no responsables de la enfermedad, aunque pueden actuar como modificadores), y variantes de significado incierto (no se puede asegurar su patogenicidad, tampoco que sean benignas).

En la interpretación de la patogenicidad de una variante debemos valorar distintos aspectos de la misma:

- Descripción previa: hay que estudiar si la variante encontrada ha sido reportada previamente en la literatura científica o en bases de datos clínicas y su asociación con cardiopatías.
- Frecuencia: se comprueba si se ha hallado en bases de datos de población control (*Exome Variant Project*, *dbSNP*, ...). La descripción previa en poblaciones control no implica que sea necesariamente benigna, sin embargo, una frecuencia alélica en la población general superior al 0.3% lo más probable es que sea un cambio benigno.
- Segregación familiar: la cosegregación significativa del defecto genético en la familia apoya la patogenicidad del mismo. La cosegregación es significativa si hay 10 o más individuos afectados portadores. En ocasiones hay que valorar que la variante genética estudiada no es una mutación causal pero otra posible explicación es que exista una segunda mutación no identificada. La penetrancia incompleta explica que pueda haber sujetos sin



manifestación fenotípica portadores de la mutación.

- Tipo de mutación: aquellas que producen un cambio en el marco de lectura (*frameshift*) o un codón de parada prematuro son las que con mayor probabilidad van a tener una repercusión en la función de la proteína (*nonsense*). Sin embargo, los cambios de nucleótido por otro (*missense*) son las más frecuentes. Un último grupo serían aquellas que afectan a los intrones, siendo las de mayor repercusión funcional las que se localizan en la proximidad de la zona de ensamblaje de los exones o *splice site*.

- Estudio funcional: esta información está ausente en muchas ocasiones. Son de especial interés aquellos realizados en tejidos propios del paciente.

- Análisis bioinformático: estas herramientas ayudan a predecir el impacto funcional de la mutación en el gen o la proteína. También aportan información en cuanto al grado de conservación de la secuencia comparada con otras especies, también se pueden realizar análisis *in silico*. En general el análisis *in silico* aunque puede guiar la clasificación de una variante genética no se considera suficiente para establecer su patogenicidad. Algunos ejemplos de estas herramientas son el software SIFT [61], Polyphen-2 [62] y Mutation Taster [63]

## **II. Utilidad práctica del diagnóstico genético.**

El diagnóstico de los pacientes índice se basa en los criterios modificados internacionales, entre los que se encuentra el genotipo. La MCA se caracteriza por un espectro clínico muy heterogéneo y

el estudio genético puede ayudar enormemente a identificar la causa específica de la enfermedad, así como identificar fenocopias (sarcoidosis, miocarditis) cuya expresión clínica muchas veces es solapada. Siendo cada vez mayor el conocimiento de las bases genéticas del desarrollo de MCA y el solapamiento clínico de las distintas cardiomiopatías, junto a la generalización de técnicas como la NGS, es de especial interés el empleo en este grupo de pacientes de paneles de genes conocidos implicados en el desarrollo de miocardiopatías.

El estudio genético en esta población tiene un rendimiento diagnóstico aproximado del 60% [53]. El diagnóstico genético nos permitirá identificar aquellos familiares que están predispuestos a desarrollar la enfermedad. En ocasiones los datos disponibles pueden aportar información pronóstica, ya que existen casos que pueden desarrollar fenotipos severos y/o precoces conllevando un alto riesgo de eventos cardiovasculares.

El disponer de un diagnóstico genético también permite contar con la opción de realizar una selección preimplantacional de embriones para evitar transmitir la enfermedad a generaciones futuras.

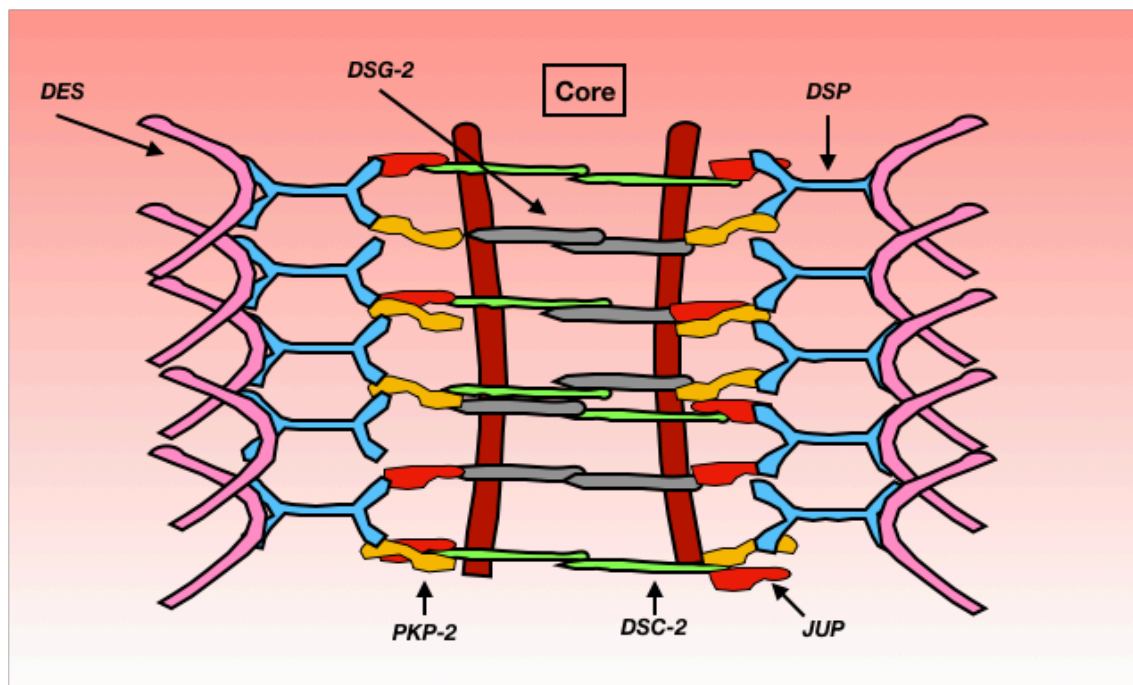
En definitiva, la identificación de la mutación genética causante de la enfermedad en un paciente con MCA es de suma importancia, ya que permite:

- Identificar a los miembros de la familia afectados en una fase preclínica y tranquilizar a las personas no afectadas.
- Estratificar el riesgo de MSC

- Confirmar el diagnóstico en un paciente con sospecha clínica
- Realizar diagnóstico diferencial con otras patologías con presentación clínica semejante.

### **III. Disco intercalar y desmosoma: bases moleculares y fisiológicas.**

En el desmosoma cardiaco las proteínas transmembrana de la familia de las cadherinas desmogleína-2 y desmocolina-2 median la unión intercelular. Sus porciones citoplasmáticas proporcionan una plataforma de unión para las proteínas pertenecientes a la familia de proteínas armadillo placoglobina y placofilina-2, que a su vez se asocian con isoformas de la desmoplaquina, que completan el enlace con filamentos intermedios de desmina a través de sus extremos C-terminales [Figura 1.6]. Esta interacción de los filamentos intermedios con el desmosoma es esencial para la integridad del miocardio [64].



**Figura 1.6. Representación del desmosoma: la región central (core) media la unión celular y en la placa densa se realiza la unión del desmosoma a los filamentos intermedios.** Se pueden identificar tres grupos de proteínas: uno formado por proteínas transmembrana (desmocolina 2 y desmogleina 2), otro formado por la desmoplaquina que mantiene la unión con los filamentos intermedios (desmina en el corazón) y otro grupo de proteínas armadillo (placofilina 2 y placoglobina) que media entre las transmembrana y la desmoplaquina.

Por otra parte, otro elemento cardiaco de unión es el área composita. Este complejo molecular se conforma de proteínas desmosómicas como la placoglobina y placofilina-2, además de proteínas de adhesión cardiaca (N-cahderina, beta-catenina, alfa-e-catenina y vinculina). Podemos entenderlo como un sistema macromolecular, en el que las proteínas desmosomales y las proteínas de adhesión cardiaca se asocian íntimamente entre sí. El área composita ocupa cerca del 90% de la superficie del disco intercalares y se interrumpe solamente por unas pocas uniones gap y desmosómicas [65].

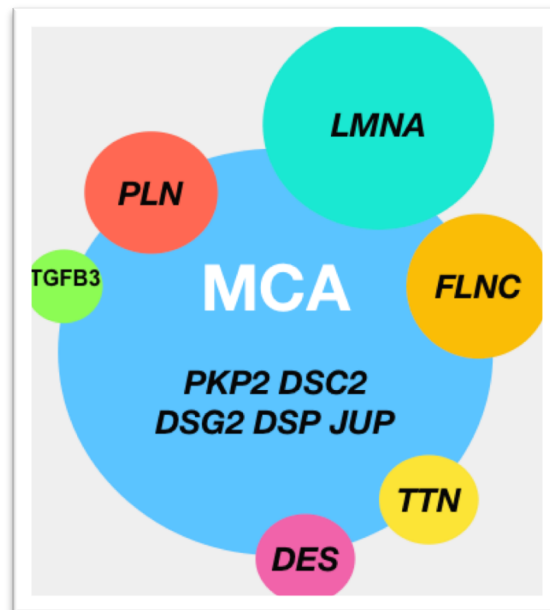
La información actual sugiere que las interacciones entre las moléculas de adhesión intercelular, uniones gap y los canales de sodio dependientes de voltaje interactúan con los discos intercalares, considerados como un orgánulo más, de forma específica para mantener la estructura cardíaca y la sincronía de los cardiomiocitos [66]. Es dentro de este macrocomplejo donde se localizan la mayoría de las proteínas que participan en la MCA, lo que sugiere que esta patología debería considerarse como una enfermedad del disco intercalar en lugar de solo desmosómica.

Alteraciones en la función del disco intercalar daría lugar a la disrupción en la unión de los cardiomiocitos y, por tanto, a su muerte, sobre todo en situaciones de tensión o estrés mecánico. Esta hipótesis patogénica explicaría por qué la MCA se asocia principalmente a las áreas más delgadas de la pared del ventrículo derecho y de la pared posterolateral del ventrículo izquierdo, las más vulnerables al estrés mecánico. En este sentido, estudios llevados a cabo en pacientes portadores de mutaciones en genes codificantes de proteínas de adhesión celular reportaron una llamativa remodelación de los discos intercalares, que se caracterizaban por una relevante disminución del número de desmosomas y por la pérdida de integridad estructural de los mismos [40].

#### **IV. Genes implicados. Relación genotipo-fenotipo.**

Cada vez es mayor el conocimiento acerca de las correlaciones genotipo-fenotipo y los mecanismos genéticos y moleculares que conducen al desarrollo de MCA. Algunos autores han propuesto que aquellos pacientes portadores de

variantes patogénicas en genes desmosomales tienen una mayor incidencia de eventos arrítmicos mayores definidos como MSC, taquicardia ventricular, y descargas apropiadas del desfibrilador automático implantable. También se ha descrito que los pacientes en los que se encuentra alguna variante patogénica, desmosomal o no, suelen tener una expresión fenotípica más exacerbada [67]. Dos patrones de herencia han sido descritos en MCA: una forma autosómica dominante, que es la más frecuente, y una forma autosómica recesiva. Esta última generalmente se encuentra formando parte de un síndrome cardiocutáneo, que como ya hemos comentado, inició la investigación hacia la identificación de los primeros genes responsables de la enfermedad [Figura 1.7].



**Figura 1.7. Imagen representativa de la distribución genética de la miocardiopatía arritmogénica.** MCA: miocardiopatía arritmogénica; *LMNA*: lamina A/C; *FLNC*: filamina C; *PLN*: fosfolambán; *TTN*: titina; *DES*: desmina; *TGFβ3*: factor transformador de crecimiento beta 3.

- Desmosomales

Placoglobina (*JUP*)

La involucración de la placoglobina en el desarrollo de MCA fue propuesta por primera vez a raíz de la descripción de la enfermedad de Naxos en una serie de pacientes de la isla griega de Naxos. Presentaban un síndrome autosómico recesivo con la asociación de pelo lanoso, queratosis palmoplantar y MCA con una alta incidencia de arritmias ventriculares. Los síntomas podían estar ya presentes desde la infancia. En esta variante, el ventrículo derecho siempre está afectado inicialmente, con progresión al ventrículo izquierdo. De forma anecdótica, se ha descrito el caso de una familia europea con un fenotipo cardiaco de MCA con herencia autosómica dominante de una variante en placoglobina sin afectación cutánea [68].

Desmoplaquina (*DSP*)

Fue el primer gen descrito en herencia autosómica dominante [12]. También descrita en un síndrome cardiocutáneo con herencia autosómica recesiva conocido como síndrome de Carvajal. De forma muy semejante a la enfermedad de Naxos, este síndrome se asocia a alteraciones cutáneas, pelo lanoso y MCA. En el caso de la forma autosómica dominante, la afectación ventricular izquierda es frecuente, habiendo más disfunción sistólica e insuficiencia cardiaca que aquellos pacientes portadores de variantes en *PKP2* [62].

### Placofilina-2 (*PKP2*)

Se trata del gen desmosomal más frecuentemente hallado en pacientes con MCA, y generalmente se asocia a un patrón de herencia autosómico dominante. Se estima una prevalencia de mutaciones en *PKP2* de en torno el 44% en esta población [69]. Actualmente existe controversia en cuanto a la patogenicidad de muchas variantes en *PKP2*, también en aquellas que producen truncamientos de la proteína [70;71]. Se han descrito variantes en *PKP2* con una frecuencia de 1/200 en población sana finlandesa. Esta información hace pensar que muchas variantes en este gen no se asocien con enfermedad y que para producir enfermedad se necesite una segunda mutación en *PKP2* u otro gen desmosomal [72;73].

### Desmogleina-2 (*DSG2*)

La desmogleina 2 es otro componente importante del desmosoma y la isoforma 2 es la única isoforma expresada en los miocitos cardiacos. Tras analizar a una población de 80 casos índices con MCA, se identificaron a 8 individuos portadores de mutaciones en el gen *DSG2*. Análisis posteriores confirmarían su implicación en el desarrollo de la enfermedad, así como una aparente elevada penetrancia y predilección por el ventrículo izquierdo [74].

### Desmocolina-2 (*DSC2*)

Desmocolina es una cadherina importante del desmosoma. Dos mutaciones en heterocigosis fueron descritas (frameshift y truncamiento) como responsables del desarrollo de MCA. La identificación del quinto gen desmosomal implicado en la



enfermedad apoyó la hipótesis de que la enfermedad se asienta en anomalías en las uniones celulares [75] .

- No desmosomales

Muchos de los genes no desmosomales se han descrito inicialmente en otras formas de miocardiopatía, siendo más tarde relacionados con el desarrollo de MCA. Con frecuencia se puede presentar un fenotipo solapado entre ambas formas de cardiopatía (heterogeneidad clínica y genética).

Titina (*TTN*)

*TTN* es el gen más grande expresado en mamíferos. El conocimiento acerca de este gen ha crecido en las últimas décadas y se ha relacionado con un importante porcentaje de pacientes con miocardiopatía dilatada. Esta proteína está relacionada con aspectos “mecánicos” celulares y, por tanto, el estrés mecánico sobre esta proteína conduciría a la apoptosis y ulterior desarrollo de miocardiopatía [76].

Luma (*TMEM43*)

Mutaciones patogénicas en este gen conducen al desarrollo de una forma de MCA especialmente grave. También se la conoce como ARVC/D tipo 5, tiene una penetrancia del 100%, y el pronóstico es mucho peor en el sexo masculino. Se ha postulado que *TMEM43* codifica la proteína LUMA, presente en los discos intercalares, y además también tiene relación con elementos clave en la transcripción adipogénica (PPAR gamma), pudiendo guardar relación con la infiltración fibroadiposa que caracteriza a esta enfermedad. Se ha descrito como un problema endémico en ciertas

áreas como Newfoundland en Canadá, aunque posteriormente aparecieron casos en Europa aparentemente no relacionados con las familias iniciales canadienses. La media de supervivencia para ambos sexos está reducida comparada con controles y, en el caso de los varones. La mediana de supervivencia en ellos es de 41 años, muy inferior a la mediana de población control (83 años). Por todo ello, debe plantearse el implante precoz de un desfibrilador automático en varones portadores de variantes en TMEM43 [19;77].

#### Fosfolambán (*PLN*)

Inicialmente fue descrito su efecto fundador en población holandesa, siendo responsable de cerca del 15% de casos de miocardiopatía dilatada idiopática y MCA. PLN codifica una proteína transmembrana del retículo sarcoplasmático que regula la circulación del calcio intracelular y cuya implicación en el desarrollo de MCA no se conoce bien todavía. Pacientes con función sistólica ventricular izquierda (FEVI) <45% y/o taquicardia ventricular no sostenida tienen un mayor riesgo para presentar eventos cardiovasculares graves [20].

#### Lamina A/C (*LMNA*)

Las proteínas lamina A y lamina C son componentes de la membrana nuclear del miocardiocito. Las laminopatías se han asociado a miocardiopatía dilatada caracterizada por trastornos de conducción auriculoventricular, arritmias y/o miopatía esquelética periférica. Este gen también se ha asociado con el desarrollo de MCA, no siendo infrecuente el solapamiento entre ambas miocardiopatías y un curso marcado por las arritmias ventriculares [21;78].

### Filamina C (*FLNC*)

De forma semejante a *LMNA*, recientemente, los truncamientos en la proteína filamina C se han asociado con miocardiopatía dilatada, con un importante solapamiento con MCA de predominio en ventrículo izquierdo y que se caracteriza por una alta carga de MSC, arritmias ventriculares y fibrosis con una función ventricular sistólica biventricular relativamente preservada [79]. Esta proteína se expresa en células musculares cardíacas y esqueléticas uniendo los filamentos de actina y múltiples proteínas a nivel de los discos Z del sarcómero.

### Factor transformador de crecimiento beta 3 (*TGF- $\beta$ -3*).

Este gen se ha descrito implicado en el desarrollo de MCA en una gran familia. La hipótesis es que la sobreexpresión de *TGF- $\beta$ -3* puede contribuir al desarrollo de la enfermedad. Esta familia de proteínas estimula la producción de componentes de la matriz extracelular y, por tanto, fibrosis [18].

### Otros: canales iónicos.

Algunos canales iónicos como la subunidad alfa del canal de sodio (*SCN5A*) [80] y el receptor de la rianodina 2 (*RyR2*) [81] también se han asociado de forma puntual con el desarrollo de MCA, y no existe mucha información relativa a la correlación genotipo-fenotipo y existe controversia en cuanto a esta relación.

## **C. DESMINA**

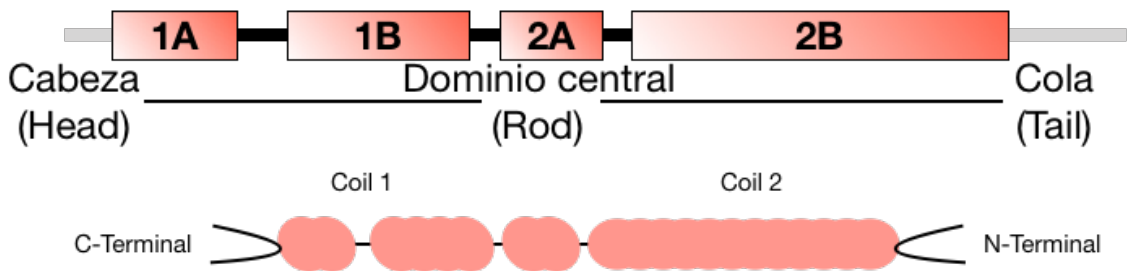
### **I. Filamentos intermedios**

Los filamentos intermedios (FI) tienen un espesor de unos 10nm y se los denomina así porque el diámetro del filamento es intermedio entre los filamentos de actina y de miosina en las células musculares. Más tarde se estableció su presencia en casi todos los tipos celulares como componente del citoesqueleto. Son especialmente numerosos en las células expuestas a tensión mecánica o estructural, dado que su función principal es conferir fuerza mecánica. En consecuencia, los FI son más el componente más estable del citoesqueleto.

A pesar de su aspecto uniforme al microscopio electrónico, los filamentos intermedios representan un grupo heterogéneo compuesto por distintas proteínas en los diversos tipos celulares, e incluso en el mismo tipo celular en distinto grado de diferenciación. Sin embargo, las proteínas están relacionadas entre sí y la conformación básica es uniforme. Cada proteína está formada por dos polipéptidos que forman un dímero. La estructura final formando un FI no está polarizado (no tiene extremos positivos y negativos).

En la actualidad los FI incluyen a 73 proteínas distintas que se clasifican en cinco tipos distintos sobre la base de su estructura primaria, sus propiedades de ensamblaje y su patrón de expresión específico en los distintos tejidos. El grupo I y II de FI están compuestos por queratinas que forman heteropolímeros en las células epiteliales. El grupo III incluye a la desmina, la sincoilina, la vimentina, la periferina y la proteína ácida fibrilar glial y forman homopolímeros. El grupo IV de FI comprende tres subunidades neurofilamentosas (NF-L [*light*], NF-M [*middle*] and NF-H [*heavy*]),

la alfa-internexina, la nestina y la sinemina alfa y beta. Finalmente, el grupo V engloba a los FI más antiguos en términos evolutivos, los FI nucleares (lamina A, B1, B2, C1 y C2). Los FI citoplasmáticos comparten una estructura secundaria semejante compuesta de un cuerpo helicoidal central o “*rod domain*” flanqueado por zonas no helicoidales. Este cuerpo central se subdivide en 4 segmentos distintos, siendo el 1A, localizado en la zona amino-terminal y el 2B, en la zona carboxi-terminal, las dos regiones más conservadas en los FI [Figura 1.8]. La zona amino-terminal es clave para el ensamblaje del FI, mientras que la carboxi-terminal es fundamental en las interacciones del FI con otras proteínas, así como para la propia organización de la red de filamentos intermedios [82].



**Figura 1.8. Organización estructural de los filamentos intermedios.** Se muestra la estructura tripartita del filamento intermedio con una muy conservada zona central alfa helicoidal (*rod domain*) flanqueada por dos estructuras no helicoidales (*head* y *tail domains*).

Los FI son estructuras muy dinámicas con funciones celulares más allá del mantenimiento estructural y funcional de las células, estando relacionados con la posición y función de las organelas, la regulación de la transcripción e incluso en la apoptosis celular. Las membranas de los cardiomiocitos o sarcolemas están conectadas mecánica y eléctricamente a través de uniones intercelulares altamente especializadas o discos intercalares. Una de estas zonas de contacto se corresponde con el desmosoma. De forma circular se encuentra presente en tejidos expuestos a fuertes

acciones mecánicas como el epitelio plano estratificado de la epidermis. Desde el punto de vista ultraestructural se distinguen las dos membranas opuestas del desmosma, separadas por un espacio intercelular. Sobre la cara citoplasmática de estas membranas se asientan los FI citoplasmáticos que convergen hacia el desmosoma, que en la musculatura cardíaca están formados fundamentalmente por la proteína desmina. En la zona de anclaje se pueden identificar las proteínas placoglobina y desmoplaquina, uniendo así el citoesqueleto al desmosoma. De forma anexa se encuentra las proteínas desmogleína y desmocolina, de la familia de las cadherinas, que fijan su dominio extraceular con los correspondientes dominios extracelulares de las moléculas de la membrana celular opuesta.

## **II. Desmina: estructura y funcionamiento**

La desmina está codificada por un gen único denominado *DES*, localizado en el cromosoma 2q35, y contiene 9 exones. El gen está muy conservado entre los vertebrados. El otro gen involucrado en la enfermedad es el *CRYAB*, que codifica la  $\alpha\beta$ -cristalina, que se encuentra en el cromosoma 11q22.3-q23.1, y también está muy conservado entre una gran variedad de especies. Hasta la fecha, desde la publicación de las primeras mutaciones en desmina como causantes de enfermedad en 1998 [83-85], son en torno a 70 las mutaciones patogénicas descritas en el gen *DES*. Las mutaciones se pueden localizar en cualquier parte del gen, pero se concentran mayoritariamente en el exón 6, que codifica la porción C-terminal de la hélice 2B. Las mutaciones en el dominio de la cola son las segundas en frecuencia, e impiden la interacción con proteínas citoesqueléticas.

La desmina es una proteína expresada en el músculo cardíaco, esquelético, y liso de animales vertebrados que forma parte del extenso grupo denominado como filamentos intermedios (FI) [85]. Como ya hemos comentado previamente, el citoesqueleto del cardiomiocito está compuesto predominantemente por desmina [86]. También es muy abundante en las fibras de Purkinje del sistema específico de conducción cardíaca. Es una proteína de 52kD Se localiza cerca de los discos Z de los sarcómeros de las miofibrillas musculares, funcionando como un soporte estructural anclándolos al sarcolema. También participan en algunas uniones intercelulares (desmosomas) principalmente en las células musculares cardíacas.

La desmina en concreto tiene tres dominios principales: un dominio central en hélice  $\alpha$  que es constante, un dominio variable no-helicoidal en la cabeza, y una cola en el extremo C-terminal. La desmina, como todas las proteínas de los filamentos intermedios, pierden su polaridad cuando se ensamblan (sus dos extremos son iguales). El dominio central consiste en 308 aminoácidos con dos hélices  $\alpha$  paralelas enrolladas entre sí formando un dímero y tres uniones que lo interrumpen. El dominio de la cabeza consiste en 84 aminoácidos con algunas argininas, serinas y residuos aromáticos y es importante en el ensamblaje de filamentos y en las interacciones dímero-dímero. El dominio de la cola es el responsable de la integración de los filamentos y de la interacción con otras proteínas y orgánulos, como la desmoplaquina o la mitocondria. Entre la gran cantidad de proteínas que tienen relación con la desmina, la  $\alpha\beta$ -cristalina. Se trata de una proteína citosólica que se ubica junto a la desmina en las bandas Z, otorgándole estabilidad y evita su agregación irreversible.

Hace varias décadas que se estableciera la asociación entre las desminopatías y la enfermedad muscular esquelética y cardíaca [87]. Característicamente la primera sospecha para establecer esta relación fue el hallazgo de agregados insolubles citoplasmáticos de desmina en pacientes con miocardiopatía y miopatía periférica. Hoy sabemos que la proteína mutante es incapaz de establecer un dímero estable, perdiendo así su función y precipitándose en forma de agregados de filamentos intermedios. Estos depósitos están formados fundamentalmente por desmina, filamina C y  $\alpha\beta$ -cristalina. Estos depósitos pueden ser visibles mediante técnicas inmunohistoquímicas como el empleo de anticuerpos anti-desmina en biopsias endomiocárdicas o de músculo esquelético, si bien carece de especificidad.

### **III. Desminopatías: espectro clínico.**

Las desminopatías pueden presentarse en forma autosómica dominante principalmente, aunque no son infrecuentes las formas de novo o autosómica recesivas. En general, la penetrancia de las desminopatías es muy elevada y su expresión fenotípica es muy heterogénea, lo que dificulta el reconocimiento de las mismas.

Dado que la desmina se encuentra mayoritariamente en el músculo esquelético y en el cardíaco, el nivel de sospecha debe ser elevado ante pacientes con miopatía distal lentamente progresiva, disfonía, disfagia y síntomas cardíacos (especialmente disnea, mareos o síncope). Con probabilidad podremos detectar trastornos de la conducción AV y alguna forma de miocardiopatía (miocardiopatía dilatada o restrictiva principalmente). En ocasiones también se pueden detectar alteraciones del electromiograma. Por



otro lado, la insuficiencia respiratoria puede estar presente de forma secundaria a la afectación de los músculos respiratorios y al diafragma. Ocasionalmente la biopsia muscular puede ser necesaria y puede dar el diagnóstico, ya que característicamente se pueden apreciar depósitos granulares intracitoplasmáticos de desmina. La realización de un análisis genético para el diagnóstico correcto, y posterior consejo genético es esencial. La evaluación multidisciplinar por neurología, cardiología y neumología, fundamentalmente, es esencial en el manejo de estos pacientes.

- Manifestaciones Cardiacas.

En general, el dato más constante es la presencia de miocardiopatía y algún grado de trastorno de la conducción AV. Temporalmente pueden preceder, coincidir o aparecer tras el desarrollo de afectación muscular esquelética. Según un metanálisis reciente [88], que comprendía a todos los pacientes descritos hasta la fecha portadores de una mutación en desmina, alguna manifestación cardíaca estaba presente en el 74% de los pacientes (105/141). La afectación cardíaca aislada estuvo presente en el 22% de los pacientes. Cerca del 50% de los pacientes presentaron fueron diagnosticados de alguna miocardiopatía según los rasgos fenotípicos mostrados. De estos la miocardiopatía dilatada, la restrictiva y la hipertrófica fueron las más frecuentes. Tan solo habían sido reportados hasta la fecha dos casos de MCA [88]. Como en cualquier cardiopatía, deben realizarse seguimientos periódicos con técnicas de imagen como el ecocardiograma transtorácico o la RM cardíaca. Ésta además puede facilitar el diagnóstico precoz de la miocardiopatía, gracias a una mayor sensibilidad y la presencia de fibrosis intramiocárdica.

Las alteraciones del ritmo estaban presentes en el 62% de los pacientes, siendo los trastornos de la conducción AV los más frecuentes (39%), seguidos del bloqueo de rama derecha. En un número significativo de pacientes este puede ser el debut de la enfermedad, y justifica una elevada tasa de implante de marcapasos en esta población. Alta densidad de extrasístoles ventriculares y taquicardias ventriculares también han sido reportadas, requiriendo en algunos casos el implante de un desfibrilador automático. Por tanto, debido a la alta tasa de arritmias potencialmente graves es recomendable establecer una vigilancia estrecha mediante ECGs y monitorización electrocardiográfica ambulatoria. La ello, se recomienda en estos pacientes realizar además de frecuentes ECGs, holter ECG 24 horas periódicamente y valorar el implante de un marcapasos permanente ante trastornos AV de bajo grado, por su rápida progresión a bloqueo AV completo. Por otra parte, aunque la indicación del implante de un desfibrilador no es un tema con suficiente evidencia, deberá considerarse en casos de taquicardia ventricular no sostenida.

#### - Manifestaciones Musculares

La forma de presentación clásica es con afectación de la musculatura distal de los miembros inferiores, con una progresión hacia la musculatura proximal y puede llegar a ser una miopatía generalizada. La debilidad puede afectar a los músculos del tronco, flexores del cuello y, en ocasiones, los faciales. De forma semejante a la afectación cardíaca, en el mismo trabajo de Van Spaendonck-Zwarts y colaboradores [88], el 74% de los pacientes portadores de una variante patógena en *DES* presentaron afectación muscular. Cerca del 50% de los pacientes la presentaron en combinación con

afectación cardíaca. Clásicamente los pacientes pueden presentar con niveles de creatin-quinasa (CPK) normal (30% de los pacientes) o discretamente elevada (en el 91% de ellos los valores son de menos de 4 veces en límite superior de referencia). Incluso en el 30% de los pacientes con miopatía se observan niveles de CPK normales. En la biopsia muscular se pueden apreciar miofibrillas que contienen depósitos proteicos amorfos inmunorreactivos para desmina, y cambios degenerativos.

#### **IV. Desmina y miocardiopatía arritmogénica.**

Como se ha hecho referencia previamente, aproximadamente, más de 70 mutaciones en el gen *DES* han sido reportadas hasta la fecha distribuidas a lo largo de toda su secuencia. Estas conducen a la incapacidad de la proteína desmina para un adecuado ensamblaje y relación con otras proteínas celulares, generando así agregados proteicos en la mayoría de los casos.

Sin embargo, el papel de estos agregados en el desarrollo de miopatía esquelética o cardíaca, y especialmente en la alta incidencia de eventos arrítmicos es desconocido.

Aunque son múltiples las distintas mutaciones identificadas en *DES*, son solo unas pocas las que se han identificado en pacientes con miocardiopatía arritmogénica, caracterizada por arritmias y disfunción sistólica ventricular que conduce al desarrollo de síncope, insuficiencia cardíaca o MSC.

En 2009 Van Tintelen realizó la primera descripción de una variante en *DES* relacionándola con MCA [22]. En este trabajo describieron a 5 familias europeas afectadas por una mutación missense puntual p.Ser13Phe, que afecta a la cabeza de la proteína. De los 5 casos índices 2 presentaban miocardiopatía y 3 mostraron un predominio de síntomas neurológicos con afectación cardíaca concomitante. Se identificaron a 27 individuos (7 portadores obligados) distribuidos en las 5 familias. Todos los sujetos (edad media de 35.5 años) presentaban miocardiopatía (penetrancia completa), siendo ésta la afectación predominante. El espectro fenotípico de la miocardiopatía fue amplio: miocardiopatía dilatada en 7 casos, miocardiopatía hipertrófica en 5 casos, una miocardiopatía inespecífica en 1 sujeto y finalmente dos casos que cumplían los criterios diagnósticos de 1994 de MCA. Van Tintelen destaca que además de los pacientes con MCA, otros cuatro portadores de la variante y con otra miocardiopatía presentaron insuficiencia cardíaca de ventrículo derecho en fases precoces de la enfermedad. A nivel histológico, pudieron estudiar muestras de tejido miocárdico de uno de los pacientes con de MCA, confirmando la presencia de agregados de desmina en el sarcoplasma de los miocitos. Sin embargo, no describen alteraciones a nivel de las proteínas de unión celular en este paciente, aspecto que sí aprecian en otros fenotipos.

Más tarde el mismo grupo describiría una nueva mutación en *DES* (p.Arg454Trp) relacionándolas con el desarrollo de MCA [89]. En este trabajo recogen a una familia holandesa en la que el paciente índice es una niña de 9 años con un bloqueo auriculoventricular completo que recibe un marcapasos a la edad de 18 años. En ese momento mostraba unos diámetros ventriculares

ligeramente aumentados, mayor de ventrículo derecho, y finalmente falleció a la edad de 27 años por insuficiencia cardiaca. Nunca presentó sintomatología muscular. El análisis histológico de muestras de miocardio mostró fibrosis e inflamación focal. Tanto su padre, como su hermano fallecieron jóvenes (31 y 27 años respectivamente) por insuficiencia cardiaca, y recibieron un marcapasos por bloqueo auriculoventricular completo. El estudio histológico de muestras del miocardio del padre mostró dilatación biventricular con sustitución fibrosa circunferencial. Además, los estudios de inmunohistoquímica mostraron una disminución significativa de proteínas de unión celular como la desmoplaquina y la placofilina-2, remarcando la importancia de la unión del desmosoma y área composita con los filamentos intermedios mediante la desmoplaquina.

En ese mismo año, Klauke y colaboradores [90] publicaron la mutación missense p.Asn116Ser en *DES*, localizada en el dominio 1A de la proteína en un paciente con diagnóstico definitivo de MCA según los criterios internacionales. Se trata de una mujer de 15 años con afectación ligera miopática y que requirió un trasplante cardiaco a los 17 años por insuficiencia cardiaca avanzada. En este caso no se describen trastornos del ritmo ni ningún tipo de afectación arrítmica. El estudio de cosegregación de la variante no encontró más portadores ni enfermos en la familia, catalogándose como un caso espontáneo. El análisis histológico del corazón trasplantado mostró la acumulación de agregados de desmina y miotilina en ambos ventrículos. El estudio de transfección en cultivos de células SW13 (células de carcinoma adrenocortical humano) mostró un fallo en la formación de la red de citoesqueleto

generándose agregados de filamentos intermedios; la presencia de desmina no se pudo demostrar en estos cultivos.

Heldberg y colaboradores en 2012 reportaron la mutación p.Pro419Ser en el exón 7 en el gen *DES* en 7 miembros de una familia sueca [91]. Esta variante recae en la cola de la proteína desmina y ya había sido relacionada previamente con el desarrollo de miopatía miofibrilar, diagnóstico clínico inicial de la familia. Tres sujetos varones, dos de ellos murieron súbitamente, cumplían los criterios diagnósticos de MCA y el análisis necrópsico de uno de ellos mostró una infiltración fibroadiposa avanzada en el ventrículo derecho.

Dada la expansión en el conocimiento de la genética de la MCA y en concreto la proliferación de publicaciones en la literatura científica asociando mutaciones en *DES* con el desarrollo de esta enfermedad, Lorenzon y colaboradores analizaron la prevalencia de variantes en este gen en una extensa cohorte de pacientes con diagnóstico definitivo de MCA y ausencia de miopatía esquelética [92]. Analizaron a 91 casos índice y tan solo identificaron dos variantes *missense* en 2 pacientes (2'2%), sugiriendo que en ausencia de miopatía periférica la posibilidad de una desminopatía en esta población es baja. Ambas variantes (p.Lys241Glu y p.Ala213Val) no pudieron demostrarse como patogénicas.

Reciente es el trabajo de Brodehl y colaboradores en el que describen la patogenicidad de la variante p.Ala120Asp en *DES* [93]. En esta publicación se describe a una extensa familia germana con diagnóstico de miocardiopatía dilatada y una elevadísima carga familiar de MSC a edades tempranas. El caso índice es una mujer de 34 años que debutó con un flúter auricular, extrasistolia

ventricular frecuente y función sistólica y volúmenes biventriculares normales, en ausencia de miopatía periférica. Un primo del caso índice mostraba un bloqueo auriculoventricular de primer grado, anomalías de la onda T pero buena función sistólica biventricular. Dados los antecedentes familiares de MSC ambos pacientes recibieron un desfibrilador automático. Los distintos estudios funcionales demostraron la ausencia de desmina en los discos intercalares y el depósito anómalo citoplasmático granular de desmina. En este caso aunque el estudio funcional sugiere que se trata de una variante patogénica, sin embargo el estudio de cosegregación falló al no disponer de material genético de los familiares fallecidos.

Existe poca información relativa a la prevalencia y espectro fenotípico de las desminopatías en España. Una aproximación a esta ausencia de información fue abordada recientemente por investigadores españoles con la descripción de una cohorte de 20 pacientes pertenecientes a 4 familias en las que se identificaron tres variantes patogénicas distintas (p.Ile367Phe, p.Pro419Ser y p.Arg415Gln) [94]. El caso índice portador de la variante p.Arg415Gln falleció súbitamente a los 30 años de edad siendo la información de la necropsia compatible con MCA de predominio izquierdo. Se trata de una mutación que afecta al *splicing* del gen, afectando al marco de lectura y añade valor a su potencial patogénicidad. Por otra parte, en el estudio de cosegregación de la variante tan solo el padre del caso índice mostró miocardiopatía dilatada, un fenotipo que puede presentarse de forma solapada con MCA.

## **V. Variante p.Glu401Asp en DES**

Se trata de una variante de tipo *missense* en heterocigosis: NC\_000002.11:g.220286241G>C (código de nucleótido), NP\_001918.3:p.Glu401Asp (código de aminoácido), nombre alternativo a nivel de proteína: NP\_001918.3:p.E401D. Esta variante se localiza en el exón 6.

Esta variante p.Glu401Asp en el gen *DES* no ha sido descrita previamente en ningún artículo o comunicación. Tampoco se encuentra presente en población control, por tanto, podemos considerarla una mutación. Afecta a un residuo muy conservado en la evolución y se produce el cambio de ácido glutámico (Gln) por ácido aspártico (Asp).

Como se ha comentado previamente, la proteína desmina tiene un dominio central  $\alpha$  helicoidal que es constante, un dominio variable no-helicoidal en la cabeza, y una cola en el extremo C-terminal. El dominio 401 está ubicado muy próximo al motivo YRKLLGEEESRI C-terminal (aminoácidos 405-416), asociándose con una elevada frecuencia la presencia de miocardiopatía.

Existe en la literatura otra variante descrita en el mismo dominio, la mutación p.Glu401Lys [95]. Esta variante fue reportada en 2006 [referencia] en una paciente francesa que desarrolló bloqueo auriculoventricular (BAV) avanzado a edad temprana, debilidad muscular bilateral y elevación de CPK. En el trabajo no se hace referencia a información fenotípica clínica de la miocardiopatía que presentaba la paciente ni se recogen a familiares. En este caso se produce la sustitución del aminoácido Gln por el lisina (Lys), es decir, un aminoácido polar ácido por uno polar básico.



---

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

A lo largo de la introducción se ha tratado de realizar un resumen en referencia al estado actual de la MCA, su base genética y patogenia. Como se ha recogido, algunas proteínas citoesqueléticas semejantes a la desmina, como la filamina C (*FLNC*), recientemente se han relacionado con el desarrollo de MCA. Más del 70% de las mutaciones patogénicas descritas hasta la fecha en *DES* se han asociado a la presencia de miocardiopatía, aunque generalmente como miocardiopatía dilatada ó restrictiva, y tan solo en casos puntuales o pequeñas series de casos asociadas a MCA, sin haber ninguna evidencia funcional de la vía patogénica responsable.

Nuestra hipótesis es que los pacientes afectados por la mutación p.Glu401Asp en *DES*, no descrita previamente, padecen MCA predominantemente de ventrículo izquierdo con un patrón de herencia autosómico dominante, responsable de eventos cardiovasculares mayores como MSC o insuficiencia cardíaca grave.

### Objetivos

El objetivo principal del trabajo es la demostración de la patogenicidad de la variante mencionada en desmina como causal para el desarrollo de MCA. Para ello nos apoyaremos en la descripción clínica detallada de los pacientes afectos por la variante p.Glu401Asp en desmina, su análisis de cosegregación familiar y el estudio de su repercusión a nivel histológico y funcional.

Como objetivos secundarios proponemos:

- Analizar a nivel molecular las alteraciones debidas a la mutación Glu401Asp en DES y su correlación con los hallazgos clínicos e historia natural de la enfermedad.
- Descripción minuciosa de las características mostradas en pruebas complementarias como la electrocardiografía, ecocardiografía, RM, ECG Holter de 24 horas.
- Identificar una nueva vía patogénica en la MCA.

---

# 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Evaluación clínica

Evaluación genética

Evaluación funcional

Análisis estadístico

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **A. Población de estudio**

La población de estudio del trabajo incluyó a todos los sujetos vivos y disponibles para estudio pertenecientes a una extensa familia remitidos a evaluación a una consulta monográfica especializada en cardiopatías hereditarias del Hospital Universitario Virgen de las Nieves en Granada. Se trata de una familia de etnia caucásica, española original de la provincia de Granada en la que se identificó la variante p.Glu401Asp en *DES*.

La familia consta de 83 individuos distribuidos en 6 generaciones. El trabajo incluyó a 66 sujetos disponibles para estudio y que firmaron el consentimiento informado.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local (Universidad de Granada) en marzo de 2016.

#### **B. Evaluación clínica**

Todos los sujetos fueron sometidos a una evaluación clínica inicial que incluyó una exhaustiva anamnesis recabando información acerca de la historia familiar con especial énfasis en la presencia de eventos adversos como: MSC, muerte de cualquier causa, muerte por insuficiencia cardíaca, trastornos de la conducción auriculoventricular, taquiarritmias, síncope, trasplante cardíaco o el implante de dispositivos cardíacos. Con todo ello se laboró un árbol familiar que incluyó las 6 generaciones identificadas.

Además, en todos los sujetos se realizó un minucioso examen físico, prestando especial atención a datos de afectación sugerente de miopatía esquelética. Se clasificó la capacidad

funcional por medio del sistema propuesto por la *New York Heart Association* (NYHA). En visitas sucesivas de seguimiento, se recogió información referente a la situación clínica, eventos y tratamientos [Figura 3.1].

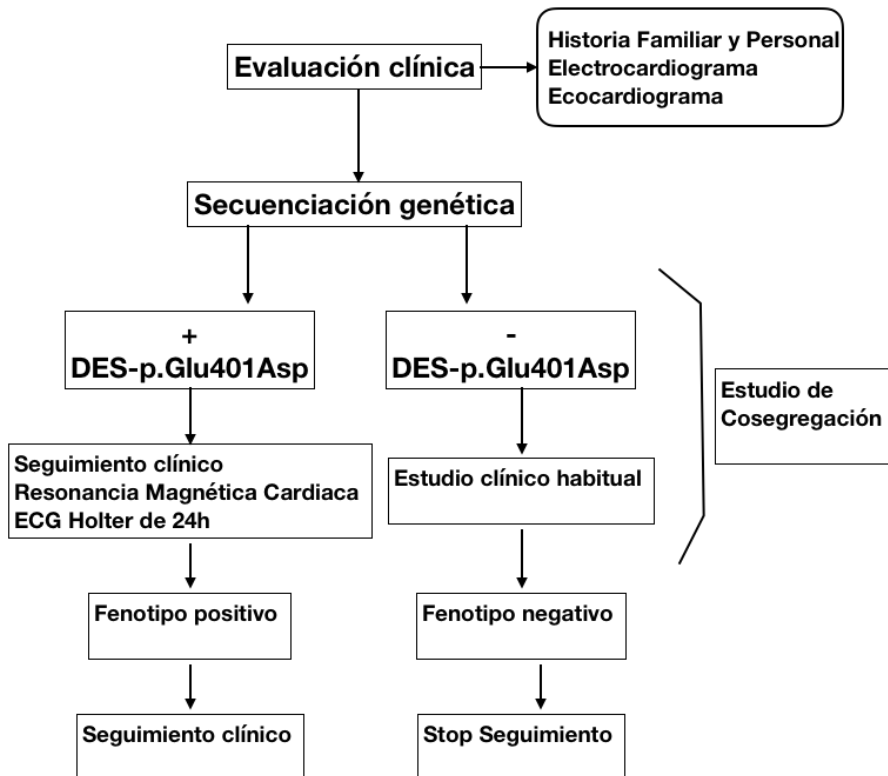


Figura 3.1 Protocolo de manejo de los individuos incluidos en el estudio.

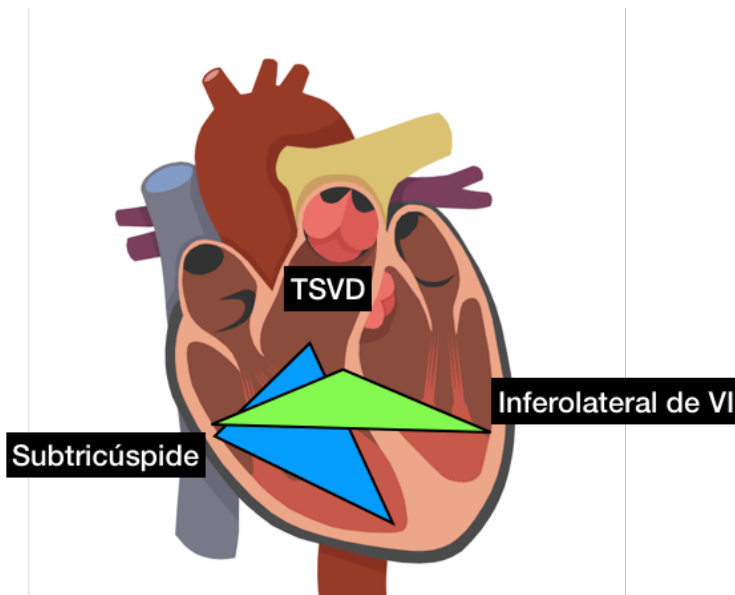
En todos los sujetos se realizó un ECG de 12 derivaciones, ecocardiografía transtorácica bidimensional (modo 2D y estudio Doppler), Holter ECG de 24 horas, un análisis sanguíneo (bioquímica con CPK, troponina ultrasensible, BNP y hemograma) y estudio genético de la variante p.Gu401Asp. En todos aquellos sujetos portadores de la mutación en desmina se realizó una RM cardíaca, excepto en aquellos que rechazaron el procedimiento o presentaban alguna contraindicación (dispositivo cardíaco implantable no compatible con RM o claustrofobia).

El electrocardiograma es fundamental en el diagnóstico de la MCA. Múltiples parámetros electrocardiográficos forman parte de los criterios diagnósticos actuales de MCA. Las variables evaluadas de los ECGs fueron el ritmo presente, los intervalos PR, QRS, QT (medidos en milisegundos), amplitud del voltaje del QRS, trastornos de conducción auriculoventricular o intraventricular, onda epsilon y presencia de ondas Q. En cuanto a las alteraciones de la repolarización, se evaluó con especial empeño la presencia de inversión de la onda T, especialmente el número y localización (inferior, inferolateral, anterolateral, precordiales derechas (V1-V3), precordiales izquierdas (V4-V6)). Respecto a los Holter ECG de 24 horas se analizaron la presencia de taquicardias ventriculares no sostenidas, de trastornos de la conducción auriculoventricular y la extrasistolia ventricular (morfología y densidad), así como arritmias supraventriculares y presencia de fibrilación auricular. Todos estos parámetros fueron evaluados por electrofisiólogos experimentados.

Por otra parte, modalidades de imagen cardiovascular como la ecocardiografía y la RM juegan un papel determinante en los criterios diagnósticos actuales de MCA. Aunque la RM es cada vez más empleada de forma rutinaria en todo el mundo, la ecocardiografía es una técnica de primera línea y fundamental en el seguimiento clínico de los pacientes afectados por su carácter no invasivo, barato y disponibilidad. Son bien conocidas las alteraciones clásicas estructurales y funcionales del ventrículo derecho mediante ecocardiograma [96;97] y RM cardiaca [98]. Mediante ecocardiografía se evaluaron la presencia de trastornos segmentarios de la contractilidad ventricular o adelgazamiento miocárdico, diámetro del tracto de salida de ventrículo derecho, diámetros y volúmenes ventriculares, función ventricular sistólica



(derecha: excursión sistólica del anillo tricuspídeo, fracción de acortamiento; izquierda: Simpson biplano). Todos los análisis cuantitativos y cualitativos se realizaron según las guías de práctica clínica actuales [99]. Este análisis incluyó el análisis del ventrículo izquierdo (trastornos segmentarios de la contractilidad ventricular en la cara inferolateral, diámetros y volúmenes ventriculares y función sistólica ventricular), debido a la frecuente identificación de afectación del ventrículo izquierdo en todas las fases de la enfermedad, así como su implicación pronóstica [100;101] [Figura 3.2].



**Figura 3.2. Triángulo de la displasia.** En azul se representa el triángulo de la displasia clásico (tracto de salida de vd, región subtricuspídea y ápex de ventrículo derecho). En verde se representa el triángulo de la displasia con afectación de la pared posterolateral de ventrículo izquierdo. TSVD: tracto de salida de ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo.

Muchas de las alteraciones estructurales descritas en el ecocardiograma pueden ser sutiles y pasar desapercibidas en el ecocardiograma bidimensional [102]. Sin embargo, la RM cardiaca es una excelente herramienta para la identificación precoz de la enfermedad, con una sensibilidad cercana al 100%, además de

aportar importante información pronóstica [103;104]. La evaluación mediante RM incluyó la valoración de alteraciones segmentarias de la contractilidad ventricular, la función sistólica, diámetros y volúmenes ventriculares, así como el depósito de grasa intramiocárdica, inflamación de la pared ventricular y fibrosis. La cicatriz (fibrosis) secundaria a la infiltración fibroadiposa se evaluó con el análisis del RPG. Se ha podido comprobar la correspondencia de este RPG con la infiltración fibroadiposa en la histopatología, así como su valor para predecir la aparición de arritmias ventriculares [24].

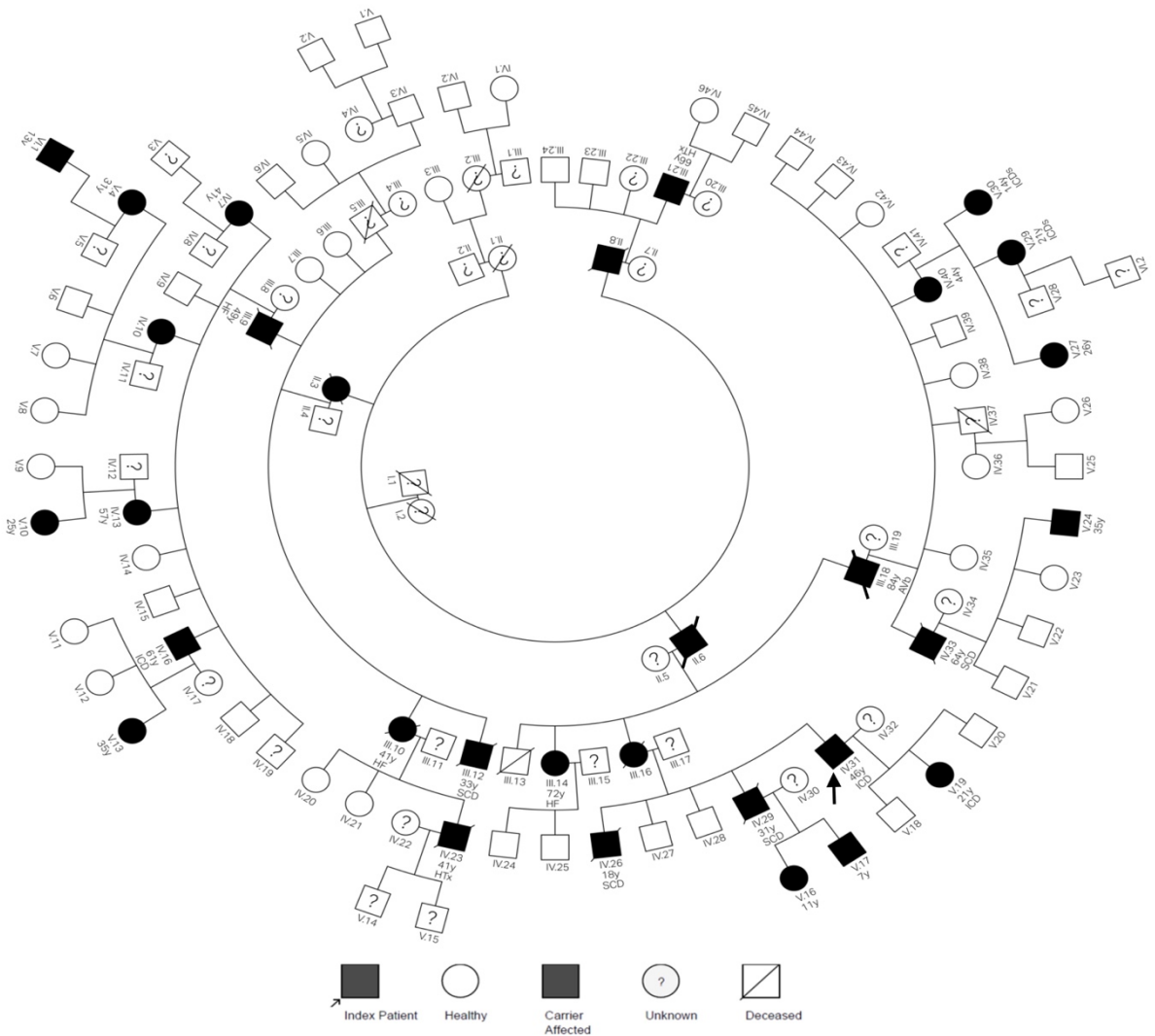
Los estudios de RM se realizaron con un hardware de 1.5-Tesla (GE®), tras la firma del consentimiento informado y la comprobación de la ausencia de contraindicaciones para la realización del procedimiento. Se obtuvieron secuencias según protocolos previamente descritos [98]. Se incluyeron imágenes de eje corto, 2 cámaras, 4 cámaras, 3 cámaras y tracto de salida de ventrículo derecho). Posteriormente, para la realización de las secuencias de RPG, se administraron 0.1-0.2 mmol/kg de gadolinio quelado (Gadovist®). Las imágenes fueron analizadas con el software semi-automático (Reportcard®).

Dada el creciente reconocimiento de distintos patrones de RPG en miocardiopatías (dilatada, hipertrófica,...etc) y su potencial pronóstico, se analizaron la presencia o no del mismo, así como su localización (ventrículo derecho, izquierdo o ambos) y distribución (región ventricular y estrato miocárdico). Con el objetivo concreto de evaluar la existencia de un patrón específico de retención patológica de gadolinio en los pacientes con desminopatía pertenecientes a esta familia, se utilizó un grupo control de pacientes con MCA y otros

genotipos, en los que se hubiera realizado una RM. Estos pacientes fueron seleccionados de una cohorte de pacientes con MCA en seguimiento en esta misma consulta monográfica. Además de la presencia, distribución y localización de la RPG, se evaluaron parámetros funcionales y estructurales biventriculares.

Todos los estudios de ecocardiografía y RM fueron realizados y analizados por especialistas experimentados en el área de la imagen cardiovascular.

El manejo clínico se realizó de forma individualizada y en todos los pacientes se realizó una estimación del riesgo de eventos adversos, especialmente de MSC según las recomendaciones actuales [46]. El diagnóstico del probando (sujeto IV.31 del pedigrí familiar, Figura 3.3) se realizó de acuerdo a los criterios diagnósticos actualmente vigentes [35]. La penetrancia de la enfermedad fue determinada en base a criterios electrocardiográficos y estructurales, siendo catalogados como sujetos sanos aquellos que no presentaban ninguna alteración eléctrica o estructural.



**Figura 3.3. Pedigrí familiar.** Los cuadrados y círculos representan a hombres y mujeres, respectivamente. Los portadores de la mutación están marcados en negro, los no portadores en blanco y aquellos no estudiados están señalados con el signo (?). →: probando. Los fallecidos están marcados con una línea. HF: insuficiencia cardiaca; HTx: trasplante cardiaco; ICD: desfibrilador automático implantable; ICDS: desfibrilador automático subcutáneo; SCD: muerte súbita cardiaca; VT: taquicardia ventricular.

Como limitación en esta sección hay que resaltar la imposibilidad de obtener información clínica completa de aquellos pacientes fallecidos o sometidos a trasplante cardiaco de forma previa al comienzo de este estudio. Además, la información relativa

a los sujetos menores de 13 años de edad se ha omitido debido a que en este grupo de edad los criterios diagnósticos no son aplicables, así como es anecdótica que la enfermedad tenga expresión eléctrica o estructural.

### C. Evaluación genética

En el probando (IV.31) se obtuvo una muestra de sangre periférica de la que se obtuvo ADN y se realizó un análisis genético empleando un panel de *next-generation-sequencing* (NGS) que evaluaba 149 genes previamente relacionados (o candidatos) con el desarrollo de miocardiopatías hereditarias [Tabla 3.1] incluyendo los exones y las regiones intrónicas flanqueantes.

**TABLA 3.1. LISTADO DE GENES INCLUIDOS EN PANEL DE NGS**

Genes analizados			
<b>AARS2</b>	alanyl-tRNA synthetase	<b>ABCC9</b>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
<b>ACAD9</b>	Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 9	<b>ACADVL</b>	Acyl-CoA Dehydrogenase Very Long Chain
<b>ACTA1</b>	Alpha-Actin-1	<b>ACTA2</b>	Alpha-Actin-2
<b>ACTC1</b>	Actin, alpha cardiac muscle 1	<b>ACTN2</b>	Alpha-Actinin-2
<b>AGK</b>	Acylglycerol Kinase	<b>AGL</b>	Amylo-Alpha-1, 6-Glucosidase, 4-Alpha-

			Glucanotransferase
<b>AGPAT2</b>	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 2	<b>ALMS1</b>	Alstrom Syndrome Protein 1
<b>ANK2</b>	Ankyrin 2, neuronal	<b>COX6B1</b>	Cytochrome C Oxidase Subunit 6B1
<b>ANKRD1</b>	Ankyrin Repeat Domain 1	<b>ATPAF2</b>	ATP Synthase Mitochondrial F1 Complex Assembly Factor 2
<b>BAG3</b>	BCL2 Associated Athanogene 3	<b>BRAF</b>	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
<b>BSCL2</b>	Seipin Lipid Droplet Biogenesis Associated	<b>CALR3</b>	Calreticulin 3
<b>CASQ2</b>	Calsequestrin 2	<b>CAV3</b>	Caveolin 3
<b>CBL</b>	Cbl Proto-Oncogene	<b>COQ2</b>	Coenzyme Q2, Polyprenyltransferase
<b>COX15</b>	COX15, Cytochrome C Oxidase Assembly Homolog	<b>CRELD1</b>	CRELD1
<b>CRYAB</b>	Crystallin Alpha B	<b>CSRP3</b>	Cysteine And Glycine Rich Protein 3
<b>CTF1</b>	Cardiotrophin 1	<b>CTNNA3</b>	Catenin Alpha 3
<b>DES</b>	Desmin	<b>DLD</b>	Dihydrolipoamide Dehydrogenase
<b>DMD</b>	Dystrophin	<b>DNAJC19</b>	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C19
<b>DOLK</b>	Dolichol Kinase	<b>DSC2</b>	Desmocollin 2
<b>DSG2</b>	Desmoglein 2	<b>DSP</b>	Desmoplakin
<b>DTNA</b>	Dystrobrevin Alpha	<b>ELN</b>	Elastin
<b>EMD</b>	Emerin	<b>EYA4</b>	EYA Transcriptional Coactivator And Phosphatase 4

<b>FAH</b>	Fumarylacetoacetate Hydrolase	<b>FHL1</b>	Four And A Half LIM Domains 1
<b>FHL2</b>	Four And A Half LIM Domains 2	<b>FHOD3</b>	Formin Homology 2 Domain Containing 3
<b>FKRP</b>	Fukutin Related Protein	<b>FKTN</b>	Fukutin
<b>FLNA</b>	Filamin A	<b>FLNA</b>	Filamin C
<b>FOXD4</b>	Forkhead Box D4	<b>GAA</b>	Glucosidase Alpha, Acid
<b>GATA4</b>	GATA Binding Protein 4	<b>GATA6</b>	GATA Binding Protein 6
<b>GATAD1</b>	GATA Zinc Finger Domain Containing 1	<b>GFM1</b>	G Elongation Factor Mitochondrial 1
<b>GJA1</b>	Gap Junction Protein Alpha 1	<b>GJA5</b>	Gap Junction Protein Alpha 5
<b>GLA</b>	Galactosidase Alpha	<b>GLB1</b>	Galactosidase Beta 1
<b>GNPTAB</b>	N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase Alpha And Beta Subunits	<b>GUSB</b>	Glucuronidase Beta
<b>HCN4</b>	Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 4	<b>HFE</b>	Hemochromatosis
<b>HRAS</b>	HRas Proto-Oncogene, GTPase	<b>JAG1</b>	Jagged 1
<b>JPH2</b>	Junctophilin 2	<b>JUP</b>	Plakoglobin
<b>KCNH2</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2	<b>KCNJ2</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2
<b>KCNJ8</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 8	<b>KCNQ1</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1

<b>KLF10</b>	Kruppel Like Factor 10	<b>KRAS</b>	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
<b>LAMA2</b>	Laminin Subunit Alpha 2	<b>LAMA4</b>	Laminin Subunit Alpha 4
<b>LAMP2</b>	Lysosomal Associated Membrane Protein 2	<b>LDB3</b>	LIM Domain Binding 3
<b>LIAS</b>	Lipoic Acid Synthetase	<b>LMNA</b>	Lamin A/C
<b>MAP2K1</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1	<b>MAP2K2</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2
<b>MIB1</b>	Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 1	<b>MLYCD</b>	Malonyl-CoA Decarboxylase
<b>MRPL3</b>	Mitochondrial ribosomal protein L3	<b>MRPS22</b>	Mitochondrial Ribosomal Protein S22
<b>MTO1</b>	Mitochondrial TRNA Translation Optimization 1	<b>MURC</b>	Caveolae Associated Protein 4
<b>MYPBC3</b>	Myosin Binding Protein C, Cardiac	<b>MYH11</b>	Myosin Heavy Chain 11
<b>MYH6</b>	Myosin Heavy Chain 6	<b>MYH7</b>	Myosin Heavy Chain 7
<b>MYL2</b>	Myosin Light Chain 2	<b>MYL3</b>	Myosin Light Chain 3
<b>MYLK2</b>	Myosin Light Chain Kinase 2	<b>MYOT</b>	Myotilin
<b>MYOZ2</b>	Myozenin 2	<b>MYPN</b>	Myopalladin
<b>NEBL</b>	Nebulette	<b>NEXN</b>	Nexilin F-Actin Binding Protein
<b>NXK2-5</b>	NK2 Homeobox 5	<b>NOTCH1</b>	Translocation-Associated Notch Protein TAN-1
<b>NRAS</b>	NRAS Proto-Oncogene, GTPase	<b>OBSL1</b>	Obscurin Like 1
<b>PDHA1</b>	Pyruvate Dehydrogenase E1 Alpha 1 Subunit	<b>PDLIM3</b>	PDZ And LIM Domain 3



<b>PHKA1</b>	Phosphorylase Kinase Regulatory Subunit Alpha 1	<b>PITX2</b>	Paired Like Homeodomain 2
<b>PKP2</b>	Placophilin 2	<b>PLN</b>	Phospholamban
<b>PMM2</b>	Phosphomannomutase 2	<b>PRDM16</b>	PR/SET Domain 16
<b>PRKAG2</b>	Protein Kinase AMP-Activated Non-Catalytic Subunit Gamma 2	<b>PSEN1</b>	Presenilin 1
<b>PSEN2</b>	Presenilin 2	<b>PTPN11</b>	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11
<b>RAF1</b>	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	<b>RBM20</b>	RNA Binding Motif Protein 20
<b>RYR2</b>	Ryanodine Receptor 2	<b>SCN5A</b>	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5
<b>SGCA</b>	Sarcoglycan Alpha	<b>SGCB</b>	Sarcoglycan Beta
<b>SGCD</b>	Sarcoglycan Delta	<b>SHOC2</b>	SHOC2, Leucine Rich Repeat Scaffold Protein
<b>SLC22A5</b>	Solute Carrier Family 22 Member 5	<b>SLC25A4</b>	Solute Carrier Family 25 Member 4
<b>SMAD3</b>	SMAD Family Member 3	<b>SOS1</b>	SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
<b>SPRED1</b>	Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1	<b>SURF1</b>	SURF1, Cytochrome C Oxidase Assembly Factor
<b>TAZ</b>	Tafazzin	<b>TBX1</b>	T-Box 1
<b>TBX20</b>	T-Box 20	<b>TBX5</b>	T-Box 5
<b>TCAP</b>	Titin-Cap	<b>TGFβ3</b>	Transforming Growth Factor Beta 3
<b>TMEM43</b>	Transmembrane Protein 43	<b>TMEM70</b>	Transmembrane Protein 70
<b>TMPO</b>	Thymopoietin	<b>TNNC1</b>	Troponin C1, Slow Skeletal And Cardiac Type
<b>TNNI3</b>	Troponin I3, Cardiac Type	<b>TNNT2</b>	Troponin T2, Cardiac Type

<b>TPM1</b>	Tropomyosin 1	<b>TRIM63</b>	Tripartite Motif Containing 63
<b>TSFM</b>	Ts Translation Elongation Factor, Mitochondrial	<b>TTN</b>	Titin
<b>TTR</b>	Transthyretin	<b>TXNRD2</b>	Thioredoxin Reductase 2
<b>VCL</b>	Vinculin		

La preparación de la muestra se llevó a cabo utilizando el *SureSelect Target Enrichment Kit* de Illumina para el método de secuenciación *paired end multiplexed* (Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las regiones de interés fueron capturadas utilizando una librería de sondas personalizadas. Las regiones de baja cobertura de los genes relevantes fueron re-secuenciadas por el método de Sanger. El análisis bioinformático se realizó a través de un pipeline personalizado que incluye software como NovoAlign, SAMtools, etc. Se añadió información como la frecuencia en diferentes poblaciones (incluyendo EVS, 1K genomes, dbSNP, ...), y varias predicciones bioinformáticas. La patogenicidad de las variantes identificadas se clasificó de acuerdo con las recomendaciones actuales de la *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) [105].

Tras la identificación de la mutación *DES-p.Glu401Asp* en el caso índice, se realizó un estudio genético y clínico en todos los familiares disponibles para estudio.

## **D. Evaluación funcional**

### **I. Análisis histológico**

El paciente III.21 (Figura 3.3) portador de la variante DES-p.Glu401Asp fue sometido a un trasplante cardiaco, pudieron obtenerse muestras de tejido miocárdico y ser analizadas a nivel histológico. Como control se usó tejido miocárdico de otro paciente no portador de la variante y sin evidencia de miocardiopatía y fallecido por otra causa.

Ambos tejidos fueron fijados durante 24 horas en formaldehído tamponado al 10%, posteriormente se lavaron y finalmente se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Posteriormente fueron manipulados con xileno y embebidos en parafina según protocolos previamente descritos [106]. Se emplearon tinciones de hematoxilina-eosina para el análisis morfológico sobre secciones de tejido desparafinado de 5  $\mu$ m de grosor. El tejido conjuntivo o estroma, formado en su mayoría por fibras de colágeno, se analizó mediante la tinción picrosirius [107]. La tinción con hematoxilina férrica de Heidenhain se empleó para evaluar la organización de las miofibrillas en los cardiomiocitos [108].

El patrón de distribución de los filamentos intermedios de desmina se evaluó mediante técnicas de inmunohistoquímica indirecta. Los desmosomas y las uniones intercelulares (discos intercalares, uniones gap) se identificaron mediante una tinción inmunohistoquímica de la desmoplaquina, placoglobina y conexina-43, respectivamente, según protocolos previos usando un control [106-109]. Los anticuerpos empleados en los distintos procedimientos se recogen en la tabla 3.2. Todos los procedimientos

fueron llevados a cabo simultáneamente bajo las mismas condiciones para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

**TABLA 2.2. ANTICUERPOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO**

Anticuerpos	Pretratamiento	Dilución Tiempo de incubación	Referencia
<b>Rabbit monoclonal anti-desmin, clone Y66</b>	Buffer EDTA pH8 25 min a 95°C.	1:75 PBS+tween20 Durante la noche a 4°C	Abcam: Cat. No: ab32362
<b>Mouse monoclonal anti-Desmoplakin, clone DPI/II 236.23.1</b>	Buffer citrate pH6 25 min a 95°C.	Listo para usar 1 h r/t	Acris Antibodies: Cat.no: AM09122SU-N
<b>Mouse monoclonal anti-plakoglobin, clone PG 5.1</b>	Buffer citrato pH6 25 min a 95°C.	1:25 PBS+tween20 1 h r/t	Acris Antibodies: Cat. no: BM5100
<b>Rabbit polyclonal Anti-connexin 43/GJA1</b>	Buffer citrato pH6 25 min a 95°C.	1:5000 PBS+tween20 1 h 1 h r/t	Abcam: Cat. No: ab11370
<b>Immpress anti-mouse IgG (peroxidasa)</b>	-	Listo para usar 30 min.	Vector Laboratories Cat. no.: MP 7402
<b>Immpress anti-rabbit IgG (peroxidasa)</b>	-	Listo para usar 30 min.	Vector Laboratories: Cat. No.: MP-7401

## II. Diferenciación y cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Para evaluar el impacto de la mutación *DES-p.Glu401Asp* en la función celular, se obtuvieron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo (CMTA) mediante la biopsia de tejido adiposo subcutáneo abdominal de tres miembros de la familia evaluada en este trabajo [Figuras 3.4 y 3.5]. Se escogió a 1 familiar sano y no portador de la mutación de la desmina (control sano) y 2 pacientes portadores de la mutación. De entre los portadores, uno de ellos presentaba un fenotipo leve, mientras que el otro presentaba una expresión clínica más avanzada de la enfermedad. La obtención de las muestras consistió en la extracción de una biopsia de piel de 5mm de profundidad y 8mm de diámetro de la zona abdominal. La extracción se realizó en una sola ocasión, por el personal sanitario cualificado para dicha tarea. Este procedimiento está prácticamente exento de riesgos. A continuación se recoge el protocolo llevado a cabo para la obtención de la biopsia de grasa subcutánea abdominal:

### Protocolo de obtención de la biopsia

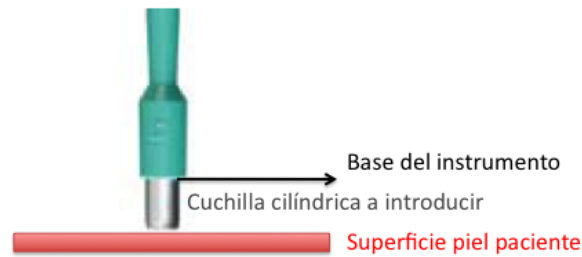
Se realizará en las condiciones lo más asépticas posible y siempre tratando el tejido con el máximo cuidado. Los pasos a seguir son, de forma resumida, los siguientes:

1. Limpiar la piel a biopsiar con Clorhexidina
2. Colocación de paño estéril
3. Aplicación de anestésico local según criterio médico (mupivacaína 2%).
4. Cortar el trozo de piel con un *biopsy punch* de 8mm. Poner especial cuidado en no perder la el tejido celular

subcutáneo.

5. Cerrar la herida según criterio médico (sutura).

6. Meter la muestra en tubo con medio de transporte para el envío al investigador.



**Figura 3.4. Representación del procedimiento de obtención de biopsia de tejido graso subcutáneo abdominal.**

Inicialmente las biopsias fueron fragmentadas mecánicamente en pequeñas porciones y procesadas durante 8 horas en una solución de 2mg/mL de colagenasa de *Clostridium histolyticum* tipo I (Gibco BRL Life Technologies) según protocolos previamente descritos [106]. A continuación, el material fue centrifugado y las CMTAs fueron seleccionadas y cultivadas en un medio artificial basal de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Se trata de un medio que no contiene proteínas o agentes que promuevan el crecimiento. Como suele ser común, se suplementó con un 10% de suero fetal bovino (SFB), antibióticos y antimicóticos (Sigma-Aldrich). Tras establecer el cultivo celular, las CMTAs fueron diferenciadas *ex vivo* hacia cardiomiocitos empleando el *Gibco Cardiomyocyte Differentiation Kit* (A29212-01, Thermo Fisher Scientific®), durante 14 días de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

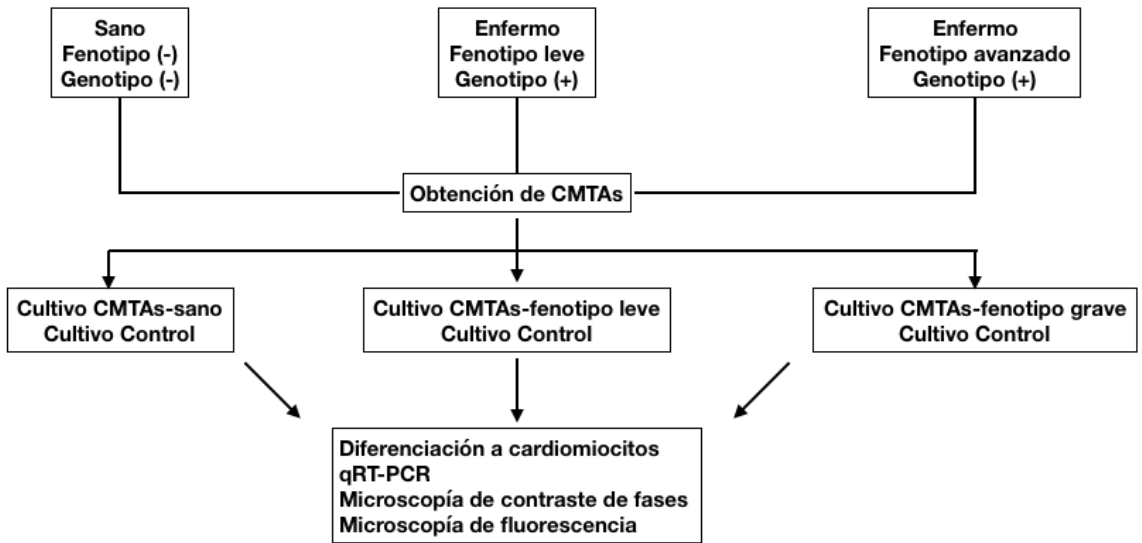


Figura 3.5. Esquema que representa el procedimiento de obtención y manipulación de las de células madre mesenquimales de tejido adiposo subcutáneo. CMTAs: células madre mesenquimales de tejido adiposo subcutáneo; qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

El patrón de crecimiento y el proceso de diferenciación de estas células fue monitorizado continuamente por microscopía de contraste de fases. Se confirmó la diferenciación a cardiomiocito humano mediante el uso del *Human Cardiomyocyte Immunocytochemistry Kit* (A25973, Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante.

### III. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR).

La extracción del ARN total (ARN ribosomal, ARN transferencia, ARN mensajero, microARNs) es un método por el que mediante la separación de polímeros de ARN se obtiene el ARN como paso previo para estudiar los ARN mensajeros y así conocer

la expresión génica en una enfermedad o condición de interés.

En nuestro caso el ARN total fue obtenido de cada uno de los diferentes cultivos celulares empleando el kit *Qiagen RNeasy Mini Kit system* (Qiagen). Usando el ARN total, se sintetizó el DNA complementario (ADNc; hebra de ADN de doble cadena que constituye una secuencia complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado) con un *iScript Advanced cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories), que requiere 1 µg de cada RNA.

Se realizó la cuantificación de la expresión de un grupo de genes que tienen especial relevancia en la diferenciación y función celular cardíaca [Tabla 3.3]. Para ello se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Por tanto, se usó una placa de 96 pocillos que contenían oligonucleótidos de estos genes y controles seleccionados como primers para la realización de la qRT-PCR. La selección de estos genes se fundamentó en dos paneles previamente diseñados que recogen diferentes genes ya relacionados con trastornos cardíacos hereditarios: *Cardiac Arrhythmia Next-Generation Sequencing Multi- Gene Panel* y *Bio-Rad Arrhythmias Cardiac H96 Panel*.

Para cada una de las qRT-PCR se emplearon 2 µL de ADNc, 8 µL de H<sub>2</sub>O, y 10 µL de *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix*. El protocolo de la qRT-PCR consistió en 40 ciclos de amplificación y una temperatura de alineamiento de 60°C usando un sistema Bio-Rad CFX Connect-96. Los resultados se corrigieron de acuerdo con la eficiencia de la reacción de transcripción inversa y se normalizaron a la expresión génica del GAPDH usando el



software Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Cada muestra fue analizada por triplicado (n=18). La expresión relativa de genes fue calculada para cada gen usando el valor  $\Delta\Delta Cq$  (CFX Manager 3.1 software, Bio-Rad) comparando cada cultivo diferenciado respecto a su control no diferenciado.

Usando este método obtenemos el cambio en el incremento o decremento de la expresión de cada gen en las tres muestras, analizadas como expresión promedio en células diferenciadas dividido la expresión promedio en las células no diferenciadas. Los valores obtenidos del control sin la mutación se consideraron los niveles normales para cada gen, mientras que los cambios obtenidos para las muestras celulares con la mutación se compararon con los niveles basales. Finalmente se recogieron aquellos genes que mostraron un incremento o descenso en su expresión en al menos el doble respecto a los niveles basales.

**TABLA 3.3. GENES EVALUADOS EN LA qRT-PCR**

GEN		GEN	
<b>ABCC9</b>	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 9	<b>ACTN1</b>	Actinin Alpha 1
<b>ACTR1A</b>	ARP1 Actin Related Protein 1 Homolog A	<b>AFAP1</b>	Actin Filament Associated Protein 1
<b>AKAP9</b>	A-Kinase Anchoring Protein 9	<b>ANK2</b>	Ankyrin 2
<b>ATP2A2</b>	ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> Transporting 2	<b>ATP2B4</b>	ATPase Plasma Membrane Ca <sup>2+</sup> Transporting 4
<b>CACNA1C</b>	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C	<b>CACNA1D</b>	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D

<b>CACNA1G</b>	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G	<b>CACNA2D1</b>	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2delta 1
<b>CACNB2</b>	Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 2	<b>CALD1</b>	Caldesmon 1
<b>CALM1</b>	Calmodulin 1	<b>CALM2</b>	Calmodulin 2
<b>CALM3</b>	Calmodulin 3	<b>CAV3</b>	Caveolin 3
<b>CCNA1</b>	Cyclin A1	<b>CD36</b>	CD36 Molecule
<b>DES</b>	Desmin	<b>DSP</b>	Desmoplakin
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	<b>GJA1</b>	Gap Junction Protein Alpha 1
<b>GJA5</b>	Gap Junction Protein Alpha 5	<b>GPD1L</b>	Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like
<b>HAND2</b>	Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2	<b>ITGA2</b>	Integrin Subunit Alpha 2
<b>ITGA7</b>	Integrin Subunit Alpha 7	<b>JUP</b>	Junction Plakoglobin
<b>KCNA5</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member 5	<b>KCNE1</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 1
<b>VIM</b>	Vimentin	<b>KCNE2</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 2
<b>KCNE3</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 3	<b>KCNH2</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2
<b>KCNJ2</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2	<b>KCNJ8</b>	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 8
<b>KRT18</b>	Keratin 18	<b>KRT8</b>	Keratin 8
<b>LAMA1</b>	Laminin Subunit Alpha 1	<b>LAMA2</b>	Laminin Subunit Alpha 2

<b>LAMA3</b>	Laminin Subunit Alpha 3	<b>LAMA5</b>	Laminin Subunit Alpha 5
<b>LAMB1</b>	Laminin Subunit Beta 1	<b>LAMB3</b>	Laminin Subunit Beta 3
<b>LAMC2</b>	Laminin Subunit Gamma 2	<b>LAMC3</b>	Laminin Subunit Gamma 3
<b>LAMP2</b>	Lysosomal Associated Membrane Protein 2	<b>LMNA</b>	Lamin A/C
<b>MST1R</b>	Macrophage Stimulating 1 Receptor	<b>NKX2-5</b>	NK2 Homeobox 5
<b>NPPA</b>	Natriuretic Peptide A	<b>NTN1</b>	Netrin 1
<b>PLP1</b>	Proteolipid Protein 1	<b>PRKAG2</b>	Protein Kinase AMP-Activated Non-Catalytic Subunit Gamma 2
<b>RANGRF</b>	RAN Guanine Nucleotide Release Factor	<b>SCN1B</b>	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 1
<b>SCN3B</b>	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 3	<b>SCN4B</b>	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 4
<b>SNTA1</b>	Syntrophin Alpha 1	<b>TGFB1</b>	Transforming Growth Factor Beta 1
<b>THY1</b>	Thy-1 Cell Surface Antigen	<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNNT2</b>	Troponin T2, Cardiac Type	<b>TRPM4</b>	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 4
<b>TUBA1A</b>	Tubulin Alpha 1a	<b>TUBA3C</b>	Tubulin Alpha 3c
<b>TUBA4A</b>	Tubulin Alpha 4a	<b>TUBB3</b>	Tubulin Beta 3 Class III

#### **IV. Plásmidos, cultivo celular y microscopía confocal.**

En trabajos previos se ha descrito la expresión del plásmido *pmRuby-N1-Desmin* [110]. Empleando este plásmido se pretendió realizar una construcción que codificara una proteína de fusión C-terminal de desmina humana y la proteína de fluorescencia *mRuby* que se ha usado en trabajos de microscopía de fluorescencia directa previamente. Las variantes en *DES*-p.Glu401Asp y p.Glu401Lys se introdujeron usando el sistema *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (210518, Agilent Technologies). La adecuada inserción de estas variantes se confirmó posteriormente mediante secuenciación Sanger (Macrogen).

Para el cultivo celular se emplearon cultivos celulares *in vitro* de células de carcinoma de suprarrenal humano (línea humana SW13). Se optó por este tipo de células porque no expresan desmina endógena ni ningún tipo de filamento intermedio citoplasmático. Las células se cultivaron en el medio DMEM (Gibco; 4.5 g/L glucosa, 10% SBF, penicilina y estreptomycin) con una confluencia del  $\approx 70\%$  en el cubreobjetos. Posteriormente las células fueron transitoriamente transfectadas con *Lipofectamine 2000* (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Tras 24 horas de la transfección, las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) varias veces durante 5 minutos, y finalmente fueron fijadas con *Roti Histofix* (Carl Roth). A continuación, fueron lavadas de nuevo en PBS y permeabilizadas mediante *Triton X-100* (0.1% en PBS).

Se usó una tinción de conjugado de fluoresceína isothiocianato y faloidina (Sigma-Aldrich) 50  $\mu\text{g/mL}$  durante 40

minutos a temperatura ambiente según las instrucciones del fabricante para identificar a la alfa actina. Las células fueron depositadas en *Mowiol 4-88* (Carl Roth). Para la microscopía confocal laser se usó el sistema *TCS SP8* (Leica Microsystems) equipado con un objetivo de glicerina HC PL API C52 (63× /1.30), detectores híbridos y el software *Application Suite X*. Cada uno de estos procedimientos sobre cada cultivo celular fue realizado por triplicado.

### **E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó usando el software SPSS Statistics (version 20, IBM Corp). Todos los datos categóricos fueron descritos como frecuencias y porcentajes, mientras que las variables continuas fueron expresadas como valor medio±desviación estándar para cada una de las medidas. Las características clínicas fueron comparadas usando el test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) test exacto de Fisher en las variables categóricas y la *t* de Student o la *U* de Mann-Whitney para las variables continuas. Un valor de *P* de <0.05 se consideró estadísticamente significativo. El análisis de supervivencia fue realizado usando el método de Kaplan-Meier.



---

## 4. RESULTADOS

Caracterización clínica del caso índice

Resultado del estudio genético

Fenotipo de los pacientes portadores de la mutación Glu401Asp en *DES*. Estudio de cosegregación, supervivencia y eventos desfavorables.

Caracterización tisular mediante resonancia magnética cardiaca: descripción de un patrón de retención patológica de gadolinio específico.

Análisis funcional: Análisis histológico, Estudio de células madre mesenquimales y qRT-PCR, y Estudio de plásmidos y microscopía confocal





#### 4. **RESULTADOS.**

Ver ANEXO I.

##### A. **Caracterización clínica del caso índice**

El paciente índice o probando, un varón de 46 años de edad (IV:31, Figura 3.3), fue atendido en la consulta monográfica de cardiopatías hereditarias del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. El probando tenía una historia familiar positiva de MSC en dos hermanos varones de 31 (IV:29) y 18 años (IV:26) mientras se encontraban en reposo y practicando deporte, respectivamente. En nuestro caso dispusimos del estudio necrópsico del sujeto IV.29 de la familia:

- **Estudio Macroscópico cardiaco**

En esta exploración se describió la presencia de tejido fibroso en el epicardio y mesocardio de la pared lateral e inferior del ventrículo izquierdo y hacia el septo interventricular. Por otra parte, el ventrículo derecho presentaba una apariencia macroscópica normal. A pesar de la edad del sujeto, próxima a los 35 años de edad, no se identificó ningún signo de aterosclerosis coronaria relevante.

- **Estudio microscópico cardiaco**

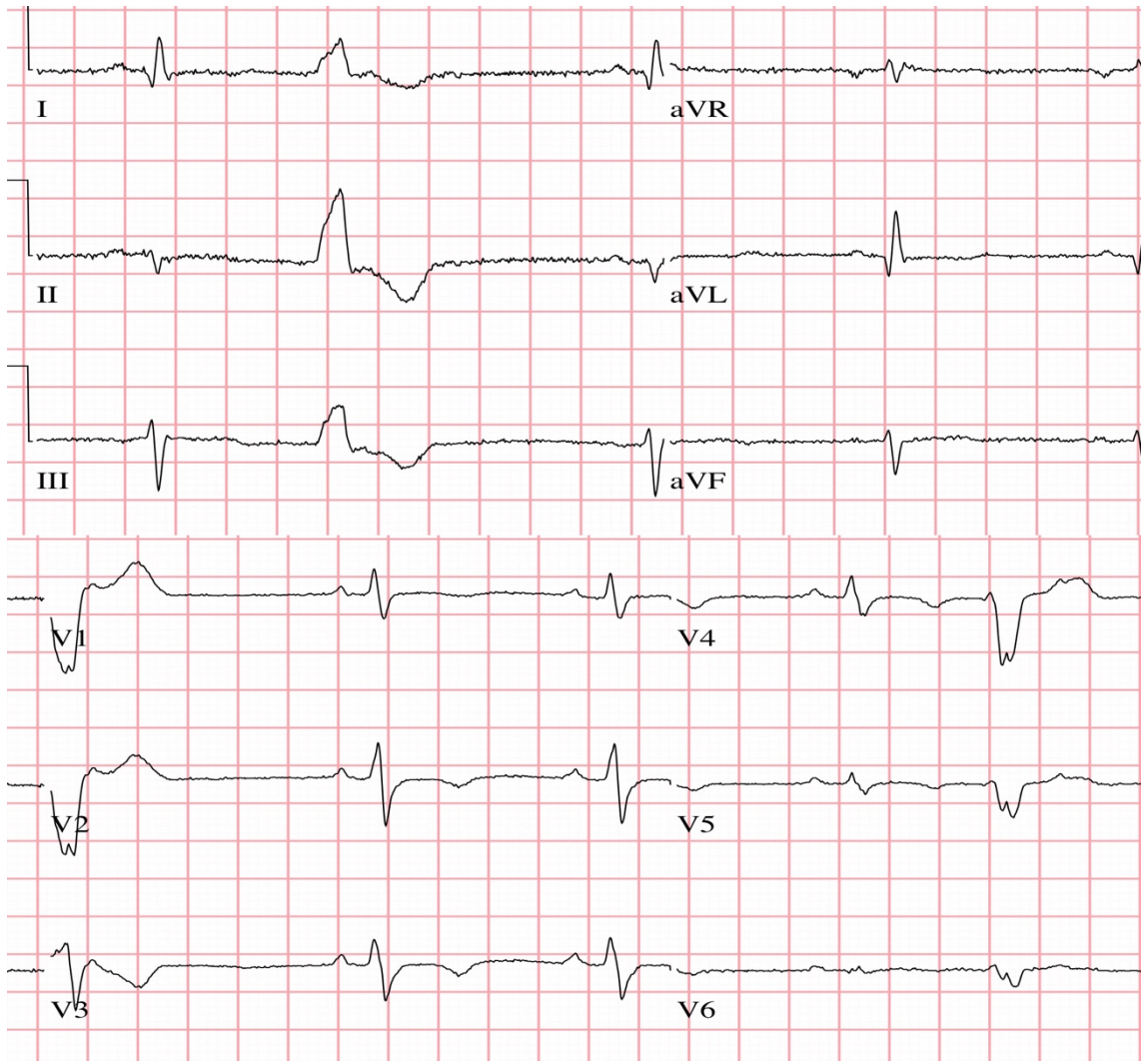
A nivel histológico se pudieron identificar focos de fibrosis subendocárdica en la pared libre del ventrículo derecho, que no cuentan con relevancia clínica. En cuanto al ventrículo izquierdo, se identificó tejido fibroadiposo en los estratos subepicárdicos y

mesocárdicos. Este tejido se presentaba distribuido dejando grandes espacios junto a miocitos en distintos estados de degeneración. Por otra parte, no se constataron focos de inflamación miocárdica.

Finalmente, además del análisis minucioso del corazón, la necropsia completa del sujeto no describió hallazgos patológicos como necrosis atrofia de miofibrillas, sugerentes de miopatía esquelética.

En conclusión, el estudio postmortem del sujeto IV.29, hermano de nuestro caso índice fue diagnóstico de una MCA de predominio en ventrículo izquierdo.

En el momento de la primera evaluación, el paciente índice (IV:31) presentaba disnea de esfuerzo compatible con una clase funcional de la NYHA grado II/IV. El estudio con ECG de 12 derivaciones mostró ritmo sinusal a una frecuencia cardiaca normal, bajos voltajes generalizados, inversión de la onda T en todas las derivaciones precordiales, y onda Q patológica en cara lateral [Figura 4.1].

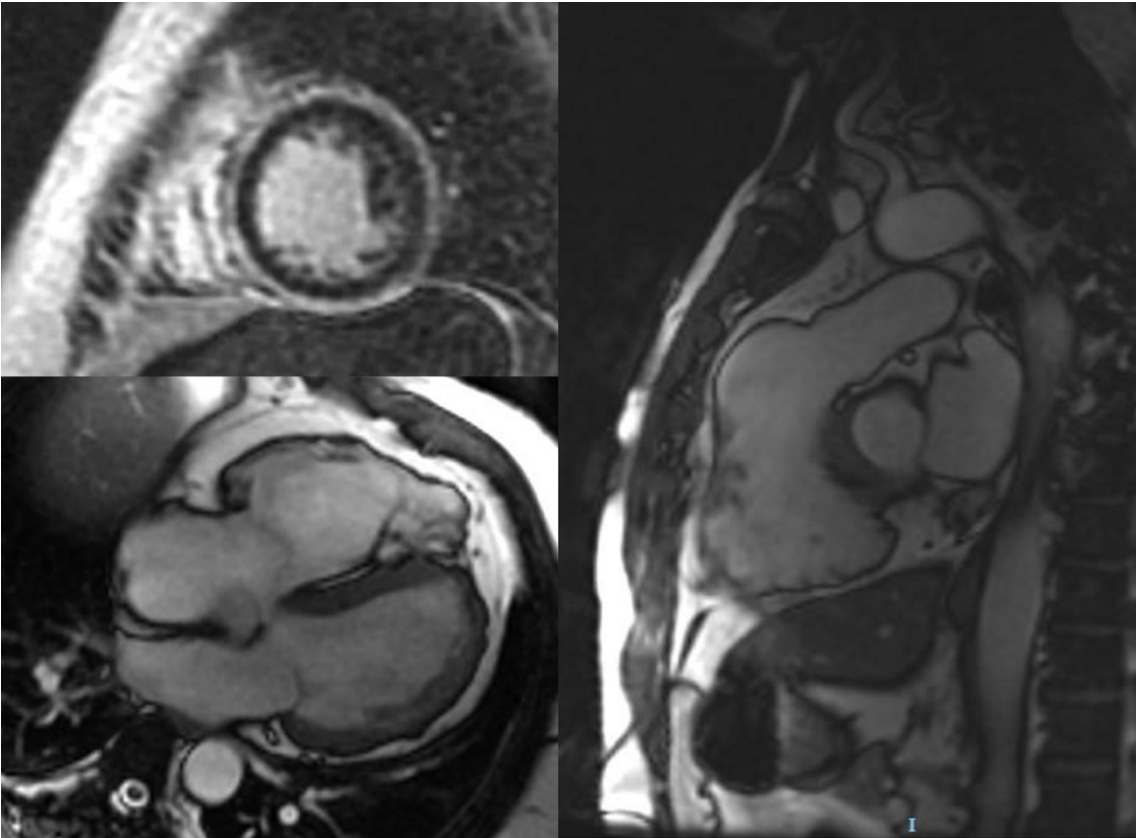


**Figura 4.1. Electrocardiograma del caso índice (IV:31)** mostrando ritmo sinusal a una frecuencia cardíaca normal, intervalo PR normal, QRS estrecho y de bajo voltaje, onda Q lateral patológica, una marcada inversión de onda T en todas las derivaciones precordiales, así como aplanamiento de la onda t en derivaciones frontales.

En el ecocardiograma y la resonancia magnética cardíaca del paciente se objetivó una gran dilatación del tracto de salida de ventrículo derecho, aneurismático, y con movimiento disquinético en sístole. El ventrículo derecho se encontraba muy dilatado (diámetro telediastólico de 55mm; volumen telediastólico indexado por

superficie corporal  $158,4\text{mL}/\text{m}^2$ ). También mostraba alteraciones regionales a nivel apical (microaneurismas) y pared libre anterior. La función ventricular sistólica estaba gravemente disminuida (24,7%). Por otra parte, el ventrículo izquierdo se encontraba ligeramente dilatado (diámetro telediastólico 58mm; volumen telediastólico de  $106,6\text{mL}/\text{m}^2$  ajustado por superficie corporal). También tenía alteraciones segmentarias de la contractilidad, especialmente en territorio posterolateral medioapical, donde el miocardio se encontraba adelgazado. La función sistólica ventricular se encontraba gravemente reducida (30%). En las secuencias de RPG se identificó fibrosis a nivel del tracto de salida y pared inferior de ventrículo derecho, así como a nivel subepicárdico, con una distribución circunferencial en ventrículo izquierdo [Figura 4.2].

Estas anomalías justifican el cumplimiento de criterios mayores estructurales y funcionales para el diagnóstico de MCA según los criterios diagnósticos actuales.



**Figura 4.2. Resonancia magnética cardiaca del probando (IV:31).** En la imagen superior izquierda se aprecia un plano eje corto biventricular que muestra retención patológica de gadolinio a nivel subepicárdico anular de ventrículo izquierdo. La imagen inferior izquierda es un plano en 4 cámaras donde se aprecia el adelgazamiento miocárdico biventricular y aspecto arrosariado del epicardio. La imagen de la derecha es un plano de 2 cámaras de ventrículo derecho con dilatación del tracto de salida de ventrículo derecho y microaneurismas de pared libre a nivel apical.

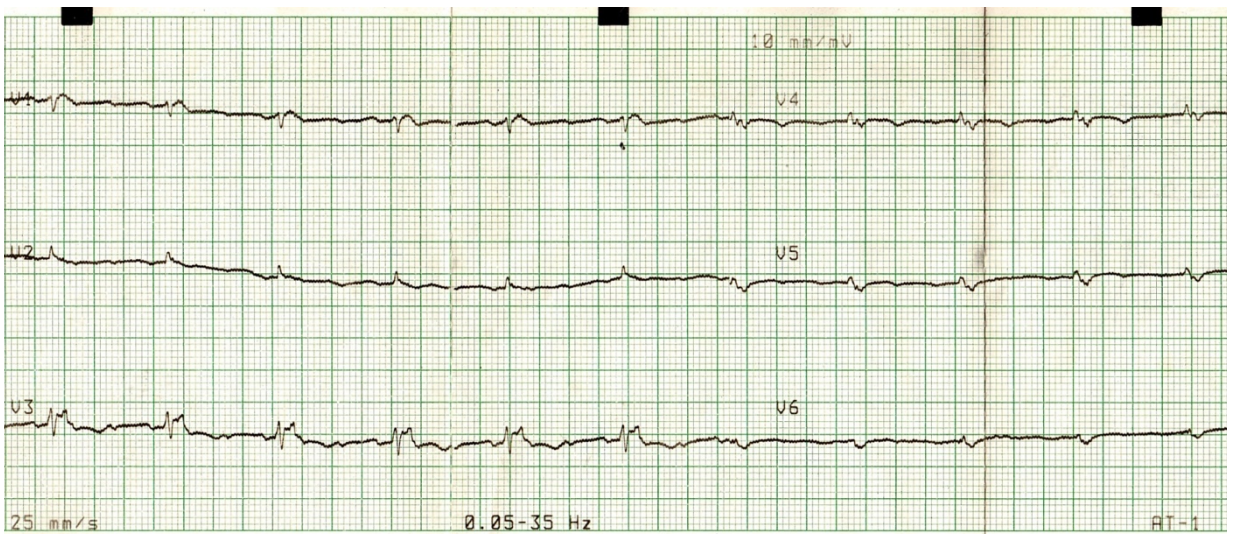
En el ECG Holter de 24 horas se encontraron más de 500 extrasístoles ventriculares con morfología de bloqueo de rama izquierda y bloqueo de rama derecha, sugiriendo patología en ambas cámaras cardiacas.

Con la descripción clínica previa, inicialmente el paciente cumple los criterios diagnósticos de MCA, reuniendo 2 criterios mayores y 2 menores [Tabla 4.1]. En este caso, existe la peculiaridad de que el hermano es un familiar de segundo grado y

presentaba datos macroscópicos e histopatológicos en la necropsia de MCA. De forma secuencial se estudió clínicamente a la madre de ambos sujetos, mostrando en el electrocardiograma la presencia de una onda épsilon (criterio mayor diagnóstico) [Figura 4.3], que junto a la confirmación histológica de la necropsia cumplía también los criterios diagnósticos de MCA. Por tanto, el paciente índice (IV.31) ya tenía un familiar de primer grado con el diagnóstico, y por tanto reúne 3 criterios mayores y 1 criterio menor. En este caso quedó demostrado que la afectación era biventricular con una aparente evolución paralela de ambas cámaras cardíacas. Tras el diagnóstico, y basado en el algoritmo de manejo previamente expuesto, el paciente recibió un desfibrilador automático implantable en prevención primaria de MSC. Tras cuatro años de seguimiento, el paciente ha recibido tratamiento médico óptimo de insuficiencia cardíaca (betabloqueantes, inhibidores de de la neprilisina y la angiotensina y antagonistas del receptor de mineralcorticoides). Si bien la función sistólica biventricular no ha mejorado (FEVI 20%; FEVD 30%), el paciente mantiene una buena clase funcional (II/IV de la NYHA). También durante el seguimiento ha recibido una terapia apropiada por taquicardia ventricular sostenida.

**TABLA 4.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA TASK FORCE EN EL CASO ÍNDICE (IV.31)**

Criterios Diagnósticos	Mayores	Menores
<b>Disfunción y alteraciones estructurales globales o regionales</b>	Acinesia o discinesia regionales del VD o contracción disincrónica del VD y fracción de eyección del VD $\leq$ 40%	
<b>Caracterización del tejido de la pared</b>	No disponible	No disponible
<b>Anomalías de la repolarización</b>	Ondas T invertidas en las derivaciones precordiales derechas (V1, V2 y V3) o más allá en individuos de edad > 14 años (en ausencia de BRDH con QRS $\geq$ 120 ms)	
<b>Anomalías de la despolarización / conducción</b>		No disponible
<b>Arritmias</b>		>500 extrasistoles ventriculares por 24h (Holter)
<b>Antecedentes familiares</b>	Historia de ARVD/C confirmada en un familiar de primer grado que cumple criterios diagnósticos	



**Figura 4.3. Electrocardiograma de la paciente III.16.** Electrocardiograma inicial de la madre del paciente índice que muestra ritmo sinusal con PR largo, bajos voltajes del complejo QRS y onda epsilon en la porción terminal del complejo QRS, especialmente visible en V3 y V4.



## **B. Resultados del estudio genético.**

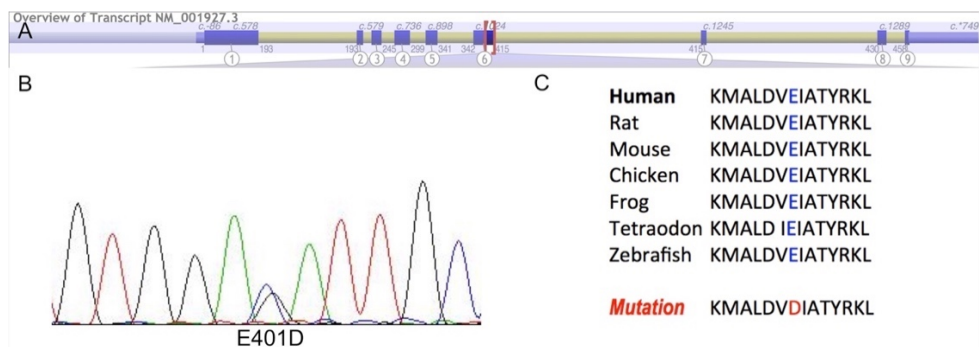
La MCA es una entidad genéticamente condicionada que generalmente presenta un patrón de herencia autosómico dominante. La identificación de una variante patogénica en uno de los genes reportados como causales de la enfermedad es uno de los criterios diagnósticos reconocidos por la comunidad internacional [35]. Los documentos de consenso actuales recogen la indicación de la realización del estudio genético dirigido en el probando que reúne criterios para el diagnóstico definitivo de MCA [111]. Dado que la mayoría de genes relacionados con MCA son aquellos que codifican proteínas desmosomales, inicialmente se realizó en el probando un estudio *Sanger* que incluyó *DSG2*, *DSC2*, *JUP*, *PKP2* y *DSP*. Este primer análisis fue negativo.

Debido a que el rendimiento del estudio genético es limitado (especialmente la técnica *Sanger*) la no identificación de una mutación en genes desmosomales no excluye la enfermedad. Por tanto, se reanalizó genéticamente al probando mediante el método *NGS*. El resultado del estudio genético mediante *NGS* en el paciente índice (IV:31 Figura 3.3) identificó una mutación de tipo missense en heterocigosis en el gen *DES* (NM\_001927.3:c.1203G>C; NP\_01918.3:p. Glu401Asp o p.E401D). Hasta la fecha, esta mutación no había sido reportada en la literatura médica ni tampoco se encontraba presente en bases de datos públicas como HGMD (The Human Gene Mutation Database), dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism Database), NHLBI GO Exome Sequencing Project, and ClinVar, o Exome Aggregation Consortium (ExAC) (31/03/2017) [112-115].

Como se ha comentado previamente, el residuo Glu401

pertenece a la cuarta alfa hélice (coil 2B, aminoácidos 296-412) del dominio central *rod* (aminoácidos 109-412). Se trata de una región que es esencial para el ensamblaje del filamento de desmina. En el dominio donde se localiza esta variante se encuentran la mayoría de las mutaciones conocidas de este gen. Se ha reportado que el desarrollo temprano y con mayor frecuencia de miocardiopatía se encuentra asociado con mutaciones en el motivo YRKLLLEGESRI C-terminal del segmento 2, (aminoácidos 405-416), muy cercano a donde se localiza esta variante. Existen casos de enfermedad especialmente severa en portadores de mutaciones en la región C-terminal del filamento desmina [95].

La valoración *in silico* realizada indica que la sustitución glu401Asp, NC\_000002.11:g.220286241G>C afecta a un residuo altamente conservado hasta la rana, considerando 10 especies, y produce el cambio de un aminoácido polar positivo ácido (ácido glutámico, Gln; GAG) a otro polar positivo ácido (ácido aspártico, Asp; GAC) [Figura 4.4; Tabla 4.2]. Hay pequeñas modificaciones en las propiedades físico-químicas, hidrofobicidad y masa [Distancia Grantham: 45(0-125)].



**Figura 4.4.** A. Localización del residuo 401 en el coil 2B del dominio central *rod*. B: Electroferograma de la secuenciación Sanger de la mutación. C: representación de la conservación del residuo a lo largo de las especies.

**TABLA 4.2. PREDICTORES SOBRE EL EFECTO DE LA MUTACIÓN**

<i>Predictor</i>	<i>Predicción</i>	<i>Puntuación</i>	<i>Versión</i>
<i>SIFT</i>	Perjudicial	0,01	SIFT versión 5.1.1
<i>Polyphen-2 (HumVar)</i>	Probablemente perjudicial		
<i>Polyphen-2 (HumDiv)</i>	Probablemente perjudicial		
<i>Mutation Taster</i>	Patogénica	0,9339	

SIFT: puntuaciones de 0 a 1. Puntuaciones <0.05 se predicen como “perjudiciales” y todas las demás como “toleradas”. Polyphen: valores de 0 (benigna) a 1 (perjudicial). Mutación Taster: valores de 0 a 1. Probabilidad cercana a 1 indica una mayor seguridad en la predicción.

### **C. Fenotipo de los pacientes portadores de la mutación Glu401Asp en *DES*. Estudio de cosegregación, supervivencia y eventos desfavorables.**

Tras el diagnóstico clínico del paciente índice y la única variante potencialmente patogénica identificada en el estudio genético mediante *NGS*, se realizó el estudio familiar en cascada intentando caracterizar clínica y genéticamente a cada individuo [Figura 3.3].

El estudio de cosegregación de la variante para correlacionar el fenotipo y el genotipo demostró claramente el impacto patogénico específico de la mutación *DES*-p.Glu401Asp, demostrando enfermedad miocárdica primaria en el 100% de los portadores. Aunque con una penetrancia del 100%, la expresión clínica es variable, como es característico de la MCA. En ninguno de los sujetos no portadores de la variante se consiguió identificar signos de enfermedad miocárdica [Tabla 4.3]

En total, se secuenció la mutación en *DES*-p.Glu401Asp en 66 sujetos de la misma familia. De ellos, 23 individuos eran portadores de la mutación y pudieron ser estudiados clínicamente. Apoyados en el estudio familiar y el árbol genealógico se identificaron 7 sujetos como portadores obligados (fallecidos previamente a la realización del estudio) y otros dos sujetos sin estudio genético disponible pero que, sin embargo, eran víctimas de MSC, de tal forma que fueron considerados como probables portadores de la mutación. En total fueron 31 sujetos identificados como portadores de la mutación. De los 23 individuos portadores de la mutación identificados, 9 cumplían los actuales criterios

diagnósticos de MCA. La información clínica y genética de estos portadores está recogida en la tabla 4.4.

**TABLA 4.3. CARACTERISTICAS DE PACIENTES PORTADORES DE LA MUTACION VS NO PORTADORES. ESTUDIO DE COSEGREGACIÓN.**

	Portadores (n=23)	No portadores (n=43)	Valor P
Edad, años	38,6±21,5	45,8±17,9	$p = 0.150$
Mujeres, n (%)	13 (56,5)	19 (44,2)	$p = 0.339$
Fenotipo de MCA, n (%)	23 (100 %)	0 (0 %)	$p = 0.00001$
<b>Eventos</b>	<b>(n = 25)</b>	<b>(n = 43)</b>	
MSC, n (%)	4 (16)	0	$p = 0.041$
TxC, n (%)	2 (8)	0	$p = 0.115$
Muerte por IC, n (%)	2 (8)	1 (2,3)	$p = 0.009$
BAV, n (%)	1 (4)	1 (2,3)	$p = 0.545$
Asintomáticos, n (%)	15 (60)	41 (95,3)	$p = 0.001$

(Continúa en la siguiente página)

<b>Electrocardiograma</b>			
	<b>(n=20)</b>	<b>(n=42)</b>	
Ritmo sinusal, n (%)	16 (80)	40 (95.2)	<i>p</i> = 0.079
PR, ms	156,8±33,22	158,8±31,9	<i>p</i> = 0.831
QRS, ms	96,9±24,2	83,5±12,4	<i>p</i> = 0.007
Onda ε, n (%)	2 (10)	0	<i>p</i> = 0.104
IOT, n (%)	14 (70)	1 (2,4)	<i>p</i> = 0.001
Onda S, ms	48,80±17,61	31±7	<i>p</i> = 0.001
Bajo voltaje†, n (%)	12 (60)	4 (9,5)	<i>p</i> = 0.001
Onda Q, n (%)	3 (9,1)	0	<i>p</i> = 0.008
<b>Bloqueo de rama</b>			
No, n (%)	12 (60)	35 (83,3)	<i>p</i> = 0.094
Bloqueo bifascicular, n (%)	1 (5)	2 (4,8)	<i>p</i> = 1
BRIHH, n (%)	1 (5)	1 (2,4)	<i>p</i> = 0.545
HBSAI, n (%)	5 (25)	1 (2,4)	<i>p</i> = 0.011
HBPI, n (%)	1 (5)	0	<i>p</i> = 0.323

(Continuación de tabla 4.3)

Los datos están expresados como media ±desviación estándar o como valor absoluto y porcentaje, intervalos electrocardiográficos expresados en milisegundos. BAV= bloqueo auriculoventricular. MCA= miocardiopatía arritmogénica. IOT=inversión de la onda T. MSC= muerte súbita cardíaca. TxC= trasplante cardíaco. IC= insuficiencia cardíaca. Bloqueo de rama (BRIHH=bloqueo de rama izquierda del haz de His; HBSAI=hembloqueo superoanterior izquierdo; HBPI= hembloqueo posterior izquierdo). \*Inversión de onda T en al menos 3 derivaciones precordiales consecutivas. †Bajo voltaje como QRS menor de 5 mm en derivaciones de los miembros o 10 mm en derivaciones precordiales. n = 19 para onda S, onda Q y bajos voltajes ya que no es posible valorar en pacientes con estimulación por dispositivo intracardiaco.

- Síntomas:

La mayoría de los sujetos se encontraban en asintomáticos en el momento del diagnóstico (15 casos, 60%), mientras que el resto presentó síntomas frecuentes en MCA como palpitaciones (4 casos – III.18; IV.29; V.19; V.24), síntomas de insuficiencia cardíaca (3 casos – III.21; IV.16; IV.31) y síncope (1 caso – IV.23). Los eventos como MSC, taquicardia ventricular sostenida o trasplante cardíaco fueron clasificados como eventos cardiovasculares y no contabilizados como sintomatología.

La mayor parte de los portadores identificados lo fueron a raíz del estudio familiar y se encontraban asintomáticos al diagnóstico. Esto probablemente guarde relación con la realización del diagnóstico en una fase precoz de la enfermedad. En consonancia con esta idea, las palpitaciones fueron el síntoma más frecuente en el momento del diagnóstico, teniendo estos sujetos una función ventricular normal o ligeramente deprimida. En el caso de 5 pacientes el síntoma de predominante al diagnóstico fue la disnea o síntomas sugerentes de insuficiencia cardíaca. En estos casos se pudo objetivar disfunción ventricular izquierda o biventricular en ese momento. Dos de estos pacientes tenían el diagnóstico previo de miocardiopatía dilatada idiopática. Ningún paciente presentó episodios sugerentes de miocarditis ni sintomatología de miopatía esquelética periférica.

Durante el cribado familiar y la realización del presente trabajo se reportó una elevada incidencia de eventos cardiovasculares mayores entre los portadores de la mutación

[Figura 4.5].

El evento más frecuente fue la MSC con cuatro casos identificados (III.12; IV.26; IV.29; IV.33). En los tres primeros casos sucedió a la edad de 33, 18 y 31 años respectivamente, mientras que en el cuarto ocurrió con 64 años. El paciente III.12 falleció súbitamente antes del inicio del estudio y no se disponen informes médicos previos ni informe necrópsico. Este paciente ha sido considerado como probable portador de la variante. En el caso de los pacientes IV.26 y IV.29 se trata de dos hermanos fallecidos súbitamente antes del comienzo de este trabajo y motivo por el que se inicia el mismo. De ninguno se dispone información médica previa, sin embargo, el sujeto IV.29 sí se había aquejado en días previos de palpitaciones falleciendo finalmente en reposo. El estudio necrópsico ya ha sido detallado previamente y era portador obligado de la mutación. Por otra parte, el sujeto IV.26 falleció practicando deporte, lo que sugiere con fuerza la posibilidad de muerte arrítmica por MCA, a pesar de no disponer de informe necrópsico. Lamentablemente no se ha podido secuenciar la mutación en este sujeto, pero fue considerado como probable portador de la variante. Finalmente, el cuarto sujeto (IV.33) con MSC falleció en su hospital de referencia tras sufrir varios episodios de síncope en las 24h previas. En este caso el paciente presentaba buena función biventricular y ausencia de taquicardia ventricular no sostenida o extrasistolia ventricular en el estudio ECG Holter de 24h. Tan solo es destacable la presencia de RPG. Este último sujeto representa la dificultad de la adecuada estratificación de riesgo, así como la presencia de eventos arrítmicos en ausencia de cardiopatía



avanzada.

La muerte por insuficiencia cardiaca (sujetos III.10 y IV.23) y la necesidad de trasplante cardiaco también fue notablemente frecuente (sujetos IV.23 y III.21). El individuo III.10 falleció por insuficiencia cardiaca avanzada con 41 años de edad décadas atrás según registros médicos antiguos, aunque lamentablemente no se disponen de datos derivados de pruebas complementarias. El sujeto IV. 23 debutó la enfermedad con síncope que más tarde se documentaría la presencia de taquicardia ventricular monomorfa sostenida con imagen de bloqueo de rama derecha. Inicialmente fue diagnosticado de miocardiopatía dilatada idiopática. Finalmente requirió un trasplante cardiaco y fallecería en el postoperatorio de la misma intervención a la edad de 41 años. Por otra parte, el paciente III.21, también diagnosticado previamente de miocardiopatía dilatada idiopática requirió un trasplante cardiaco a la edad de 61 años de edad. Ambos pacientes han sido diagnosticados a posteriori de MCA.

Un sujeto (III.18) presentó a la edad de 84 años un bloqueo auriculoventricular completo, atribuido a enfermedad degenerativa del sistema específico de conducción más allá de la asociación de las desminopatías con trastornos de la conducción auriculoventricular.

Finalmente, durante el seguimiento se han implantado hasta 5 desfibriladores automáticos en prevención primaria de MSC, habiéndose registrado hasta 3 episodios de taquicardia ventricular adecuadamente tratados (V.19, V.30 y IV.31) [Figura 4.5].

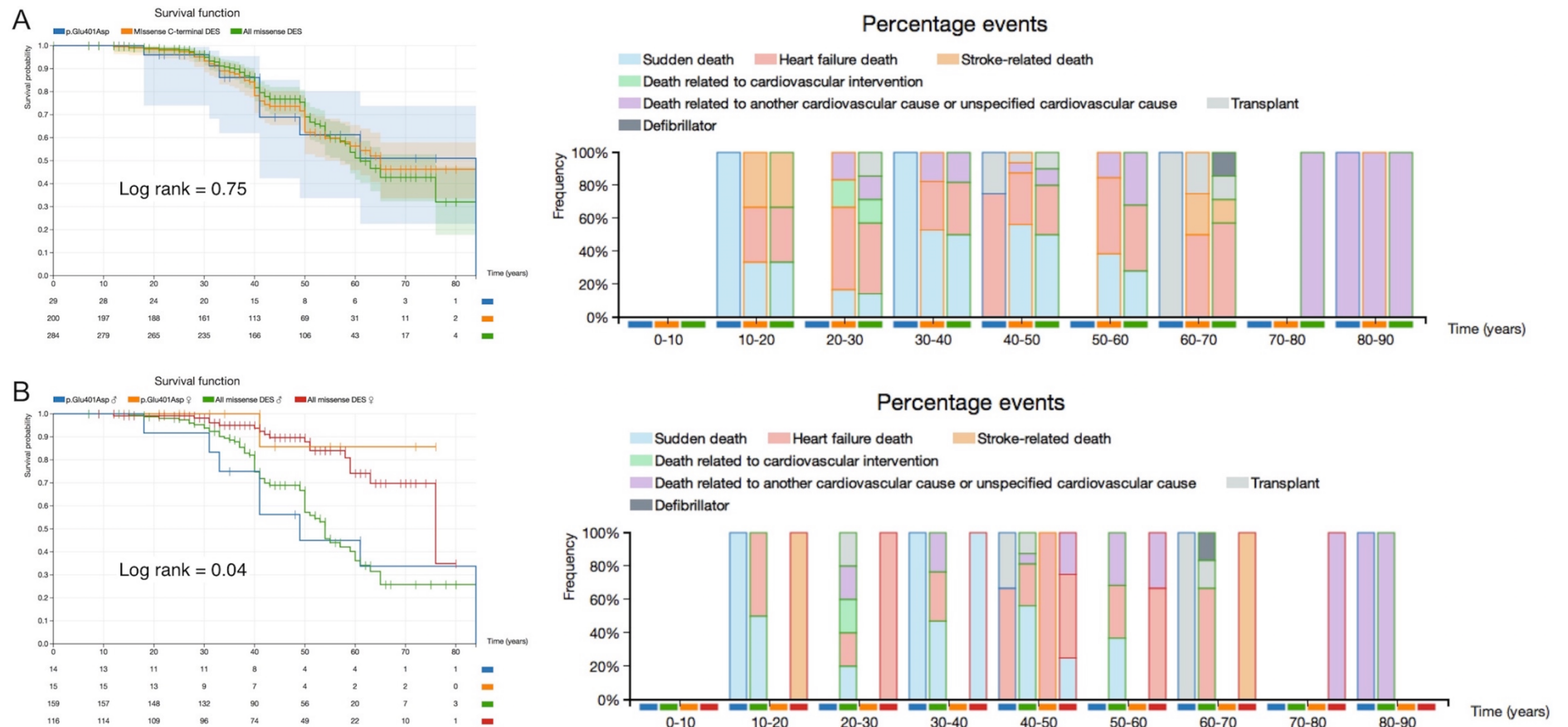
En conclusión, toda esta información es concordante con los

síntomas y forma de presentación clásica de la MCA con arritmias ventriculares y MSC a edades tempranas incluso como primer síntoma de la enfermedad, y desarrollo de disfunción sistólica ventricular en casos de mayor evolución de la enfermedad.

Caso	Edad dco.	Sexo	Gen Estatus	Síntomas	Eventos CV	CK	Onda ε	Inversión onda T	Bajo Voltaje	DD VI	FEVI	TSM VI	Afect. VD	RPG VI	Arritmias ventriculares	Criterios M/m	Comentarios
II:3	n/d	M	PO	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	0/1	Fco. J. Bermúdez Jiménez
II:6	n/d	V	PO	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	1/0 Posible	
II:8	41	V	PO	n/d	IC	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	1/0 Posible	
III:9	49	V	PO	n/d	IC	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	1/0 Posible	
III:10	41	M	PO	n/d	IC	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	1/0 Posible	Muerte por insuficiencia cardíaca
III:12	33	V	PP	n/d	MSC	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	1/0 Posible	
III:14	72	M	P	Asintomático	IC	53	No	V1-V6 Inferior	Si	48	43	Si	No	Si	TVNS 970 EV	1 / 2 Definitivo	
III:16	n/d	M	PO	n/d		n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	1/0 Posible	
III:18	84	V	P	Palpitaciones	BAV	n/d	No	No	No	50	55	Si	No	n/d	n/d	0/1	Marcapaso
III:21	66	V	P	Disnea	IC TxC	n/d	No	V1-V6 Inferior	No	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	TVNS	2 / 1 Definitivo	
IV:7	41	M	P	Asintomático		93	No	No	No	42	55	No	No	Si	1868 EV	0/1	
IV:10	55	M	P	Asintomático		103	No	No	Si	54	48	Si	No	Si	8455 EV	0/1	
IV:13	57	M	P	Asintomático		88	No	V4-V6 Inferior	Si	46	55	Si	No	n/d	5852 EV	0/2 Posible	
IV:16	61	V	P	Disnea	IC	95	No	No	No	60	30	Si	Si	Si	4479 EV	1 / 1 Borderline	CRT-D
IV:23	41	V	P	Síncope	IC TxC	76	No	V1-V2	No	70	30	Si	Si	n/d	TVS 8045 EV	2 / 1 Definitivo	Muerte por insuficiencia cardíaca
IV:26	18	V	PP	n/d	MSC	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	2 / 0 Definitivo	Fallecido en ejercicio
IV:29	31	V	PO	Palpitaciones	MSC	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	1 / 0 Posible	Fallecido en reposo
IV:31*	47	V	P	Disnea	IC	59	No	V1-V6 Inferior	Si	61	30	Si	Si	Si	1283 EV TVS	3 / 1 Definitivo	DAI, Descarga apropiada
IV:33	63	V	P	Asintomático	MSC	112	No	No	No	55	52	Si	No	Si	193 EV	0 / 1	Fallecido en reposo (64a)
IV:40	44	M	P	Asintomático		110	No	No	Si	49	57	Si	No	Si	342 EV	1 / 0 Posible	
V:4	31	M	P	Asintomático		65	No	V1-V5 Inferior	Si	50	54	Si	No	Si	421 EV	1 / 0 Posible	

<b>V:13</b>	34	M	P	Asintomático		41	No	V4-V6 Inferior	Si	54	49	Si	No	n/d	1392 EV	1 / 1 Borderline	
<b>V:16</b>	11	M	P	Asintomático		67	No	V1-V4	No	47	65	No	No	n/d	74 EV	No aplicable	
<b>V:17</b>	7	V	P	Asintomático		180	No	No	No	41	65	No	No	n/d	0 EV	No aplicable	
<b>V:19</b>	21	M	P	Palpitaciones	IC	86	No	V1-V6 Inferior	Si	48	37	Si	Si	Si	5293 VE	3 / 1 Definitivo	Descarga apropiada, DAI
<b>V:10</b>	25	M	P	Asintomático		105	Si	V5-V6 I-aVL	Si	49	39	Si	No	Si	TVNS 2866 EV	0 / 2 Posible	
<b>V:24</b>	35	V	P	Palpitaciones		150	No	V2-V6 Inferior	Si	62	50	Si	No	Si	2318 EV	1 / 1 Borderline	
<b>V:27</b>	26	M	P	Asintomático		55	No	V1-V6 Inferior	Si	52	40	Si	Si	No	3216 EV	1 / 2 Definitivo	
<b>V:29</b>	21	M	P	Asintomático		84	Si	V4-V6 Inferior	No	52	43	Si	No	No	TVNS	2 / 1 Definitivo	DAIsc
<b>V:30</b>	14	M	P	Asintomático		59	No	V4-6 Inferior	No	53	40	Si	No	Si	TVNS	2 / 1 Definitivo	DAIsc, Descarga apropiada
<b>VI:1</b>	13	V	P	Asintomático		103	No	V1-V4	Si	58	51	No	No	Si	3985 EV	No aplicable	

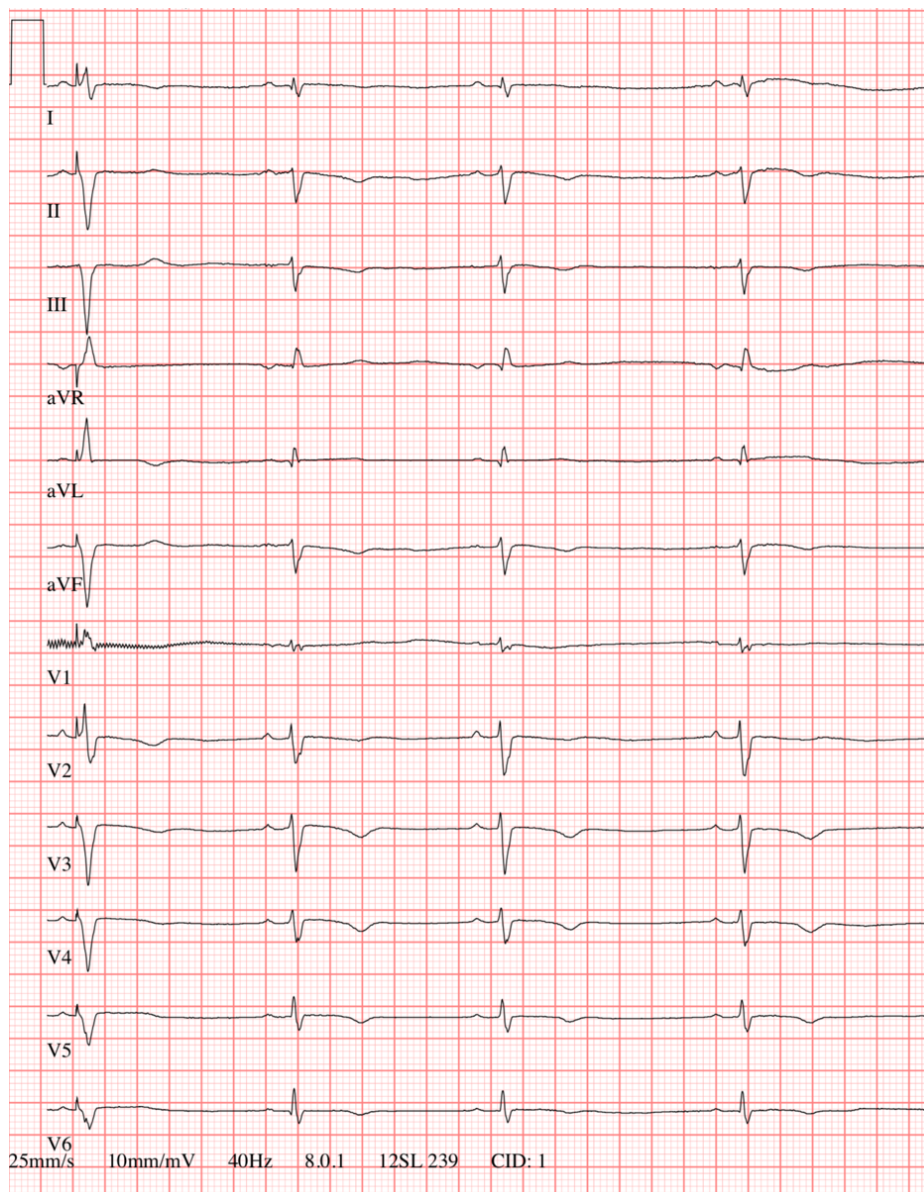
**Table 4.4. Características clínicas de los portadores de la variante DES-p.Glu401Asp.** \* = probando. Caso=identificación individual en función de su posición en pedigrí. Gen estatus: genotipo (PO= portador obligado de la mutación; PP= probable portador de la mutación; P=portador de la mutación). Edad dco.= edad al diagnóstico (años). Sexo: V= varón; M= mujer. Descarga apropiada: descarga apropiada del DAI. Eventos CV= eventos cardiovasculares (IC=insuficiencia cardiaca avanzada; BAV=bloqueo auriculoventricular; TxC= trasplante cardiaco; MSC= muerte súbita cardiaca). CK= niveles en plasma de creatin-kinasa (mg/dl). Criterios (Mayores/menores): estatus diagnóstico según los criterios diagnósticos para miocardiopatía arritmogénica (Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia Task Force criteria); CRT-D= terapia de resincronización cardiaca-desfibrilador. DAI= desfibrilador automático implantable. DAIsc= desfibrilador automático subcutáneo. RPG= presencia de retención patológica de gadolinio en resonancia magnética cardiaca. Bajo voltaje= baja amplitud del QRS en las derivaciones de miembros. VI= ventrículo izquierdo, DDVI=díametro telediastólico de ventrículo izquierdo. FEVI: fracción de eyección de ventrículo izquierdo. TSMVI= trastornos segmentarios de la contractilidad de ventrículo izquierdo. Afect. VD= afectación de ventrículo derecho (acinesia, discinesia, aneurisma, dilatación, disfunción sistólica). Arritmias ventriculares (EV=extrasístoles ventriculares en Holter de 24horas; TVNS= taquicardia ventricular no sostenida; TV: taquicardia ventricular). n/d= información no disponible.



**Figura 4.5. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en portadores de la mutación *DES*-p.Glu401Asp. A:** la curva es similar a otras mutaciones *missense* en *DES* (información obtenida del laboratorio de genética de HealthinCode y de la literatura científica incluyendo 284 pacientes con mutaciones en *DES*). A la derecha se representan todos los eventos cardiovasculares en función de la edad en pacientes portadores de la mutación, todos los pacientes con mutaciones *missense* y todos los pacientes con mutaciones en el extremo C-terminal. A destacar la alta incidencia de muerte súbita cardiaca a edades tempranas en portadores de la mutación Glu401Asp en comparación con otros pacientes con mutaciones en *DES*. **B:** Se aprecia un peor pronóstico en varones en comparación con mujeres, de forma semejante a lo que se aprecia en otras mutaciones *missense*. Destaca la baja incidencia de eventos entre las mujeres menores de 50 años.

- Pruebas Complementarias:

- Electrocardiograma: el ECG mostró alteraciones en el 97% de los portadores de los que se disponía para estudio, siendo el hallazgo electrocardiográfico más frecuentemente identificado la inversión de la onda T en al menos tres derivaciones consecutivas (14 casos) [Figura 4.6]. La inversión de la onda T fue especialmente frecuente en derivaciones inferiores (II, III, aVF) y derivaciones anterolaterales precordiales (V2-V6). Otro hallazgo significativo fue la presencia de bajo voltaje del complejo QRS, definido como menos de 5mm en derivaciones de miembros y de 10mm en derivaciones precordiales.



**Figura 4.6. Electrocardiograma del sujeto V.19.** Trazado característico que muestra bradicardia sinusal con bajos voltajes generalizados, especialmente en derivaciones de miembros, e inversión de la onda T generalizada. El QRS empastado con trastorno inespecífico de la conducción intraventricular. Primer latido estimulado por desfibrilador automático implantable.

Como mencionamos previamente, los trastornos de la conducción auriculoventricular son especialmente frecuentes entre los pacientes con desminopatía, sin embargo, tan solo se identificó un paciente con bloqueo auriculoventricular completo con 84 años, pudiendo guardar relación con un proceso degenerativo natural. No se objetivó una prolongación significativa del intervalo PR en general, aunque sí eran frecuentes los trastornos inespecíficos de la conducción intraventricular. Respecto a los sujetos menores de 14 años (7, 11 y 13 años de edad), en el ECG mostraron una inversión de la onda T más allá de V3 y uno de ellos (VI.1) también presentaba bajos voltajes en derivaciones de miembros. Curiosamente este sujeto presentaba también RPG en la pared inferior de ventrículo izquierdo en la resonancia magnética cardiaca.

- ECG Holter de 24 horas: como es habitual en pacientes con MCA, el hallazgo principal fue una elevada incidencia de taquicardias ventriculares no sostenidas (32% de los portadores) así como una elevada incidencia de extrasistolia ventricular ( $2836.2 \pm 2677.7$ ) hasta en el 23% de los portadores.

- Ecocardiograma y Resonancia Magnética Cardiaca: los estudios de imagen mostraron una afectación predominante de ventrículo izquierdo. En este sentido, en el ecocardiograma, se identificaron hasta en 5 pacientes alteraciones estructurales y funcionales del ventrículo derecho (4 pacientes con dilatación ventricular y reducción de la FEVD (TAPSE  $15 \pm 2.4$  mm), y 1 paciente con trastornos segmentarios de la contractilidad). Estos pacientes también presentaban una FEVI gravemente reducida. ). El valor medio del tracto de salida de ventrículo derecho fue de  $30,2 \pm 9,3$  mm, parámetros considerados dentro de la normalidad. Curiosamente, fueron características las alteraciones segmentarias de la contractilidad en el ventrículo izquierdo, especialmente en la región medio-apical de la pared inferolateral (14 pacientes). En general, la FEVI se encontró preservada o ligeramente reducida ( $46 \pm 8.2\%$ ) y el diámetro ventricular izquierdo se encontraba dentro de los valores normales ajustados por superficie corporal ( $51.52 \pm 5.87$  mm) [Tabla 4.5]. En ningún paciente se identificaron valvulopatías significativas que requirieran intervención quirúrgica o percutánea.

Por otro lado, la RM cardiaca de los portadores de la variante en desmina, confirmó la afectación ventricular derecha en los 5 pacientes previamente identificados mediante ecocardiografía, y añadió la identificación de aneurismas de pared libre y tracto de salida de ventrículo derecho en todos ellos. La FEVD media de los portadores de la mutación fue de  $51.3 \pm 10.5\%$ . El volumen telediastólico indexado por superficie corporal fue de  $85,2 \pm 37.7$  mL/m<sup>2</sup>, tan solo un 5% por encima del volumen predicho para esta población

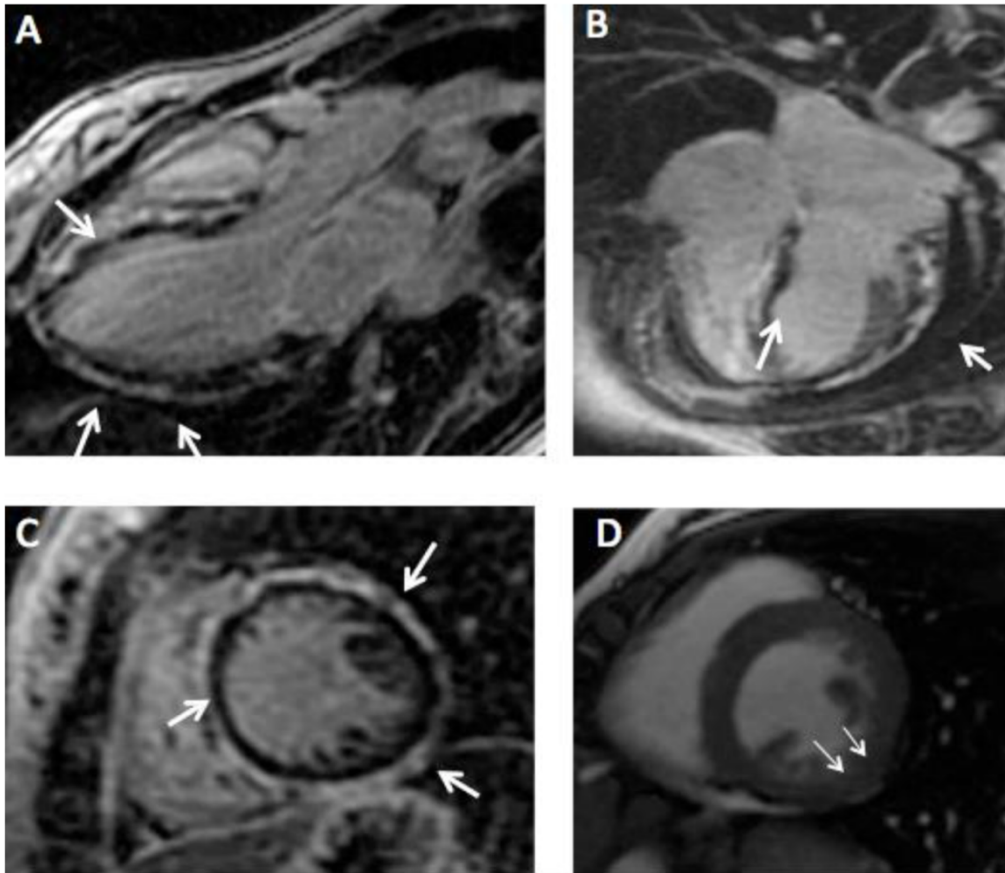
según superficie corporal. Tanto los volúmenes como la FEVD no alcanzaron los valores requeridos para apoyar el diagnóstico de MCA. En cuanto al ventrículo izquierdo, en todos los pacientes se objetivaron datos de afectación de ventrículo izquierdo. La FEVI media fue de  $46.6 \pm 9.5\%$  y el volumen telediastólico indexado por superficie corporal fue  $98 \pm 23.6 \text{ mL/m}^2$ . Hubo un incremento del  $17,4 \pm 20\%$  del volumen telediastólico de ventrículo izquierdo respecto al volumen predicho por superficie corporal para esta población. En 3 pacientes se objetivó la presencia de aneurismas en pared inferolateral de ventrículo izquierdo. En cuanto a las secuencias de RPG, se identificó dicho RPG en 16 pacientes. Característicamente se objetivó una RPG extensa con un patrón subepicárdico circunferencial en ventrículo izquierdo, presente en la mayoría de ellos. En otros casos la distribución fue subepicárdica medioapical lateral o inferolateral. En dos casos se identificó realce tardío de gadolinio en ventrículo derecho [Figura 4.7].

**TABLA 4.5. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES EN ECOCARDIOGRAFÍA TRANSTORÁCICA ENTRE LOS PORTADORES.**

Ecocardiograma	
FEVI (%)	45,94 $\pm$ 8,19
DTDVI (mm)	51,52 $\pm$ 5,87
Alteraciones segmentarias de la contractilidad en VI, n (%)	14 (60.86)
TSVD (mm)	30,2 $\pm$ 9,3
TAPSE (mm)	15 $\pm$ 2.4
Afectación de VD, n (%)	5 (21.7)

Valores expresados como media $\pm$ desviación estándar ó valores absolutos y porcentaje. FEVI=fracción de eyección de ventrículo izquierdo. DTDVI=diámetro telediastólico de ventrículo izquierdo. VI=ventrículo izquierdo. TSVD=tracto de salida de ventrículo derecho. VD=ventrículo derecho.





**Figura 4.7. Hallazgos estructurales en resonancia magnética cardíaca en portadores. A.** Tres cámaras de ventrículo izquierdo con retención patológica de gadolinio subepicárdica septal e inferolateral. **B.** Mismo patrón de retención en plano de 4 cámaras. **C.** Eje corto con patrón de realce subepicárdico anular. **D.** Eje corto con referencia a zona medioapical inferolateral.

**D. CARACTERIZACIÓN TISULAR MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA CARDIACA: DESCRIPCIÓN DE UN PATRÓN DE RETENCIÓN PATOLÓGICA DE GADOLINIO ESPECÍFICO.**

Como se ha expuesto previamente, todos los pacientes portadores de la variante en *DES* p.Glu401Asp mostraron signos de afectación ventricular izquierda predominante en las pruebas de imagen cardiovascular. Además, se pudo objetivar en todos los pacientes la presencia de fibrosis miocárdica mediante secuencias de RPG. En estas secuencias fue llamativo la distribución frecuente de la RPG en el epicardio de ventrículo izquierdo de forma circunferencial o anular.

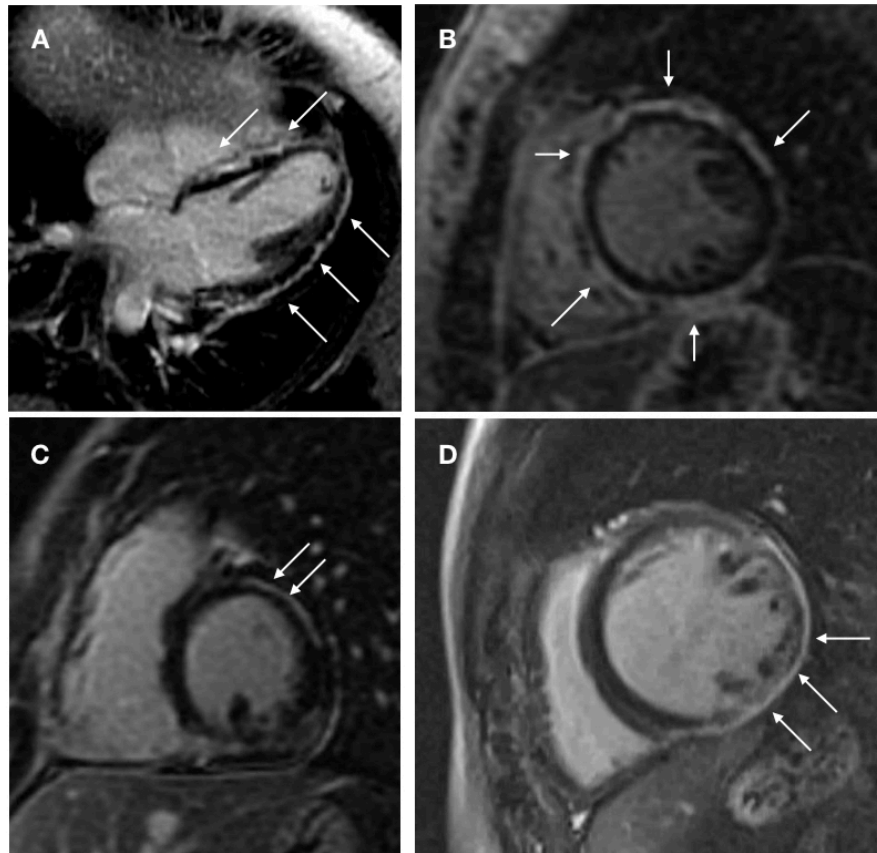
Tomando como grupo control una muestra de 47 pacientes con MCA, se compararon las características del RPG en RM de estos pacientes respecto a los portadores de la variante p.Glu401Asp en *DES* diagnosticados de MCA, pertenecientes a esta familia y en los que se pudo realizar la RM (n=16).

De este grupo control, en 13 pacientes se identificó una mutación considerada patogénica en alguno de los genes desmosomales, en 10 pacientes se identificaron variantes en genes no desmosomales (*FLNC*, *LMNA*, *TGFβ3* y *TMEM43*) y en 8 pacientes el estudio genético no obtuvo ninguna variante patogénica.

En 44 pacientes se realizaron secuencias de RPG, haciéndose patente en 38 de ellos (84.1%). La afectación del ventrículo izquierdo estuvo presente en el 100% de los casos, ya que la RPG tuvo una distribución biventricular en el 52.6% de ellos, siendo el resto fue de afectación exclusiva en ventrículo izquierdo. La distribución más frecuente fue el subepicárdio ventricular (94.4%), especialmente a nivel de los segmentos medioapicales de la pared inferolateral de ventrículo izquierdo.

Entre los portadores de la variantes en *DES*-p.Glu401Asp se identificaron alteraciones segmentarias de la contractilidad en 14 casos, todas a nivel de los segmentos medioapicales de la pared inferolateral de ventrículo izquierdo. La RPG estuvo presente en el 100% de los portadores, y por tanto, esto está en línea con que la infiltración fibroadiposa del miocardio ventricular está presente antes de que puedan objetivarse trastornos estructurales mediante ecocardiografía o RM sin secuencias de RPG. Respecto a la caracterización de la fibrosis ventricular, la más frecuente fue la presentación con un patrón de RPG circunferencial en el subepicardio del ventrículo izquierdo (12 casos; 92.3%;  $p=0.008$ ). En el resto de casos se identificó una RPG a nivel subepicárdico inferolateral. Este patrón, aunque característico en los portadores de la variante p.Glu401Asp, también se objetivó en 1 portador de una variante patogénica en *FLNC*, 3 portadores de variantes en *DSP* y 1 con 2 variantes en homocigosis en *DSG-2*. Entre la población control fue más frecuente la RPG a nivel subepicárdico inferolateral o mesocárdico septal [Figura 4.8].

Figura 4.8. Patrones de retención patológica de gadolinio identificados en resonancia magnética. A-B)



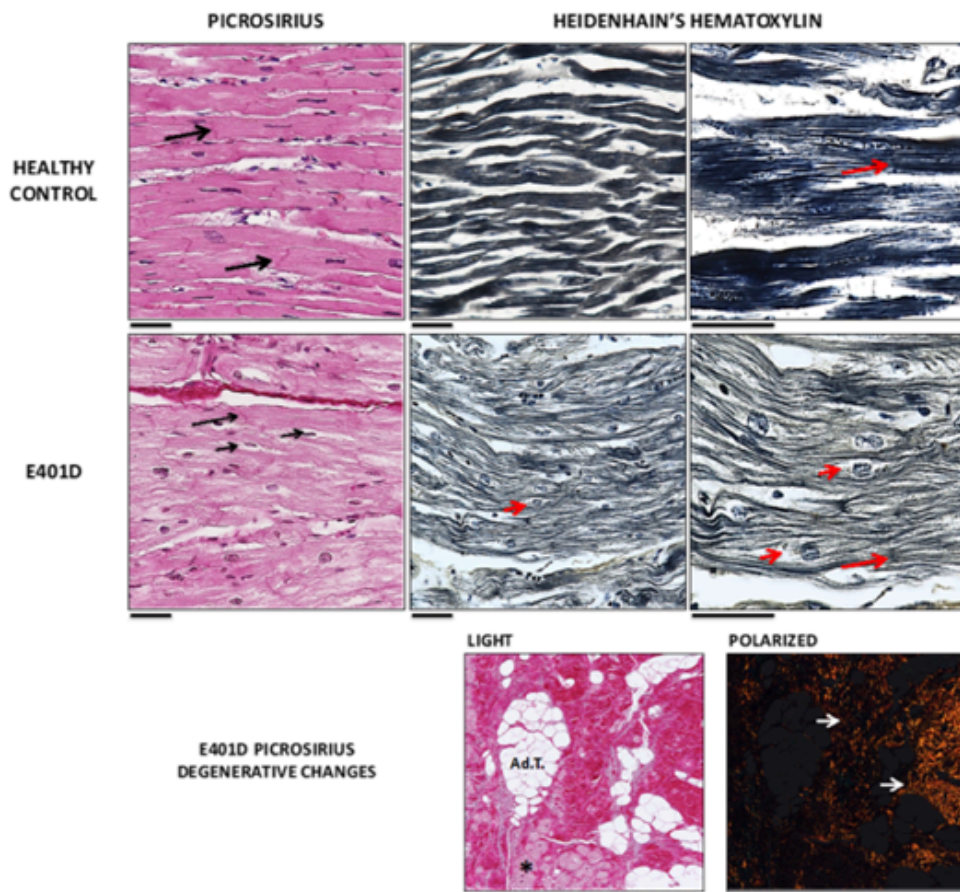
Plano 4 cámaras y eje corto del paciente V.30 donde resalta la RPG subepicárdica circunferencial alrededor de ventrículo izquierdo. **C)** Plano eje corto de paciente con variante en DSP y RPG subepicárdica y mesocárdica en pared anterolateral de ventrículo izquierdo. **D)** Eje corto de paciente portador de variante en FLNC con RPG subepicárdico en pared inferolateral de ventrículo izquierdo.

## E. Análisis Funcional

### I. Estudio histológico.

El análisis histológico del miocardio del sujeto III.21, sometido a trasplante cardiaco debido a la progresiva evolución a insuficiencia cardíaca refractaria mostró diferencias significativas respecto al miocardio control.

La tinción de picrosirius sobre el tejido miocárdico control mostró una configuración típica de los cardiomiocitos normales, con forma cilíndrica y ramificados, un único núcleo central, un sarcoplasma denso y fuertemente teñido, así como múltiples discos intercalares entre células adyacentes [Figura 4.9].



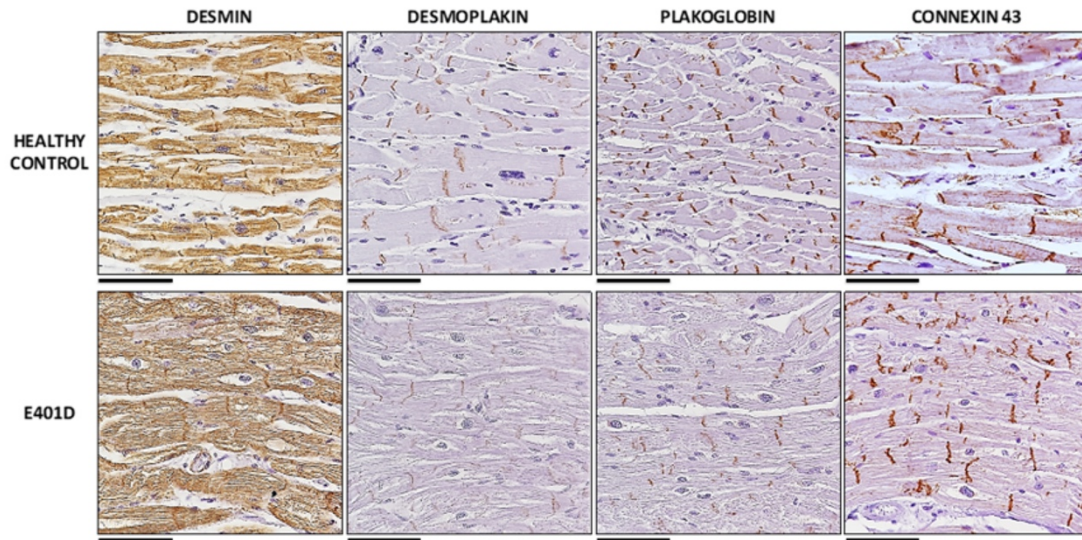
**Figura 4.9. Análisis histológico del tejido cardiaco del sujeto III.21. A.** Comparación entre el tejido control (Healthy Control) y el tejido del portador de la variante en DES-pGlu401Asp. Tinciones de picrosirius y de hematoxilina de Heidenhain Respecto al control, el tejido del portador tiene menos discos intercalares y mayores espacios perinucleares. **B.** imágenes representativas de la reacción fibroadiposa (A.d.T.) y la degeneración de cardiomiocitos (\*) en la tinción de picrosirius y con microscopía polarizada. Barra de escala = 100µm.

Por otra parte, en el tejido cardiaco perteneciente al paciente III.21 se podían identificar zonas miocárdicas degenerativas junto a zonas más preservadas. Los hallazgos degenerativos estaban principalmente asociados al estrato subepicárdico del

miocardio, donde la tinción de picrosiruis mostró un incremento de la desorganización de las fibras de colágeno, la infiltración de tejido adiposo y grupos de cardiomiocitos con cambios degenerativos. Sin embargo, estos hallazgos no se acompañaban de reacción inflamatoria. En las zonas de miocardio preservado los hallazgos eran superponibles al miocardio control, sin embargo, el grosor de las células era irregular y los espacios perinucleares se encontraban aumentados con un núcleo relativamente normal. Curiosamente, el sarcoplasma de estas células se teñía débilmente, con aparentemente menos discos intercalares que el tejido control. Además, la tinción de hematoxilina de Heidenhain, que tiñe especialmente las miofibrillas, confirmó la presencia de menos miofibrillas contráctiles en el portador de la variante. Las miofibrillas eran menos abundantes, peor organizadas y menos compactas.

El análisis inmunohistoquímico de la desmina mostró una distribución homogénea e intensa de la tinción por el sarcoplasma de ambos tejidos, aunque más llamativa en el tejido control. Además, no se objetivaron agregados citoplasmáticos de desmina [Figura 4.10].

Paralelamente se analizaron algunas de las proteínas más importantes de la unión celular a nivel de los discos intercalares: desmoplaquina, placoglobina y conexina-43. Todas se objetivaron en ambos tejidos cardíacos, confirmando la presencia de estas estructuras de unión celular. Sin embargo, la desmoplaquina y la placoglobina se encontraban débilmente teñidos en el tejido miocárdico del sujeto III.21, en comparación con el control. La intensidad de señal y distribución de la conexina-43 era semejante en ambos tejidos, como previamente ha sido reportado para la variante *DES-p.A120D* [93].

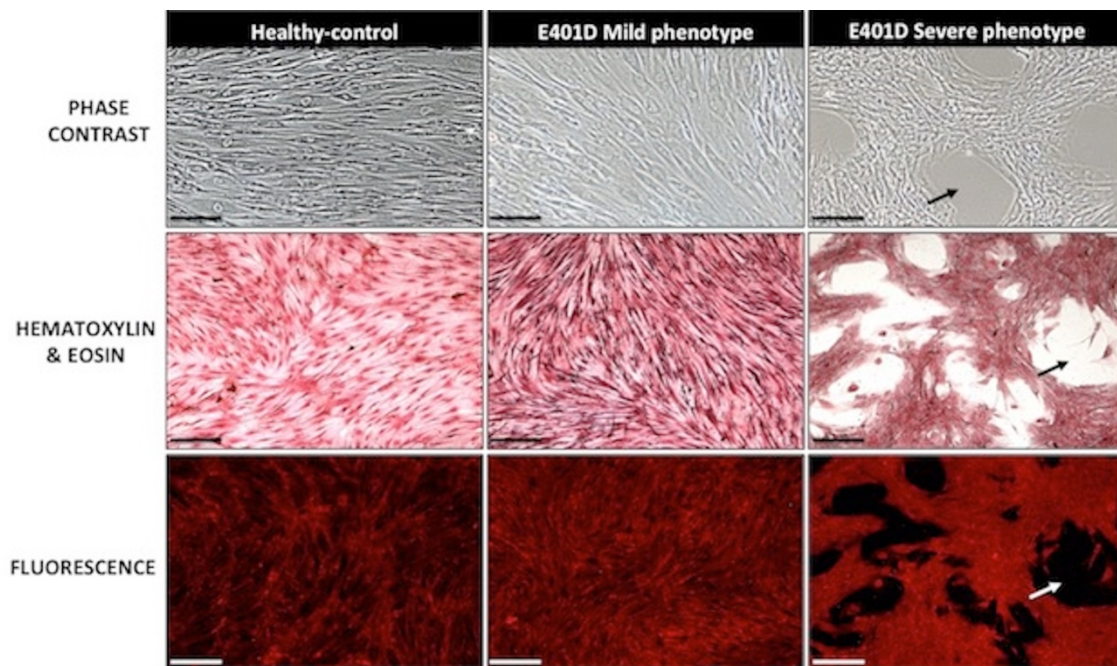


**Figura 4.10. Análisis histológico del tejido cardíaco del sujeto III.21.** Análisis inmunohistoquímico de desmina y los complejos de unión celulares. Las reacciones positivas se muestran en marrón. Barra de escala = 100 $\mu$ m.



## II. Estudio de células madre mesenquimales y qRT-PCR.

Las CMTAs obtenidas de las biopsias de tejido graso subcutáneo abdominal de tres miembros distintos de la familia fueron cultivadas de forma independiente. En cada uno de los cultivos las células fueron capaces de crecer y proliferar ex vivo bajo condiciones estándar de cultivo [Figura 4.11].

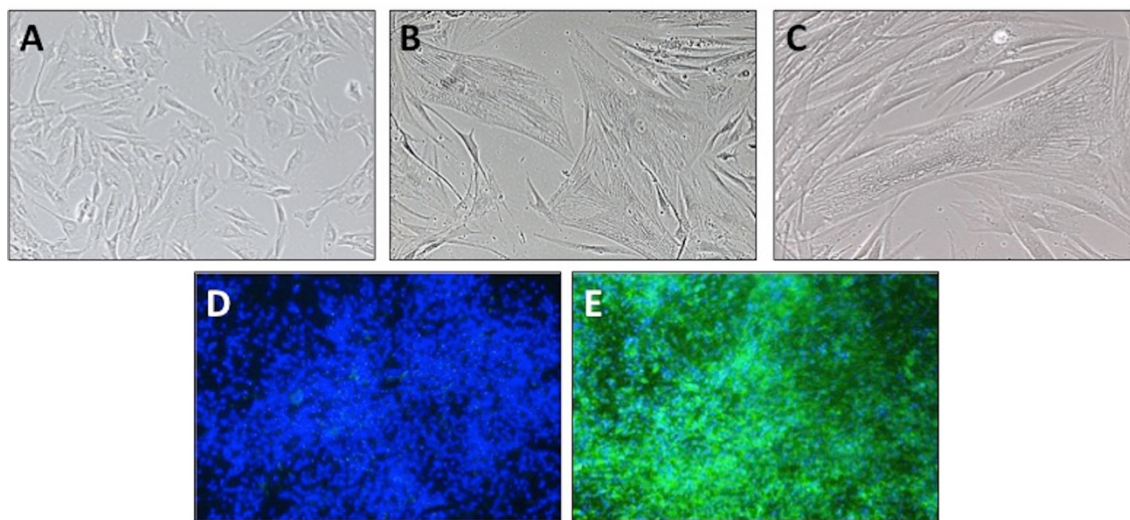


**Figura 4.11. Análisis de la diferenciación de cmtas.** Ex vivo adherencia y patrón de crecimiento de las CMTAs aisladas de los tres miembros de la familia estudiados analizadas mediante microscopía de contraste de fases, tinción de hematoxilina y eosina, y microscopía de fluorescencia. Se puede observar la morfología típica elongada y en forma de huso de las células correspondientes al sujeto control y al portador con fenotipo leve, y el patrón reticular mostrado en el caso del sujeto portador con fenotipo grave, dejando grandes espacios de la superficie de cultivo sin cubrir (flechas). Barra de escala =200  $\mu$ m. CMTAs= células mesenquimales de tejido adiposo.

Las CMTAs del cultivo derivado del paciente control (fenotipo negativo, genotipo negativo) mostraron un crecimiento y morfología característica de las células mesenquimales, siendo células alargadas, aplanadas y en forma de huso. Como es propio de las células mesenquimales y era esperable, el crecimiento de las células fue confluyente logrando cubrir por completo la superficie del matraz de cultivo. De forma similar al caso control, las CMTAs procedentes del paciente portador de la variante y fenotipo leve mostraron un crecimiento con una morfología y patrón semejante. Sin embargo, este crecimiento y proliferación era marcadamente más lento. Por otro lado, las CMTAs del paciente con fenotipo grave y portador de la variante (IV.31) crecieron más lento que en los otros dos casos. Aunque presentaban una forma clásica mesenquimal, su patrón de crecimiento era muy diferente. De hecho, presentaron una gran dificultad para adherirse a la superficie del cultivo, derivando un patrón reticular de

células con adhesiones entre ellas más que a la superficie de cultivo.

Cuando las CMTAs fueron diferenciadas en cardiomiocitos, algunas células pudieron ser observadas adquiriendo una morfología típica de cardiomiocito, aunque este porcentaje fue bajo. Las células diferenciadas estaban caracterizadas por un citoplasma grueso y un citoesqueleto bien organizado [Figura 4.12]. La diferenciación fue confirmada mediante inmunofluorescencia del marcador cardíaco TNNT2, presente en la gran mayoría de las células.



**Figura 4.12. CMTAs diferenciadas hacia cardiomiocitos.** En el panel de imágenes superior se ha empleado microscopía de contraste de fases en las CMTAs no diferenciadas (A) y en diferenciadas (B y C). En el panel inferior se muestra la inmunofluorescencia del marcador TNNT2 en CMTAs no diferenciadas (D) y diferenciadas (E).

Sobre este grupo celular se realizó un análisis de qRT-PCR. Este análisis demostró que la expresión del gen *DES* estaba incrementada más de 23 veces en las células diferenciadas en el caso control. Sin embargo, este incremento de expresión no se objetivó en la diferenciación de las células procedentes de los portadores de la variante *DES*-p.Glu401Asp [Figura 4.13].



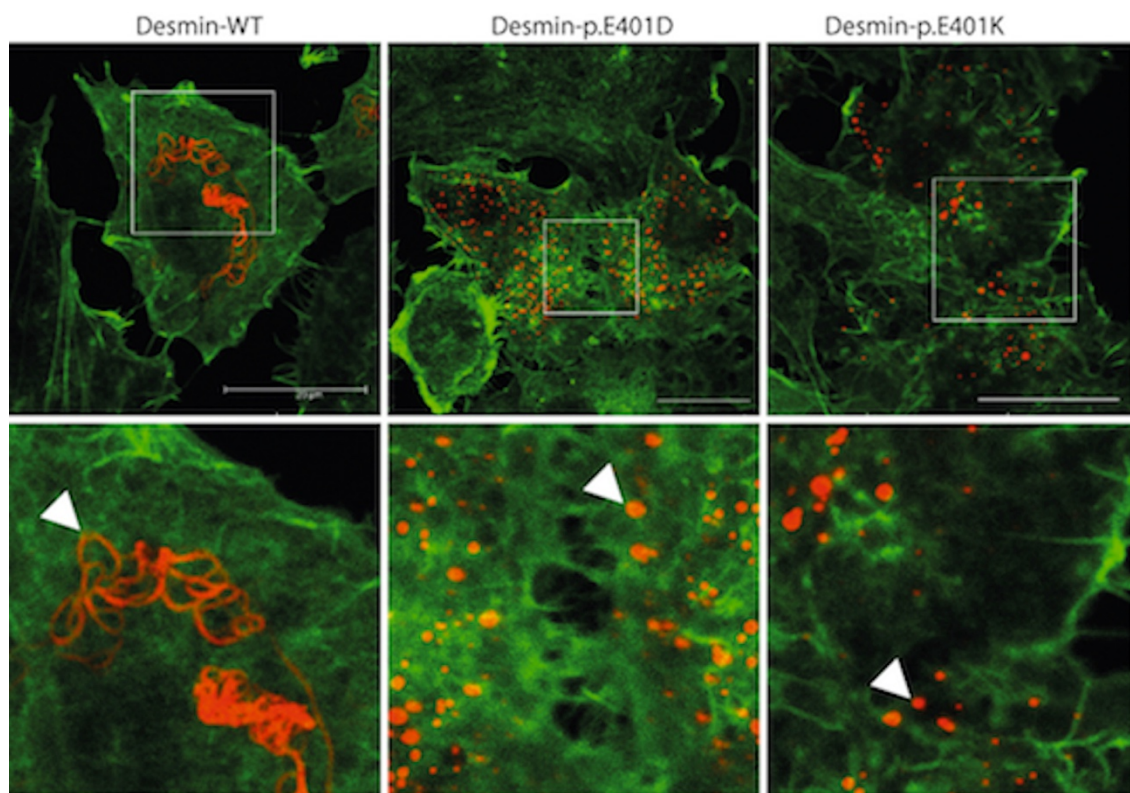
Gene	Mild-Phenotype vs. Healthy-Control	Severe-Phenotype vs. Healthy-Control
ABCC9	4,32768	0,86106
ACTN1	0,36636	0,52371
ACTR1A	0,64766	0,57178
AFAP1	1,45183	0,94535
AKAP9	0,23164	0,41312
ANK2	0,38679	0,46873
ATP2A2	0,3536	0,32125
ATP2B4	0,49358	0,97577
CACNA1C	0,20212	0,2703
CACNA1D	0,06076	0,54382
CACNA1G	0,96445	0,15366
CACNA2D1	0,3289	0,30276
CACNB2	4,05873	0,15948
CALD1	0,1821	0,40811
CALM1	0,77329	0,79171
CALM2	0,31902	0,94116
CALM3	0,37843	0,78607
CAV3	0,48896	0,15495
CCNA1	0,29103	0,10184
CD36	5,49962	0,72231
DES	0,00361	0,02895
DSP	0,1792	0,73246
GAPDH	1	1
GJA1	0,0961	0,03799
GJA5	0,35027	0,10962
GPD1L	0,43803	0,56477
HAND2	0,43266	0,3182
ITGA2	2,80462	2,68293
ITGA7	0,08457	0,01089
JUP	0,07756	6,78413
KCNA5	1,12118	0,23189
KCNE1	0,42075	0,05139
KCNE1L	0,42671	0,30235
KCNE2	0,16991	0,99062
KCNE3	0,04464	1,08117
KCNH2	0,36499	0,13576
KCNJ2	3,79161	0,12035
KCNJ8	1,13837	0,46946
KRT18	0,66643	2,33748
KRT8	0,42898	0,42499
LAMA1	0,14111	0,18654
LAMA2	0,19148	0,30703
LAMA3	1,30486	25,6674
LAMA5	0,11125	0,3885
LAMB1	0,24282	0,67949
LAMB3	5,031	3,35547
LAMC2	0,50877	12,87661
LAMC3	43,35802	72,74506
LAMP2	0,3967	0,40589
LMNA	0,60073	0,83252
MST1R	0,6644	0,2444
NKX2-5	4,54454	0,26178
NPPA	1,10368	0,26172
NTN1	7,39271	4,13974
PLP1	0,60079	0,07703
PRKAG2	0,32955	0,43151
RANGRF	0,46279	0,98886
SCN1B	0,78088	3,58001
SCN3B	0,44988	0,24171
SCN4B	0,25705	0,95074
SNTA1	1,27253	1,67713
TGFB1	0,30877	1,00793
THY1	0,0618	1,164
TNF	0,87931	0,17522
TNNT2	0,01643	0,01114
TRPM4	0,70643	0,41484
TUBA1A	0,36721	1,18692
TUBA3C	0,9077	0,11774
TUBA4A	1,54778	3,58712
TUBB3	0,76403	0,30394
VIM	1,61242	5,56528

**Figura 4.13. Heatmap con el análisis cuantitativo de la expresión génica.** Análisis cuantitativo del ARN expresado los patrones de expresión génica tras la diferenciación a cardiomiocitos entre los dos portadores de la variante en desmina y el paciente control. En rojo se expresa la expresión más baja y en verde la más alta.

### III. Estudio de plásmidos y microscopía confocal.

Ya es conocido el importante rol de mutaciones en desmina en la formación de filamentos intermedios *in vitro* [116], de forma que con el estudio de plásmidos se propone comprobar si este escenario también es aplicable a la mutación p.Glu401Asp.

Para ello se han empleado la transfección de la variante en células SW13, incapaces de sintetizar filamentos intermedios endógenos. El resultado de este análisis confirmó que tanto la variante p.Glu401Asp como la variante p.Glu401Lys (previamente reportada en la literatura [95]) alteraban la estructura de los filamentos intermedios en las células transfectadas. Ambas mutaciones condujeron a la aparición de agregados citoplasmáticos de desmina, mientras que la célula control con desmina *wild-type* formó filamentos intermedios normales [Figura 4.14].



**Figura 4.14. Localización de la desmina en las células sw13 transfectadas.** Es llamativo como las células transfectadas con la variante p.Glu401Asp y la variante p.Glu401Lys forman agregados citoplasmáticos de desmina (flechas blancas) mientras que la forma *wild-type* (WT) forma filamentos intermedios de diferente forma y tamaño. En verde tinción de conjugado de fluoresceína isothiocianato y faloidina y en rojo la desmina. Barra de escala =20  $\mu$ m.

---

## 5. DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

La MCA se ha considerado clásicamente una enfermedad “desmosomal” debido a que los genes más frecuentemente afectados en esta entidad y relacionados con la forma clásica, son aquellos que codifican las proteínas del desmosoma cardiaco. Sin embargo, con el desarrollo de técnicas de análisis genético como la *NGS* otros muchos genes no desmosomales han sido descritos en relación con el desarrollo de MCA: *TMEM43* [19], *TGFβ3* [18], *PLN* [20] y *DES* [22] entre otros.

De forma paralela al descubrimiento de nuevas bases genéticas de la enfermedad, se ha ido conociendo que se trata de un trastorno con afectación predominante biventricular y, en ocasiones, de ventrículo izquierdo exclusivamente, lejos de ser un proceso aislado del ventrículo derecho. Es conocida la frecuente relación de la afectación ventricular izquierda, MSC y variantes patogénicas en *DSP* [13]. Esta ampliación del rango fenotípico de la enfermedad, así como su expresividad clínica y penetrancia variables, conduce a que en muchas ocasiones el diagnóstico sea un reto clínico debido al solapamiento fenotípico con otras entidades, como la miocardiopatía dilatada. Además, sabemos que también existe una considerable heterogeneidad genética, de forma que diferentes mutaciones dentro del mismo gen pueden conducir al desarrollo de distintas miocardiopatías. Debido a la heterogeneidad fenotípica de las miocardiopatías, incluyendo fases subclínicas, la correcta evaluación tras la MSC de una persona joven siempre debe incluir la realización de una autopsia lo más exhaustiva posible siguiendo protocolos específicos, ya que el conocimiento de la causa puede tener una gran trascendencia, como en nuestro estudio.

Como ya se ha comentado previamente, las mutaciones en *DES* se han relacionado con frecuencia con fenotipos cardiacos como la miocardiopatía dilatada o la miocardiopatía restrictiva, el desarrollo de bloqueo auriculoventricular, y miopatía esquelética periférica [117]. En la mayor parte de trabajos que describen la asociación de mutaciones en *DES* con el desarrollo de MCA se describen casos aislados, familias pequeñas con dificultad para demostrar la cosegregación o con ausencia de información clínica o funcional exhaustiva [83-88].

Este trabajo muestra evidencia sólida de la patogenicidad de la mutación *novel/DES-pGlu401Asp* como responsable del desarrollo de MCA biventricular con predominio del ventrículo izquierdo, sin alteraciones de la conducción auriculoventricular ni afectación del sistema muscular esquelético. Hasta donde sabemos, se trata de la familia más extensa estudiada con una mutación en *DES*. El estudio familiar muestra de

forma robusta la cosegregación entre el fenotipo y el genotipo, hallándose en aquellos sujetos portadores de datos de enfermedad, permaneciendo los no portadores sin trazos eléctricos o estructurales de este trastorno miocárdico. Esta es información relevante para la validación de una variante como patogénica. Además, se trata de la primera descripción sólida de una desminopatía presentándose en forma clínica de MCA, ya que los datos previos se limitaban a casos aislados [90-94] y sin estudio funcional. En nuestro caso, además de la mencionada robustez clínica de los datos, se complementan los hallazgos con un interesante estudio funcional que postula la vía patogénica para explicar este infrecuente fenotipo debido a una mutación en *DES*.

Las variantes genéticas que derivan en el truncamiento de la proteína con frecuencia se asocian con un efecto deletéreo sobre la función de la misma, y por tanto, generalmente son consideradas patogénicas. Sin embargo, las mutaciones *missense* entrañan mayor dificultad en su interpretación, estando muchas veces presentes en población control [118]. La variante *DES*-p.Glu401Asp, identificada en el caso índice y familiares con MCA, no se encuentra presente en controles sanos y tampoco está reportada en bases de datos públicas como ClinVar o ExAC. Dada su frecuencia poblacional podemos clasificarla como una mutación. Esta variante recae sobre el segmento 2B del dominio central o *rod domain*, una región altamente conservada en la evolución y zona donde se han descrito la mayoría de las variantes hasta la fecha [119]. Además estudios *in silico* realizados en esta variante pronostican un efecto deletéreo en la proteína. Esta información recogida gracias al análisis poblacional y bioinformático de la mutación apoya la patogenicidad de la misma.

El perfil clínico del paciente portador de la variante p.Glu401Asp en *DES* muestra una afectación biventricular con predominio del ventrículo izquierdo o una forma casi exclusiva de ventrículo izquierdo. Esto se justifica en la identificación de hallazgos en las pruebas complementarias, especialmente la RM, de afectación del ventrículo izquierdo (alteraciones segmentarias de la contractilidad, RPG de gadolinio) con cámaras derechas normales. Esto sugiere una afectación más temprana de las cámaras izquierdas. La afectación ventricular consiste en una afectación leve del diámetro y función sistólica del ventrículo izquierdo. En resonancia magnética se objetivó fibrosis en la totalidad de los pacientes, presentando la mayor parte de ellos un patrón característico de RPG en comparación con un grupo control de pacientes con MCA.

Aunque entre nuestra familia son pocos los pacientes que reúnen criterios compatibles con el diagnóstico definitivo de MCA, este hecho probablemente esté en relación con la falta de criterios específicos para las formas de predominio en ventrículo

izquierdo de la enfermedad. La penetrancia de la enfermedad es completa y la distinta expresividad fenotípica es amplia, con un extenso rango de manifestaciones clínicas. En nuestra población se han identificado desde pacientes asintomáticos con solo alteraciones electrocardiográficas a pacientes fallecidos por MSC o insuficiencia cardiaca avanzada. La heterogeneidad clínica, incluso dentro de la misma familia, es un aspecto común entre las miocardiopatías y canalopatías hereditarias[120]. Como explicación a esto se han propuesto factores genéticos, epigenéticos y medioambientales, como moduladores de la expresión de la enfermedad. Dentro de nuestra misma familia el perfil arrítmico no queda bien definido por los criterios clásicos de la FEVI o FEVD gravemente reducida en ausencia de arritmias ventriculares o síncope. Esto se basa en la MSC del sujeto IV.33, un varón sin criterios clásicos de alto riesgo arrítmico. Este evento grave apoya que pacientes con esta mutación estén bajo un elevado riesgo arrítmico en ausencia de disfunción sistólica ventricular grave, arritmias ventriculares sostenidas o síncope y magnifican el potencial valor de la RPG como marcador de riesgo.

Uno de los factores clásicos que han puesto en relación con la diferente expresividad clínica es el sexo. Recientes publicaciones han sugerido una mayor severidad de la enfermedad en el sexo varón [54]. Este hecho sí ha podido corroborarse en el caso de esta familia, ya que las 4 MSC y los dos trasplantes cardiacos acontecieron en pacientes varones. Además, como refleja la Figura 4.5, los eventos ocurren significativamente de forma precoz en varones que en mujeres, algo ya reportado también para otras mutaciones en el gen *DES* [121-122]. Según nuestros datos los eventos cardiacos en los portadores de la variante p.Glu401Asp son más frecuentes en hombres entre los 20 y 40 años, especialmente la MSC, por lo que el implante de desfibrilador automático implantable debe ser considerado con mayor precocidad. Además, recientemente se ha descrito que episodios de miocarditis potencialmente pueden modular la distinta expresividad fenotípica de la MCA, sugiriendo una mayor susceptibilidad genética o predisposición al desarrollo de este fenómeno como una fase activa de la enfermedad [123]. En nuestro trabajo no se objetivaron episodios sugerentes de miocarditis entre los portadores, así como tampoco se identificaron datos histológicos sugerentes.

A pesar de las distintas hipótesis acerca de factores moduladores de la expresión clínica, el conocimiento de los mecanismos que conducen al desarrollo de este fenotipo concreto es escaso. Sin duda, parece lógico que dada la característica relación de la desmina como nexo de unión entre el citoesqueleto celular y proteínas de unión celular

como la desmoplaquina (área composita, desmosoma), la presencia de alteraciones a nivel de la proteína desmina pueda conducir a deficiencias en la unión celular y de los mecanismos de mecanotransducción celulares. Las recientes asociaciones de *LMNA* [21], de *FLNC* [79], y en concreto de *DES* [22], con un fenotipo de MCA abren una puerta a la hipótesis de una estructura común continua desde el desmosoma hasta la membrana nuclear, donde los procesos de mecanotransducción y mecanosensibilidad en el cardiomiocito puede ser el punto en común en el desarrollo de este trastorno en el espectro de genes involucrados [Figura 5.1]

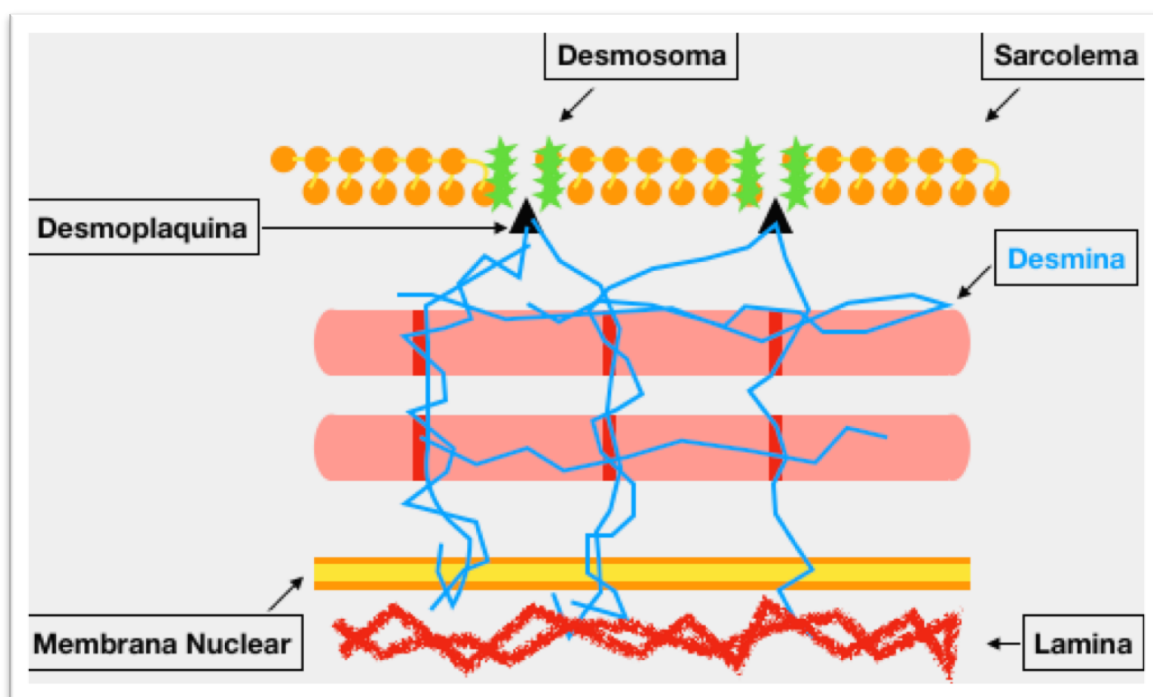


Figura 5.1. Representación del continuo estructural entre los distintos complejos celulares formado por zonas de adhesión celular, citoesqueleto, sarcolema y núcleo celular.

Estos mecanismos de mecanotransducción y mecanosensibilidad se generan en proteínas que traducen cambios en la superficie celular en una secuencia química, pudiendo modificar, por ejemplo, el flujo de iones a través canales iónicos o cambios conformacionales en el núcleo celular. En este aspecto, la desmina (filamento intermedio más abundante en el miocardio) ejerce una función más allá de la simple integridad estructural, participando en procesos activos como la señalización o la regulación génica [124].

Todos estos procesos de señalización celular, regulación génica y mantenimiento estructural celular recae sobre un amplio espectro de proteínas, canales iónicos e interacciones entre ellos. Un ejemplo de esto son los trabajos *in vitro* en *LMNA*, mostrando su interacción con las corrientes de sodio y como el tratamiento con



bloqueantes de los canales de sodio pueden reducir la carga arrítmica [125]. Con la finalidad de cuantificar la expresión génica de distintos componentes celulares en portadores de la variante en *DES* respecto a población control, en nuestro trabajo se realizó un aislamiento y diferenciación de CMTAs hacia cardiomiocitos según lo previamente descrito [ver capítulo 3, evaluación funcional]. Tras conseguir esta diferenciación, se realizó una cuantificación del ARN celular en los diferentes cultivos. Con esta técnica novedosa podemos identificar la diferente expresión de múltiples genes implicados con el desarrollo de miocardiopatías, canalopatías o funciones clave del funcionamiento celular. Sin embargo, la información procedente de este análisis *in vitro* debe interpretarse con cautela ya que es impredecible si los hallazgos se traducen al corazón *in vivo* y los niveles de ARN tampoco tienen que corresponderse necesariamente con los niveles de proteína funcional en el miocardio.

Del análisis destacó en primer lugar que la expresión de desmina se encontraba claramente disminuida en los cultivos de pacientes portadores de la variante *DES-p.Glu401Asp*. Este hecho, esperable por otra parte, es clave para validar el análisis. En segundo lugar, se detectaron alteraciones significativas entre los diferentes cultivos en relación con la expresión génica de una gran variedad de genes con marcado potencial arrítmico como canales de potasio y de sodio. Por ejemplo, los genes *KCNH2* y *KCNE1* se encontraban expresados en menor cantidad (al menos la mitad) respecto a los niveles basales. Ambos genes se han relacionado en el desarrollo de síndrome de QT largo. *KCNH2* codifica para un canal de potasio asociado clásicamente al síndrome de QT largo tipo 2. Por su parte *KCNE1* es una proteína moduladora del canal de potasio codificado por *KCNQ1* (relacionada con síndrome de QT largo tipo 1) [126], pudiendo participar su actividad y, por tanto, su expresividad clínica. Además *KCNE1* se relaciona con síndrome de QT largo tipo 5 *per se*. También se identificó un aumento (al menos el doble) en la expresión del canal de sodio *SCN1B* en los sujetos afectados, que codifica una subunidad beta del canal de sodio, relacionado con el desarrollo de síndrome de Brugada y trastornos de la conducción cardiaca en humanos [127]. Es conocida la relación entre la corriente de sodio y la MCA [128] y, aunque con la necesidad de nuevos estudios más amplios y con técnicas orientadas al estudio *in vitro* de las arritmias (técnicas de patch-clamp, mapeo de voltaje óptico), alteraciones a este nivel podrían explicar el alto riesgo arrítmico observado. Por tanto, podemos concluir que la variabilidad en la distinta expresión génica de múltiples canales y genes estructurales pueden ser la fuente de un mayor potencial riesgo arrítmico o predisponer al desarrollo de los mismos y, paralelamente, pueden explicar la variable expresividad clínica vista dentro de la misma familia.

En consonancia con lo previamente descrito, la variante p.Glu401Asp recae en el dominio 2B, una zona crítica en la que una alteración puede producir una ruptura en los puentes iónicos intra e interhelicoidales de los dímeros de desmina, aspecto ya reportado para la variante p.Glu401Lys [95]. De forma similar, la variante p.Glu401Asp puede afectar a la integridad estructural celular y, en consecuencia, de las estructuras de unión celular, factor considerado crucial en el desarrollo de MCA. Con el objetivo de caracterizar a nivel celular las potenciales interacciones afectadas en esta entidad se realizaron estudios de histología e inmunohistoquímica así como la valoración de CMTAs diferenciadas a cardiomiocitos.

Inicialmente, el análisis histológico del tejido miocárdico del sujeto III.21, sometido a trasplante cardiaco por insuficiencia cardiaca avanzada, demostró la presencia de sustitución del miocardio funcional por tejido fibroadiposo, especialmente a nivel del subepicardio ventricular. Ésta es una característica propia de la MCA, siendo un proceso progresivo desde el epicardio hacia el endocardio, pudiendo hacerse transmural [39]. En línea con la hipótesis de un continuo estructural desde la membrana nuclear hasta la membrana plasmática, las estructuras contráctiles de estas células se encontraban pobremente organizadas y eran escasas. Además, estructuras clave en la adhesión celular como la placoglobina y la desmoplaquina se encontraban disminuidas en el tejido miocárdico [Figura 4.10]. Aunque inicialmente se reportó la deficiencia de placoglobina en las zonas de unión celular como un dato en clara relación con la MCA, posteriormente se ha podido constatar en otras miocardiopatías [45], siendo, por tanto, un hallazgo inespecífico. La transición entre la zona central de la desmina o *rod domain* y la cola de la proteína (posición de la variante p.Glu401Asp) contiene zonas de ensamblaje relacionados con la unión con la desmoplaquina, la cual se ha demostrado afectada y podría guardar relación con el elevado riesgo arrítmico relacionado con la entidad [13]. Por otra parte, no se identificaron alteraciones en la expresión de la conexina-43, como ya ha sido previamente publicado [129]. Por otro lado, el análisis de los cultivos de células madre mesenquimales de tejido adiposo (CMTAs) mostró diferencias precozmente entre los distintos grupos. Especialmente interesantes fueron los defectos en el patrón de crecimiento y defectos de adhesión observados entre las CMTAs procedentes del portador con fenotipo grave de la enfermedad.

Por tanto, el conjunto de información obtenida de la histología, inmunohistoquímica y los defectos de crecimiento y adhesión celular mostrados en los cultivos de CMTAs, van en línea con el importante rol de las relaciones de la desmina con las estructuras de adhesión celular (desmosoma, área composita), los mecanismos

de regulación génica y el mantenimiento de la integridad estructural celular. Como ya se ha mencionado previamente, la relación de la porción C-terminal de la desmina (donde reside la variante p.Glu401Asp) con la desmoplaquina es estrecha y en la histología se ha demostrado afectada. Además, también sabemos que las variantes patogénicas en *DSP* se asocian con formas de predominio ventricular izquierdo y alto riesgo arrítmico. Esta relación “desmina-desmoplaquina”, afectada en nuestros pacientes, parece tener un peso elevado en el desarrollo de este fenotipo concreto.

Finalmente, un aspecto reportado en otros trabajos previos en relación con mutaciones en *DES* es la formación de agregados citoplasmáticos anómalos, e incluso su detección con anticuerpos anti desmina se ha considerado *gold standard* para el diagnóstico de desminopatía [130]. Sorprendentemente, estos agregados no se pudieron identificar en el análisis histológico del tejido miocárdico del paciente III.21. Sin embargo, estos agregados no son un hallazgo sistemático en pacientes con desminopatía, como se describió en el caso de la mutación c.1289-2A>G [131]. Por otra parte, estos agregados sí pudieron demostrarse en el cultivo de células SW13, donde quedaron perfectamente demostrados [Figura 4.14]. Esta disparidad en las observaciones puede guardar relación con la condición de heterocigosis del paciente. Otra explicación alternativa es que el empleo de un potente promotor *in vitro* (citomegalovirus) pueda intensificar el defecto provocado por la mutación y facilitar el proceso de generación de estos agregados. Una interpretación diferente se apoyaría en la situación clínica del paciente, ya que podría haber alteraciones estructurales avanzadas sin el depósito de estos agregados *in vivo* [132]. Finalmente, es posible que esta mutación, p.Glu401Asp, no genere agregados citoplasmáticos basando su mecanismo patogénico en el deterioro de la formación adecuada de miofibrillas, la organización tridimensional en el sarcoplasma y su unión con proteínas desmosomales (desmoplaquina fundamentalmente) [132].



---

## 6. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

1. La mutación p.Glu401Asp en el gen *DES* es causal para el desarrollo de MCA biventricular con predominio del ventrículo izquierdo, penetrancia completa y en ausencia de miopatía esquelética o trastornos avanzados de la conducción auriculoventricular. Además, se caracteriza por el desarrollo de una gran cantidad de fibrosis miocárdica en resonancia magnética, presentando un patrón de fibrosis miocárdica circunferencial característico.

2. Esta variante se relaciona con el acontecimiento precoz de arritmias ventriculares y el desarrollo progresivo de insuficiencia cardiaca avanzada, especialmente en varones menores de 40 años.

3. El mecanismo patogénico propuesto es la alteración de la mecanotransducción y mecanosensibilidad, derivada de la incapacidad para formar un adecuado ensamblaje del dímero de desmina. Esto conduciría a la disrupción del continuo estructural formado con las proteínas de membrana (desmoplaquina) responsables de la adhesión celular y estructuras clave citoplasmáticas como el sarcómero y el núcleo celular.

4. Los fallos en la conexión inter-estructuras podría conducir a la variabilidad en la expresión génica de una variedad de proteínas estructurales del miocardio y canales iónicos que podrían explicar el fenotipo y su potencial arrítmico.





---

## 7. REFERENCIAS

## 7. REFERENCIAS

1. Lancisi GM. De motu cordis et aneurysmatibus. Caput V. Naples: excudebat Felix-Carolus Musca; 1736.
2. Laennec RTH. A treatise on the diseases of the chest and on mediate auscultation. Paris: Brosseau & Chaudé: 1819.
3. Uhl HSM. A previously undescribed congenital malformation of the heart: almost total absence of the myocardium of the right ventricle. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1952;91:197-209.
4. Dalla Volta S, Battaglia G, Zerbini E. Auricularization' of right ventricular pressure curve. *American Heart Journal*. 1961;61,25-33. [http://doi.org/10.1016/0002-8703\(61\)90513-0](http://doi.org/10.1016/0002-8703(61)90513-0)
5. Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, et al. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation*. 1982;65:384 LP-398. <http://circ.ahajournals.org/content/65/2/384.abstract>.
6. Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. Right Ventricular Cardiomyopathy and Sudden Death in Young People. *N Engl J Med*. 1988;318:129-133. doi:10.1056/NEJM198801213180301.
7. Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Scampardonis G. Familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia associated with palmoplantar keratosis [letter]. *N Engl J Med*. 1988;319:174-6.
8. Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, et al. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol*. 1996;135:215-225. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858175>. Accessed March 18, 2018.
9. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*. 2000;355:2119-24. doi:10.1016/S0140-6736(00)02379-5.
10. Carvajal-Huerta L. Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39:418-21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738775>.
11. Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, et al. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions

and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2761-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063735>.

12. Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, et al. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2002;71:1200-6. doi:10.1086/344208.

13. Bauce B, Basso C, Rampazzo A, et al. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations. *Eur Heart J.* 2005;26:1666-75. doi:10.1093/eurheartj/ehi341.

14. Gerull B, Heuser A, Wichter T, et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2004;36:1162-4. doi:10.1038/ng1461.

15. Pillichou K, Nava A, Basso C, et al. Mutations in Desmoglein-2 Gene Are Associated With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation.* 2006;113:1171-9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583674.

16. Syrris P, Ward D, Evans A, et al. Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Associated with Mutations in the Desmosomal Gene Desmocollin-2. *Am J Hum Genet.* 2006;79:978-84. doi:10.1086/509122.

17. Basso C, Czarnowska E, Della Barbera M, et al. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J.* 2006;27:1847-54. doi:10.1093/eurheartj/ehl095.

18. Beffagna G, Occhi G, Nava A, et al. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res.* 2005;65:366-73. doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.005.

19. Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AFM, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet.* 2008;82:809-21. doi:10.1016/j.ajhg.2008.01.010.

20. van der Zwaag PA, van Rijsingen IAW, Asimaki A, et al. Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:1199-207. doi:10.1093/eurjhf/hfs119.

21. Quarta G, Syrris P, Ashworth M, et al. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2012;33:1128-36. doi:10.1093/eurheartj/ehr451.
22. van Tintelen JP, Van Gelder IC, Asimaki A, et al. Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene. *Heart Rhythm*. 2009;6:1574-83. doi:10.1016/j.hrthm.2009.07.041.
23. Groeneweg JA, van der Zwaag PA, Olde Nordkamp LRA, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy according to revised 2010 task force criteria with inclusion of non-desmosomal phospholamban mutation carriers. *Am J Cardiol*. 2013;112:1197-206. doi:10.1016/j.amjcard.2013.06.017.
24. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, McKenna WJ. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. *Circulation*. 2007;115:1710-20. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660241.
25. Marcus FI, Zareba W, Calkins H, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia clinical presentation and diagnostic evaluation: Results from the North American Multidisciplinary Study. *Heart Rhythm*. 2009;6:984-92. doi:10.1016/j.hrthm.2009.03.013
26. Nava A, Bauce B, Basso C, et al. Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2226-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11127465>.
27. Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med*. 1998;339:364-9. doi:10.1056/NEJM199808063390602.
28. Hedrich O, Estes NAM, Link MS. Sudden cardiac death in athletes. *Curr Cardiol Rep*. 2006;8:316-22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16956445>.
29. Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, et al. Genotype-phenotype assessment in autosomal recessive arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Naxos disease) caused by a deletion in plakoglobin. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1477-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691526>.

30. te Riele ASJM, James CA, Rastegar N, et al. Yield of serial evaluation in at-risk family members of patients with ARVD/C. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:293-301. doi:10.1016/j.jacc.2014.04.044.
31. Kaplan SR, Gard JJ, Protonotarios N, et al. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm*. 2004;1:3-11. doi:10.1016/j.hrthm.2004.01.001.
32. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Prasad SK, et al. Left-Dominant Arrhythmogenic Cardiomyopathy: An Under-Recognized Clinical Entity. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2175-87. doi:10.1016/j.jacc.2008.09.019.
33. Rowland E, McKenna WJ, Sugrue D, Barclay R, Foale RA, Krikler DM. Ventricular tachycardia of left bundle branch block configuration in patients with isolated right ventricular dilatation. Clinical and electrophysiological features. *Br Heart J*. 1984;51:15-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6689916>.
34. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J*. 1994;71:215-8. doi:10.1136/HRT.71.3.215.
35. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation*. 2010;121:1533-41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.840827.
36. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113:1807-16. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287.
37. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2007;29:270-6. doi:10.1093/eurheartj/ehm342.

38. Arbustini E, Narula N, Tavazzi L, et al. The MOGE(S) Classification of Cardiomyopathy for Clinicians. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:304-18. doi:10.1016/j.jacc.2014.05.027.
39. Corrado D, Basso C, Judge DP. Arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2017;121. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309345.
40. Basso C, Thiene G, Corrado D, Angelini A, Nava A, Valente M. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? *Circulation*. 1996;94:983-91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790036>.
41. Basso C, Thiene G. Adipositas cordis, fatty infiltration of the right ventricle, and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Just a matter of fat? *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:37-41. doi:10.1016/j.carpath.2004.12.001.
42. Valente M, Calabrese F, Thiene G, et al. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 1998;152:479-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466574>.
43. Pilichou K, Mancini M, Rigato I, et al. Nonischemic Left Ventricular Scar: Sporadic or Familial? Screen the Genes, Scan the Mutation Carriers. *Circulation*. 2014;130:e180-e2. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012515.
44. Basso C, Ronco F, Marcus F, et al. Quantitative assessment of endomyocardial biopsy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an in vitro validation of diagnostic criteria. *Eur Heart J*. 2008;29:2760-71. doi:10.1093/eurheartj/ehn415.
45. Asimaki A, Tandri H, Duffy ER, et al. Altered desmosomal proteins in granulomatous myocarditis and potential pathogenic links to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:743-52. doi:10.1161/CIRCEP.111.964890.
46. Peters S. Long-term follow-up and risk assessment of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: personal experience from different primary and tertiary centres. *J Cardiovasc Med*. 2007;8:521-6. doi:10.2459/01.JCM.0000278450.35107.b3.
47. Corrado D, Wichter T, Link MS, et al. Treatment of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. *Circulation*. 2015;132:441-53. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017944.
48. Calkins H, Corrado D, Marcus F. Risk Stratification in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation*. 2017;136:2068-82. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030792.

49. Hulot J-S, Jouven X, Empana J-P, Frank R, Fontaine G. Natural history and risk stratification of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;110:1879-84. doi:10.1161/01.CIR.0000143375.93288.82.
50. Pinamonti B, Dragos AM, Pyxaras SA, et al. Prognostic predictors in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: results from a 10-year registry. *Eur Heart J*. 2011;32:1105-13. doi:10.1093/eurheartj/ehr040.
51. Brun F, Groeneweg JA, Gear K, et al. Risk Stratification in Arrhythmic Right Ventricular Cardiomyopathy Without Implantable Cardioverter-Defibrillators. *JACC Clin Electrophysiol*. 2016;2:558-64. doi:10.1016/j.jacep.2016.03.015.
52. Kimura Y, Noda T, Otsuka Y, et al. Potentially Lethal Ventricular Arrhythmias and Heart Failure in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *JACC Clin Electrophysiol*. 2016;2:546-55. doi:10.1016/j.jacep.2016.02.019.
53. Groeneweg JA, Bhonsale A, James CA, et al. Clinical Presentation, Long-Term Follow-Up, and Outcomes of 1001 Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Patients and Family Members. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:437-46. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.001003.
54. Mazzanti A, Ng K, Faragli A, et al. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Clinical Course and Predictors of Arrhythmic Risk. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2540-50. doi:10.1016/j.jacc.2016.09.951.
55. Corrado D, Basso C, Rizzoli G, Schiavon M, Thiene G. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1959-63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662259>.
56. Marcus GM, Glidden D V., Polonsky B, et al. Efficacy of Antiarrhythmic Drugs in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:609-15. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.052.
57. Berruezo A, Fernández-Armenta J, Mont L, et al. Combined endocardial and epicardial catheter ablation in arrhythmogenic right ventricular dysplasia incorporating scar dechanneling technique. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:111-21. doi:10.1161/CIRCEP.110.960740.
58. Tavernier R, Gevaert S, De Sutter J, et al. Long term results of cardioverter-defibrillator implantation in patients with right ventricular dysplasia and malignant ventricular tachyarrhythmias. *Heart*. 2001;85:53-6. doi:10.1136/HEART.85.1.53.

59. Mogensen J, van Tintelen JP, Fokstuen S, et al. The current role of next-generation DNA sequencing in routine care of patients with hereditary cardiovascular conditions: a viewpoint paper of the European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases and members of the European Society of Human Genetics. *Eur Heart J*. 2015;36:1367-70. doi:10.1093/eurheartj/ehv122.
60. Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clin Genet*. 2013;84:453-63. doi:10.1111/cge.12257.
61. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4:1073-81. doi:10.1038/nprot.2009.86
62. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7.20. doi:10.1002/0471142905.hg0720s76.
63. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014 Apr;11:361-2.
64. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2008;1778:572-87. doi:10.1016/J.BBAMEM.2007.07.014.
65. Franke WW, Borrmann CM, Grund C, Pieperhoff S. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur J Cell Biol*. 2006;85:69-82. doi:10.1016/J.EJCB.2005.11.003.
66. Sato PY, Coombs W, Lin X, et al. Interactions Between Ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the Cardiac Intercalated Disc. *Circ Res*. 2011;109:193 LP-201. <http://circres.ahajournals.org/content/109/2/193>.
67. Bao J, Wang J, Yao Y, et al. Correlation of Ventricular Arrhythmias With Genotype in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6:552-6. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000122.
68. Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffitz JE, McKenna WJ. A Novel Dominant Mutation in Plakoglobin Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 2007;81:964-73. doi:10.1086/521633.



69. Dalal D, Molin LH, Piccini J, et al. Clinical Features of Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Associated With Mutations in Plakophilin-2. *Circulation*. 2006;113:1641-9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.568642.
70. Ohno S, Nagaoka I, Fukuyama M, et al. Age-dependent clinical and genetic characteristics in Japanese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circ J*. 2013;77:1534-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514727>.
71. Alcalde M, Campuzano O, Berne P, et al. Stop-gain mutations in PKP2 are associated with a later age of onset of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Sovari AA, ed. *PLoS One*. 2014;9:e100560. doi:10.1371/journal.pone.0100560.
72. Kapplinger JD, Landstrom AP, Salisbury BA, et al. Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:2317-27. doi:10.1016/j.jacc.2010.12.036.
73. Marcus FI, Edson S, Towbin JA. Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:1945-8. doi:10.1016/j.jacc.2013.01.073.
74. Syrris P, Ward D, Asimaki A, et al. Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease. *Eur Heart J*. 2007;28:581-8. doi:10.1093/eurheartj/ehl380.
75. Syrris P, Ward D, Evans A, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet*. 2006;79:978-84. doi:10.1086/509122.
76. Brun F, Barnes C V, Sinagra G, et al. Titin and desmosomal genes in the natural history of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Med Genet*. 2014;51:669-76. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102591.
77. Hodgkinson KA, Parfrey PS, Bassett AS, et al. The impact of implantable cardioverter-defibrillator therapy on survival in autosomal-dominant arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD5). *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:400-8. doi:10.1016/j.jacc.2004.08.068.
78. Cattin M-E, Muchir A, Bonne G. "State-of-the-heart" of cardiac laminopathies. *Curr Opin Cardiol*. 2013;28:297-304. doi:10.1097/HCO.0b013e32835f0c79.

79. Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M, et al. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68:2440-51. doi:10.1016/J.JACC.2016.09.927.
80. Te Riele ASJM, Agullo-Pascual E, James CA, et al. Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis. *Cardiovasc Res.* 2017;113:102-11. doi:10.1093/cvr/cvw234.
81. Tiso N, Stephan DA, Nava A, et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet.* 2001;10:189-94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159936>.
82. Goldman RD, Cleland MM, Murthy P, et al. Inroads into the Structure and Function of Intermediate Filament Networks. *Journal of Structural Biology.* 2012;177:14-23. doi:10.1016/j.jsb.2011.11.017.
83. Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, et al. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95:11312-17.
84. Goldfarb LG, Park K-Y, Cervenáková L, et al. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet.* 1998;19:402-3. doi:10.1038/1300.
85. Hnia K, Ramspacher C, Vermot J, Laporte J. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res.* 2015;360:591-608. doi:10.1007/s00441-014-2016-4.
86. Lazarides E, Hubbard BD. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1976;73:4344-48.
87. Bertini E, Bosman C, Bevilacqua M, et al. Cardiomyopathy and multicore myopathy with accumulation of intermediate filaments. *Eur J Pediatr.* 1990;149:856-8. doi:10.1007/BF02072073.
88. Van Spaendonck-Zwarts KY, Van Hessem L, Jongbloed JDH, et al. Desmin-related myopathy. *Clin Genet.* 2011;80:354-66. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01512.x.
89. Otten E, Asimaki A, Maass A, et al. Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks. *Heart Rhythm.* 2010;7:1058-64. doi:10.1016/j.hrthm.2010.04.023.

90. Klauke B, Kossmann S, Gaertner A, et al. De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 2010;19:4595-607. doi:10.1093/hmg/ddq387.
91. Hedberg C, Melberg A, Kuhl A, Jenne D, Oldfors A. Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7 is caused by a DES mutation. *Eur J Hum Genet.* 2012;20:984-5. doi:10.1038/ejhg.2012.39.
92. Lorenzon A, Beffagna G, Bauce B, et al. Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2013;111:400-5. doi:10.1016/j.amjcard.2012.10.017.
93. Brodehl A, Dieding M, Klauke B, et al. The novel desmin mutant p.A120D impairs filament formation, prevents intercalated disk localization, and causes sudden cardiac death. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:615-23. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000103.
94. Ripoll-Vera T, Zorio E, Gámez JM, Molina P, Govea N, Crémer D. Phenotypic Patterns of Cardiomyopathy Caused by Mutations in the Desmin Gene. A Clinical and Genetic Study in Two Inherited Heart Disease Units. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2015;68:1027-9. doi:10.1016/j.rec.2015.07.007.
95. Goudeau B, Rodrigues-Lima F, Fischer D, et al. Variable pathogenic potentials of mutations located in the desmin alpha-helical domain. *Hum Mutat.* 2006;27:906-13. doi:10.1002/humu.20351.
96. Saguner AM, Vecchiati A, Baldinger SH, et al. Different Prognostic Value of Functional Right Ventricular Parameters in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2014;7:230-9. doi:10.1161/CIRCIMAGING.113.000210.
97. Teske AJ, Cox MGPJ, Te Riele ASJM, et al. Early detection of regional functional abnormalities in asymptomatic ARVD/C gene carriers. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012;25:997-1006. doi:10.1016/j.echo.2012.05.008.
98. te Riele AS, Tandri H, Bluemke DA. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC): cardiovascular magnetic resonance update. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2014;16:50. doi:10.1186/s12968-014-0050-8.
99. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Hear J - Cardiovasc Imaging.* 2015;16(3).
100. Mast TP, Teske AJ, vd Heijden JF, et al. Left Ventricular Involvement in Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy

Assessed by Echocardiography Predicts Adverse Clinical Outcome. *J Am Soc Echocardiogr.* 2015;28:1103-13.e9. doi:10.1016/j.echo.2015.04.015.

101. te Riele AS, James CA, Philips B, et al. Mutation-Positive Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: The Triangle of Dysplasia Displaced. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2013;24:1311-20. doi:10.1111/jce.12222.

102. Tosoratti E, Badano LP, Gianfagna P, et al. Improved delineation of morphological features of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with the use of contrast-enhanced echocardiography. *J Cardiovasc Med.* 2006;7:566-8. doi:10.2459/01.JCM.0000234777.03949.10.

103. Sen-Chowdhry S, Prasad SK, Syrris P, et al. Cardiovascular Magnetic Resonance in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Revisited. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2132-40. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.045.

104. Deac M, Alpendurada F, Fanaie F, et al. Prognostic value of cardiovascular magnetic resonance in patients with suspected arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2013;168:3514-21. doi:10.1016/j.ijcard.2013.04.208.

105. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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.* 2015;17:405-24.

106. Carriel V, Campos F, Aneiros-Fernández J, Kiernan JA. Tissue Fixation and Processing for the Histological Identification of Lipids. *Methods Mol Biol.* 2017;1560:197-206. doi:10.1007/978-1-4939-6788-9\_14.

107. Carriel V, Aneiros-Fernández J, Ruyffelaert M, et al. Histological and immunohistochemical study of an unusual type of gall- bladder duplication. *Histol Histopathol.* 2014;29:957-64. doi: 10.14670/ HH-29.957.

108. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* 3rd ed. Boston, MA: Butterworth Heinemann; 1999.

109. Carriel V, Garzón I, Campos A, et al. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11:553-63. doi: 10.1002/term.1949.

110. Brodehl A, Dieding M, Biere N, et al. Functional characterization of the novel DES mutation p.L136P associated with dilated cardiomyopathy

reveals a dominant filament assembly defect. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;91:207-14. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.12.015.

111. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies: This document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace.* 2011;13:1077-109. doi:10.1093/europace/eur245.

112. Stenson PD, Ball E V, Mort M, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003;21:577-81. doi:10.1002/humu.10212.

113. Fu W, O'Connor TD, Jun G, et al. NHLBI Exome Sequencing Project. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature.* 2013;493:216–20. doi: 10.1038/nature11690.

114. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D862–8. doi: 10.1093/nar/gkv1222.

115. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285–91. doi: 10.1038/nature19057.

116. Brodehl A, Hedde PN, Dieding M, et al. Dual Color Photoactivation Localization Microscopy of Cardiomyopathy-associated Desmin Mutants. *J Biol Chem.* 2012;287:16047-57. doi:10.1074/jbc.M111.313841.

117. Taylor MRG, Slavov D, Ku L, et al. Prevalence of Desmin Mutations in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation.* 2007;115:1244 LP-51. <http://circ.ahajournals.org/content/115/10/1244.abstract>.

118. Walsh R, Thomson KL, Ware JS, et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet Med.* 2017;19:192-203. doi:10.1038/gim.2016.90.

119. Azzimato V, Genneback N, Tabish AM, Buyandelger B, Knöll R. Desmin, desminopathy and the complexity of genetics. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;92:93-5. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.01.017.

120. Jiménez-Jáimez J, Álvarez M, Algarra M, et al. Baja penetrancia clínica en sujetos portadores de mutación patológica para las canalopatías cardíacas. *Rev Española Cardiol.* 2013;66:275-81. doi:10.1016/j.recesp.2012.09.011.

121. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, et al. Desmin Mutation Responsible for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;100(5):461LP-4. <http://circ.ahajournals.org/content/100/5/461.abstract>
122. Bär H, Schopferer M, Sharma S, et al. Mutations in Desmin's Carboxy-Terminal "Tail" Domain Severely Modify Filament and Network Mechanics. *J Mol Biol*. 2010;397:1188-98. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.024>.
123. Lopez-Ayala JM, Pastor-Quirante F, Gonzalez-Carrillo J, et al. Genetics of myocarditis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Heart Rhythm*. 2015;12:766-73. doi:10.1016/j.hrthm.2015.01.001.
124. Palmisano MG, Bremner SN, Hornberger TA, et al. Skeletal muscle intermediate filaments form a stress-transmitting and stress-signaling network. *J Cell Sci*. 2015;128:219-24. doi:10.1242/jcs.142463.
125. Markandeya YS, Tsubouchi T, Hacker TA, Wolff MR, Belardinelli L, Balijepalli RC. Inhibition of late sodium current attenuates ionic arrhythmia mechanism in ventricular myocytes expressing LaminA-N195K mutation. *Heart Rhythm*. 2016;13:2228-36. doi:10.1016/j.hrthm.2016.08.007.
126. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetics of long QT syndrome. *Methodist Debakey Cardiovasc J*. 2014;10:29-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932360>.
127. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, et al. Sodium channel  $\beta$ 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest*. 2008;118:2260-8. doi:10.1172/JCI33891.
128. Zhang Q, Deng C, Rao F, et al. Silencing of desmoplakin decreases connexin43/Nav1.5 expression and sodium current in HL1 cardiomyocytes. *Mol Med Rep*. 2013;8:780-6.
129. Goldfarb LG, Dalakas MC. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest*. 119:1806-13. doi:10.1172/JCI38027.
130. Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, et al. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur J Heart Fail*. 2006;8:477-83. doi:10.1016/j.ejheart.2005.11.003.
131. Cetin N, Balci-Hayta B, Gundesli H, et al. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct

histopathological outcomes compared with desminopathies. *J Med Genet.* 2013;50:437-43. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101487.

132. Lapouge K, Fontao L, Champlaud M-F, et al. New insights into the molecular basis of desmoplakin and desmin-related cardiomyopathies. *J Cell Sci.* 2006;119:4974LP-85. <http://jcs.biologists.org/content/119/23/4974.abstract>.





---

## **8. ANEXO**



## **ANEXO I**

### **The Novel Desmin Mutation p.Glu401Asp Impairs Filament Formation, Disrupts Cell Membrane Integrity and Causes Severe Arrhythmogenic Left Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia**

Francisco José Bermúdez-Jiménez, MD<sup>1\*</sup>; Víctor Carriel, MSc, MBiol, PhD<sup>2\*</sup>; Andreas Brodehl, MSc, PhD<sup>3</sup>; Miguel Alaminos, MD, PhD<sup>2</sup>; Antonio Campos, MD, PhD<sup>2</sup>; Ilona Schirmer, MSc<sup>3</sup>; Hendrik Milting, MSc, PhD<sup>3</sup>; Beatriz Álvarez Abril, MD<sup>1</sup> Miguel Álvarez, MD, PhD<sup>1</sup>; Silvia López-Fernández, MD<sup>1</sup>; Diego García-Giustiniani, MD<sup>4</sup>; Lorenzo Monserrat, MD, PhD<sup>4</sup>; Luis Tercedor, MD<sup>1</sup>; Juan Jiménez-Jáimez, MD, PhD<sup>1</sup>

1. Cardiology Department, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain (F.J.B.-J., B.A.A., M. Álvarez, S.L.-F., L.T., J.J.-J.).
2. Department of Histology, Tissue Engineering Group, Faculty of Medicine, University of Granada, Spain and Instituto de Investigación Biosanitaria ibs (V.C., M. Alaminos, A.C.).
3. Erich and Hanna Klessmann Institute for Cardiovascular Research and Development, Heart and Diabetes Centre NRW, Ruhr University Bochum, Bad Oeynhausen, Germany (A.B., I.S., H.M.).
4. Cardiology Department, Health in Code, A Coruña, Spain (D.G.-G., L.M.).

***Circulation*. 2018;137(15):1595-1610.**

**doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028719.**

Key Words: arrhythmogenic right ventricular displasia; desmin; mutation; myopathy, myofibrillar, desmin-related; ventricular fibrillation

## **ABSTRACT**

Background: Desmin (DES) mutations cause severe skeletal and cardiac muscle disease with heterogeneous phenotypes. Recently, DES mutations were described in patients with inherited arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia, although their cellular and molecular pathomechanisms are not precisely known. Our aim is to describe clinically and functionally the novel DES-p.Glu401Asp mutation as a cause of inherited left ventricular arrhythmogenic cardiomyopathy/ dysplasia.

Methods: We identified the novel DES mutation p.Glu401Asp in a large Spanish family with inherited left ventricular arrhythmogenic cardiomyopathy/ dysplasia and a high incidence of adverse cardiac events. A full clinical evaluation was performed on all mutation carriers and noncarriers to establish clinical and genetic cosegregation. In addition, desmin, and intercalar disc-related proteins expression were histologically analyzed in explanted cardiac tissue affected by the DES mutation. Furthermore, mesenchymal stem cells were isolated and cultured from 2 family members with the DES mutation (1 with mild and 1 with severe symptomatology) and a member without the mutation (control) and differentiated ex vivo to cardiomyocytes. Then, important genes related to cardiac differentiation and function were analyzed by real-time quantitative

polymerase chain reaction. Finally, the p.Glu401Asp mutated DES gene was transfected into cell lines and analyzed by confocal microscopy.

**Results:** Of the 66 family members screened for the DES-p.Glu401Asp mutation, 23 of them were positive, 6 were obligate carriers, and 2 were likely carriers. One hundred percent of genotype-positive patients presented data consistent with inherited arrhythmogenic cardiomyopathy/dysplasia phenotype with variable disease severity expression, high-incidence of sudden cardiac death, and absence of skeletal myopathy or conduction system disorders. Immunohistochemistry was compatible with inherited arrhythmogenic cardiomyopathy/dysplasia, and the functional study showed an abnormal growth pattern and cellular adhesion, reduced desmin RNA expression, and some other membrane proteins, as well, and desmin aggregates in transfected cells expressing the mutant desmin.

**Conclusions:** The DES-p.Glu401Asp mutation causes predominant inherited left ventricular arrhythmogenic cardiomyopathy/dysplasia with a high incidence of adverse clinical events in the absence of skeletal myopathy or conduction system disorders. The pathogenic mechanism probably corresponds to an alteration in desmin dimer and oligomer assembly and its connection with membrane proteins within the intercalated disc.

## **BACKGROUND**

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia (ARVC/D) is an inherited disorder of genetic origin that causes malignant ventricular arrhythmias leading to sudden cardiac death (SCD).<sup>1-4</sup> Inherited ARVC/D (iARVC/D) is one of the most prevalent causes of SCD in young people, especially in athletes.<sup>5</sup> Left ventricular (LV) involvement is common and appears to imply a poorer prognosis. Mutations in genes encoding for desmosomal proteins (plakophilin-2 [PKP2], desmoplakin [DSP], desmoglein-2 [DSG2], desmocollin-2 [DSC2], and plakoglobin [JUP]) play a key role in the pathogenesis of this disease.<sup>6-10</sup> With the increasing use of the next-generation sequencing techniques in cardiovascular genetics, nondesmosomal and ion channels gene mutations<sup>11</sup> have also been associated with iARVC/D. Two prominent examples are the mutations p.S358L in TMEM43 and p.Arg14del in PLN,<sup>12</sup> encoding the transmembrane protein Luma localized in the nuclear membrane<sup>13,14</sup> and a regulator of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-(SERCA2a) pump in cardiac muscle, respectively.

Some cytoskeletal proteins, such as filamin C<sup>15</sup> or desmin, are closely related to the development of cardiomyopathy. Desmin, encoded by the gene DES, is a structural intermediate filament present in the cytoskeleton of the leiomyocytes, rhabdomyocytes, and cardiomyocytes, and it is associated with different cellular structures, such as desmosomes, Z-bands, costameres, mitochondria, and the nuclei. Its function is related to the maintenance of the structural integrity of the cardiomyocyte.<sup>16</sup> More than 70% of the described pathogenic DES mutations exhibit cardiac involvement and can be associated with any form of cardiomyopathy, the most common being dilated cardiomyopathy, followed by restrictive, hypertrophic, ARVC/D, and their combinations.<sup>17</sup> It usually presents specific conduction system disturbance and, in addition, evidence of skeletal myopathy. The molecular pathogenic mechanisms causing the ARVC/D-related DES mutation phenotype are unknown, and preexisting data in this regard are rare.

In this study, we demonstrate the pathogenicity of the novel DES mutation p.Glu401Asp in a large family with an inherited LV dominant arrhythmogenic car-

diomyopathy/dysplasia and a high incidence of adverse clinical events, such as SCD, major heart failure, and ventricular arrhythmia. We also identify the cellular, histological, and molecular mechanisms leading to the appearance of the iARVC/D phenotype.

## **METHODS**

The data, analytic methods, and study materials will not be made available to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure.

### Study Population and Clinical Variables

The study population included all available members of a large Spanish family of white origin, composed of 83 individuals spread over 6 generations. Sixty-six family members were available for evaluation (51.6% male; mean age, 43.3±19.3 years old). The study protocol was approved by the local ethics committee (University of Granada) on March 2016. All patients included in the study signed an informed consent form.

### Clinical Study

All subjects underwent an initial clinical evaluation that included a clinical history with particular emphasis on the presence of adverse events such as death, heart failure death, SCD, atrioventricular block, sustained ventricular arrhythmia, syncope, heart transplantation, or cardiac device implantation. In addition, all subjects underwent a 12-lead ECG, a transthoracic echocardiogram, a creatine phosphokinase blood test, and a neuromuscular examination to investigate involvement of the skeletal muscle. The mutation carriers underwent 24 hours of ambulatory ECG monitoring (Holter) and a cardiac magnetic resonance (CMR) imaging. The CMR imaging was performed in all participants who accepted the procedure and had no contraindications (cardiac device implant and claustrophobia). The ECG data were analyzed to obtain the PR, QRS, and QT intervals in milliseconds, and data on voltage, conduction disturbance, and the presence of pathological Q waves. In the 24-hour ambulatory ECG, we analyzed the presence of nonsustained ventricular tachycardia, atrioventricular block, and ventricular ectopy morphology and density. The evaluation of LV diameter and function was performed according to current guidelines,<sup>18</sup> including LV end-diastolic and end-systolic diameter and volume, LV ejection fraction using the Simpson biplane method, right ventricular outflow and inflow tract diameter, and right ventricular systolic function, as well. Diagnosis of the index patient was based on modified Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia Task Force criteria.<sup>19</sup> All clinical tests were interpreted by cardiologists specialized in advanced cardiac imaging and electrophysiology. Data collection was limited by the lack of both electro and echocardiographic information on deceased and precardiac transplant subjects in the corresponding cases. Furthermore, the statistical analysis did not include clinical data or complementary tests of children <13 years of age.

### Genetic Analysis

After obtaining the peripheral blood of the index patient (IV.31 on Figure 1), the genetic analysis was performed by using a next-generation sequencing gene panel containing 149 genes (Figure I in the online-only Data Supplement). This study included an analysis of all coding exons and intron flanking regions of a personalized panel of genes, which had been previously associated with or are regarded as candidates for the development of hereditary cardiovascular diseases. Sample preparation was performed using the Agilent SureSelect Target Enrichment Kit based on the paired end multiplexed sequencing method according to the manufacturer's instructions. Low-coverage regions

of the relevant genes were resequenced using the Sanger method. Bioinformatic analysis was performed through an in-house–developed pipeline that included software such as NovoAlign, SAMtools, and BCFtools. Information such as frequency in different populations (from sources including exome variant server, 1K genomes, and the Single Nucleotide Polymorphism Database), and various bioinformatic predictions, as well, was added. Pathogenicity of the identified variants was classified according to current guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomics.<sup>20</sup> Following mutation DES-p.Glu401Asp identification in the index patient, genetic and clinical cascade screening was performed on all available family members.

### Histological Analysis

Cardiac tissue from patient III.21 (Figure 1) carrying DES-p.Glu401Asp and subjected to heart transplantation was used for histological analysis. In addition, normal healthy cardiac tissue obtained from a patient without the mutation was used as control. The tissues were fixed for 24 hours in 10% neutral buffered formaldehyde, washed, dehydrated in ascending concentrations of ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin using a conventional protocol.<sup>21</sup> Five-micrometer histological sections were dewaxed and stained with hematoxylin-eosin for morphological evaluation. Stromal collagen fibers were histochemically evaluated by picosirius staining as described elsewhere.<sup>22</sup> To evaluate myofibril organization in the cardiomyocytes, tissue sections were histochemically stained according to the Heidenhain iron hematoxylin method as previously described.<sup>23</sup> The histomorphological pattern of the desmin intermediate filament was evaluated by indirect immunohistochemistry. Desmosomes and intercellular gap junctions localized at the intercalated discs were identified by immunohistochemical staining of desmoplakin, plakoglobin, and connexin-43, respectively. Immunohistochemistry was prepared as previously described<sup>22–24</sup> using positive and negative technical controls. All procedures were performed simultaneously under the same conditions to ensure reproducibility of the results. Technical information about the used antibodies is summarized in Table I in the online-only Data Supplement.

### Stem Cell Culture and Cardiomyocyte Differentiation

To evaluate the impact of DES mutation on cell function, adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) were isolated from subcutaneous adipose biopsies obtained from 3 members of the family evaluated in this study: a healthy non-DES mutation carrier (healthy control) and 2 mutation carriers, 1 with mild symptomatology and 1 with a severe clinical condition, were included. The biopsies were mechanically fragmented into small pieces and then digested for 8 hours in a 2 mg/mL solution of *Clostridium histolyticum* type I collagenase (Gibco BRL Life Technologies) as previously described.<sup>21</sup> The ADMSCs were harvested by centrifugation and cultured in a basal medium consisting of DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics-antimycotics (Sigma-Aldrich). After obtaining a subconfluent cell culture, the ADMSCs were differentiated *ex vivo* into the cardiomyocyte lineage, using the Gibco Cardiomyocyte Differentiation Kit (A29212-01, Thermo Fisher Scientific), for 14 days according to the manufacturer's instructions. The growth pattern and differentiation process of these cells were continuously monitored by phase-contrast microscopy. The human cardiomyocyte phenotype was confirmed using a commercially available Human Cardiomyocyte Immunocytochemistry Kit (A25973, Thermo Fisher Scientific).

### Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Analyses

Total RNA was extracted from each cell type (differentiated and nondifferentiated cell cultures from each of the 3 family members studied) using a Qiagen RNeasy Mini

Kit system (Qiagen). Then, cDNA was synthesized from total RNA with an iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories) using 1 µg of each RNA. Expression quantification of a set of genes with important roles in cardiac differentiation and function was analyzed using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). Thus, a 96-well plate containing oligonucleotides for the genes and controls selected was designed as a PrimePCR custom assay. The selection of these genes was based on 2 previously described gene expression panels for cardiac diseases: Cardiac Arrhythmia Next-Generation Sequencing Multi-Gene Panel and Bio-Rad Arrhythmias Cardiac H96 Panel. For each PCR reaction, 2 µL of cDNA, 8 µL of H<sub>2</sub>O, and 10 µL of SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix were added, and a PCR protocol consisting of 40 amplification cycles with an annealing temperature of 60°C was applied using a Bio-Rad CFX Connect-96 instrument. Results were corrected according to the efficiency of the reverse transcription reaction and normalized to the GAPDH housekeeping gene expression using Bio-Rad CFX Manager 3.1 software.

Each sample was analyzed in triplicate (n=18). Relative gene expression was calculated for each gene using the  $\Delta\Delta Cq$  value (CFX Manager 3.1 software, Bio-Rad) by comparing each differentiated cell culture with its nondifferentiated control samples. By using this approach, we obtained the fold-change expression increase or decrease of every gene in the 3 sample types analyzed as average differentiated cell expression divided by average nondifferentiated cell expression. The fold-changes obtained for the unmutated control cells were considered as the basal levels of normal cells for each gene, whereas the fold-changes obtained for both samples were compared with basal levels. Genes showing an increase or decrease of at least 2-fold, in comparison with basal levels, were selected.

#### Plasmids, Cell Culture, and Confocal Microscopy

The expression plasmid pmRuby-N1-Desmin has been previously described.<sup>25</sup> This construct encodes a C-terminal fusion protein of human desmin and the fluorescence protein mRuby that was used for direct fluorescence microscopy. The mutations p.Glu401Asp and p.Glu401Lys were introduced using the QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (210518, Agilent Technologies). The mutation insertions were verified by Sanger sequencing (Macrogen). SW13 cells were grown with ≈70% confluency on cover slips in DMEM (Gibco; 4.5 g/L glucose, 10% FBS, supplemented with penicillin/streptomycin). These cells were used because they do not express endogenous desmin or any other cytoplasmic intermediate filament protein. The cells were transiently transfected with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours after transfection, the cells were washed several times for 5 minutes with PBS and fixed for 5 minutes with Roti Histofix (Carl Roth). They were then extensively washed in PBS and permeabilized with Triton X-100 (0.1% in PBS). F-actin was stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich) 50 µg/mL for 40 minutes at room temperature according to the manufacturer's instructions. The cells were embedded in Mowiol 4 to 88 (Carl Roth). Confocal laser scanning microscopy was performed with the TCS SP8 system (Leica Microsystems) equipped with a HC PL API C52 (63× /1.30) glycerin objective, hybrid detectors, and Application Suite X software. The fluorescence molecules mRuby and fluorescein isothiocyanate were sequentially excited. Each cell culture experiment was performed in triplicate.

#### Statistical Analysis

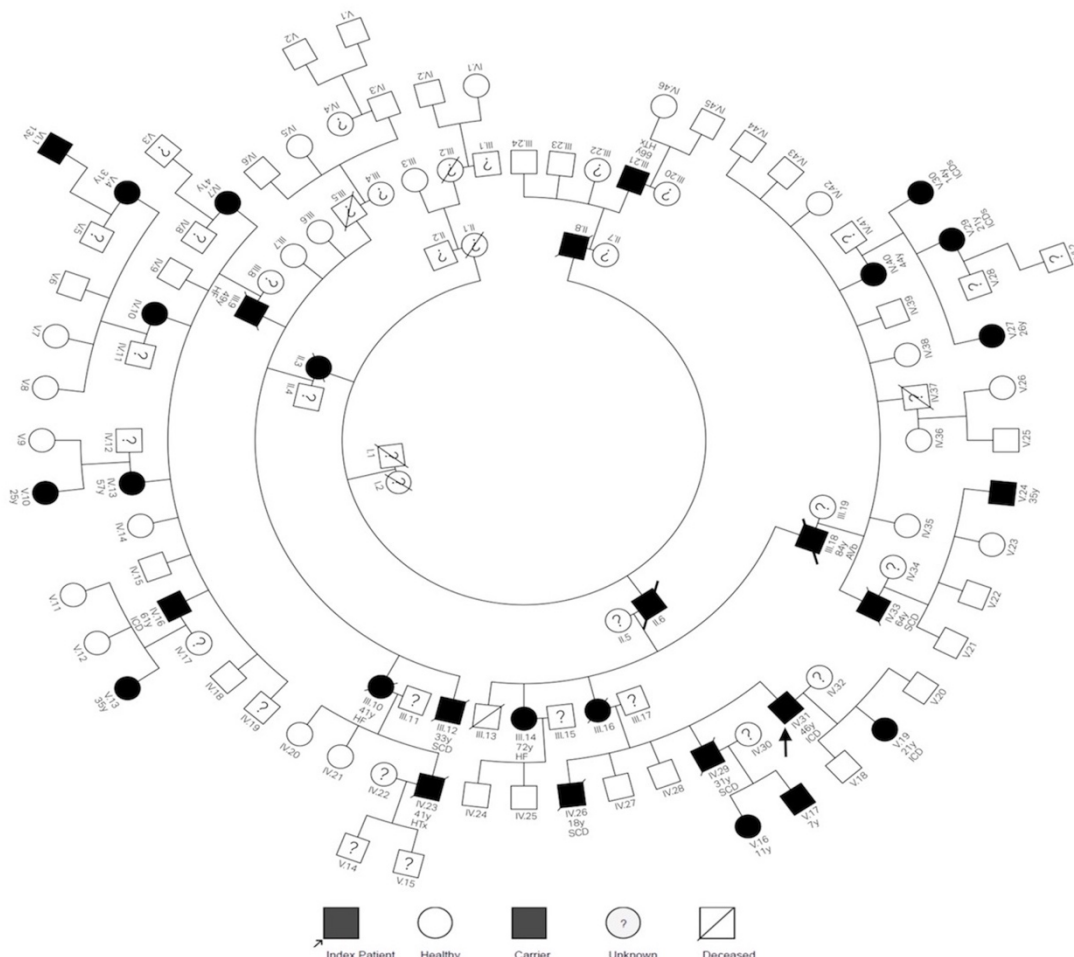
Statistical calculations were performed using SPSS Statistics (version 20, IBM Corp). Clinical characteristics were compared using  $\chi^2$  or Fisher exact test for

categorical variables and Student t test or Mann-Whitney U test for continuous variables. All categorical data were reported as frequencies and percentages, and continuous variables were expressed as meanvalue±SD for each measurement. A P value of <0.05 was considered to be statistically significant. Survival analysis was estimated by using the Kaplan-Meier method.

## RESULTS

### Genetic Analysis

The genetic analysis of the index patient (IV:31, Figure 1) revealed the heterozygous missense mutation in DES (NM\_001927.3:c.1203G>C; NP\_01918.3:p.Glu401Asp or p.E401D). This variant had not been previously described in any publication or in public databases, such as the Human Gene Mutation Database,<sup>26</sup> the Single Nucleotide Polymorphism Database,<sup>27</sup> NHLBI GO Exome Sequencing Project,<sup>28</sup> and ClinVar,<sup>29</sup> or in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database<sup>30</sup> (as of 31/03/2017). Amino acid residue E401 belongs to the fourth  $\alpha$ -helix (coil 2B, amino acids 296–412) of the  $\alpha$ -helical central rod domain (109–412), a region that is essential for desmin filament assembly. The in silico prediction indicated that p.Glu401Asp substitu-



**Figure 1.** Full pedigree with a large number of clinical events.

Squares and circles represent males and females, respectively. Mutation carriers are marked in black, noncarriers in white, and those not studied in gray. Deceased are indicated by a slash. HF indicates heart failure; HTx, heart transplant; ICD, implantable cardioverter defibrillator; ICDs, subcutaneous implantable cardioverter defibrillator; SCD, sudden cardiac death; and VT, ventricular tachycardia.



tion NC\_000002.11:g220286241G>C affects a highly conserved amino acid residue among different species (Figure II in the online-only Data Supplement).

### Clinical Analysis

The index patient, a 46-year-old man (IV:31, Figure 1), was referred for examination because of a family history of SCD of 2 brothers aged 31 (IV:29) and 18 (IV:26). Postmortem examination of one of these brothers (IV:29) revealed epicardial and midwall fibrosis from the inferior LV wall to the septum and lateral wall. The right ventricle looked macroscopically normal, and there was no evidence of coronary artery disease. Histological examination showed focal areas of subendocardial fibrosis in the free wall of the right ventricle. In the left ventricle, subepicardial and midwall fat and fibrous tissue were confirmed, presenting widespread spaces admixed with degenerative myocytes. Myocardial inflammation was absent. In addition, there were no pathological findings suggestive of skeletal myopathy such as myofiber necrosis or myofiber atrophy. In summary, the post-mortem study strongly suggested dominant inherited arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy/dysplasia.<sup>31</sup> The patient presented New York Heart Association functional class II symptoms with generalized T-wave inversion in all precordial leads and biventricular dilation and severely depressed biventricular ejection fraction, as well. These data were confirmed by CMR, which also showed late gadolinium enhancement at the subepicardial LV level. The 24-hour Holter study showed >500 of premature ventricular complexes with both left and right bundle-branch block morphologies. Finally, he was diagnosed to have inherited arrhythmogenic cardiomyopathy/dysplasia with biventricular involvement and received a cardiac defibrillator implantation for primary prevention of SCD.

In total, 66 family members were genetically sequenced for DES-p.Glu401Asp, of whom 23 presented the mutation; an additional 6 subjects were obligate carriers (deceased before sequencing), and another 2 nongenotyped cases, with, however, a previous SCD event, were considered probable carriers, corresponding to a total of 31 affected family members. Co-segregation analysis was performed to correlate genotype and phenotype, clearly confirming the pathogenic impact of this specific DES mutation. Evidence of primary myocardial disease was present in 100% of carriers, with variable clinical expression, whereas noncarriers showed no traces of nonischemic cardiomyopathy (Table II in the online-only Data Supplement). One noncarrier patient presented LV systolic dysfunction and atrioventricular block of ischemic origin.

Of the 23 carriers studied, 9 fulfilled the modified diagnostic criteria. Main clinical and genetic data of DES mutation carriers are summarized in the Table. The most common ECG finding was T-wave inversion in at least 3 consecutive ECG leads (14 cases) and generalized low voltage (12 cases). The ECG was abnormal in 97% of the carriers for whom it was available, mostly because of the presence of negative T waves in inferior (II, III, aVF) and anterolateral leads (V2 through V6) (Figure 2A). No change was detected in the PR interval, which was similar in both groups, although a wider QRS was identified in the carrier group (Table II in the online-only Data Supplement). Two of the 3 affected children (7, 11, and 13 years old) presented negative T wave beyond V3. One of them (VI.1) showed low voltages in limb leads in the ECG and subepicardial late gadolinium enhancement in inferior wall in the CMR. The 24-hour Holter study revealed nonsustained ventricular tachycardias in 32% of carriers and high density ventricular ectopy in 23% of them. There was only 1 case of atrioventricular block in an 84-year-old man. We found no evidence of skeletal myopathy, and creatine phosphokinase determination was normal in all mutation carriers.

Case*	Age at Dx, y	Sex	Gen Status	Symptoms	Major Events	CK, mg/dL	ε-Wave	T-Wave Inversion	Low Voltage†
II:3	n/a	F	OC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
II:6	n/a	M	OC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
II:8	41	M	OC	n/a	aHF	n/a	n/a	n/a	n/a
III:9	49	M	OC	n/a	aHF	n/a	n/a	n/a	n/a
III:10	41	F	OC	n/a	aHF	n/a	n/a	n/a	n/a
III:12	33	M	PC	n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
III:14	72	F	C	Asymptomatic	aHF	53	No	V <sub>1</sub> -V <sub>6</sub> inferior	Yes
III:16	n/a	F	OC	n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
III:18	84	M	C	Palpitations	AVb	n/a	No	No	No
III:21	66	M	C	Dyspnea	AHF; HTx	n/a	No	V <sub>1</sub> -V <sub>6</sub> inferior	No
IV:7	41	F	C	Asymptomatic		93	No	No	No
IV:10	55	F	C	Asymptomatic		103	No	No	Yes
IV:13	57	F	C	Asymptomatic		88	No	V <sub>4</sub> -V <sub>6</sub> inferior	Yes
IV:16	61	M	C	Dyspnea	aHF	95	No	No	No
IV:23	41	M	C	Syncope	aHF; HTx	76	No	V <sub>1</sub> -V <sub>2</sub>	No
IV:26	18	M	PC	n/a	SD	n/a	n/a	n/a	n/a
IV:29	31	M	C	Palpitations	SD	n/a	n/a	n/a	n/a
IV:31II	47	M	C	Dyspnea	aHF	59	No	V <sub>1</sub> -V <sub>6</sub> inferior	Yes
IV:33	63	M	C	Asymptomatic	SD	112	No	No	No
IV:40	44	F	C	Asymptomatic		110	No	No	Yes
V:4	31	F	C	Asymptomatic		65	No	V <sub>1</sub> -V <sub>5</sub> inferior	Yes
V:13	34	F	C	Asymptomatic		41	No	V <sub>4</sub> -V <sub>6</sub> inferior	Yes
V:16	11	F	C	Asymptomatic		67	No	V <sub>1</sub> -V <sub>4</sub>	No
V:17	7	M	C	Asymptomatic		180	No	No	No
V:19	21	F	C	Palpitations	aHF	86	No	V <sub>1</sub> -V <sub>6</sub> inferior	Yes
V:10	25	F	C	Asymptomatic		105	Yes	V <sub>5</sub> -V <sub>6</sub> I-aVL	Yes
V:24	35	M	C	Palpitations		150	No	V <sub>2</sub> -V <sub>6</sub> inferior	Yes
V:27	26	F	C	Asymptomatic		55	No	V <sub>1</sub> -V <sub>6</sub> inferior	Yes
V:29	21	F	C	Asymptomatic		84	Yes	V <sub>4</sub> -V <sub>6</sub> inferior	No
V:30	14	F	C	Asymptomatic		59	No	V <sub>4</sub> -V <sub>6</sub> inferior	No
VI:1	13	M	C	Asymptomatic		103	No	V <sub>1</sub> -V <sub>4</sub>	Yes

(Continued)

aHF indicates advanced heart failure; aSH, appropriate ICD shock; AVb, atrioventricular block; C, carrier; CK, plasma levels of creatine kinase; CRT-D, cardiac resynchronization therapy defibrillator; Dx, diagnosis; F, female; Gen status, genotype status; HTx, heart transplant; ICD, implantable cardioverter defibrillator; ICDs, subcutaneous cardioverter defibrillator; LGE, presence of late gadolinium enhancement on cardiac magnetic resonance images; LV, left ventricle; LVDD, left ventricular end diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVWMA, left ventricular wall motion abnormalities; M, male; M/m, major/minor; n/a, data not available; NSVT, nonsustained ventricular tachycardia; OC, obligate carrier of the mutation; PC, probable carrier of the mutation; PM, pacemaker; RV, right ventricular; SD, sudden death; SVT, sustained ventricular tachycardia; VE, ventricular ectopics in 24-hour Holter monitoring; and VT, ventricular tachycardia.

\*Case lists individual identifications according to position in the pedigree.

†Low voltage indicates the low QRS voltage amplitude on limb leads.

‡RV affect. shows right ventricular affection (akinesia, dyskinesia, aneurysm, dilatation, and systolic dysfunction).

§Criteria (major/minor): diagnostic status according to Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia Task Force criteria.

||Index patient.

LV DD	LV EF	LV WMA	RV Affect.†	LV LGE	Ventricular Arrhythmias	Criteria§M/m	Comments
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0/1	
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/0 Possible	
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/0 Possible	
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/0 Possible	
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/0 Possible	Heart failure death
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/0 Possible	
48	43	Yes	No	Yes	NSVT; 970 VE	1/2 Definite	
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/0 Possible	
50	55	Yes	No	n/a	n/a	0/1	PM
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	NSVT	2/1 Definite	
42	55	No	No	Yes	1868 VE	0/1	
54	48	Yes	No	Yes	8455 VE	0/1	
46	55	Yes	No	n/a	5852 VE	0/2 Possible	
60	30	Yes	Yes	Yes	4479 VE	1/1 Borderline	CRT-D
70	30	Yes	Yes	n/a	SVT; 8045 VE	2/1 Definite	Heart failure death
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2/0 Definite	Died during exercise
n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1/0 Possible	Died at rest
61	30	Yes	Yes	Yes	SV; 1283 VE	4/0 Definite	CRT-D, aSH
55	52	Yes	No	Yes	193 VE	0/1	Died at rest (64 y) VT
49	57	Yes	No	Yes	342 VE	1/0 Possible	
50	54	Yes	No	Yes	421 VE	1/0 Possible	
54	49	Yes	No	n/a	1392 VE	1/1 Borderline	
47	65	No	No	n/a	74 VE	Not applicable	
41	65	No	No	n/a	0 VE	Not applicable	
48	37	Yes	Yes	Yes	5293 VE	3/1 Definite	aSH, ICD
49	39	Yes	No	Yes	NSVT; 2866 VE	0/2 Possible	
62	50	Yes	No	Yes	2318 VE	1/1 Borderline	
52	40	Yes	Yes	No	3216 VE	1/2 Definite	
52	43	Yes	No	No	NSVT	2/1 Definite	ICDs
53	40	Yes	No	Yes	NSVT	2/1 Definite	ICDs
58	51	No	No	Yes	3985 VE	Not applicable	

aHF indicates advanced heart failure; aSH, appropriate ICD shock; AVb, atrioventricular block; C, carrier; CK, plasma levels of creatine kinase; CRT-D, cardiac resynchronization therapy defibrillator; Dx, diagnosis; F, female; Gen status, genotype status; HTx, heart transplant; ICD, implantable cardioverter defibrillator; ICDs, subcutaneous cardioverter defibrillator; LGE, presence of late gadolinium enhancement on cardiac magnetic resonance images; LV, left ventricle; LVDD, left ventricular end diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVWMA, left ventricular wall motion abnormalities; M, male; M/m, major/minor; n/a, data not available; NSVT, nonsustained ventricular tachycardia; OC, obligate carrier of the mutation; PC, probable carrier of the mutation; PM, pacemaker; RV, right ventricular; SD, sudden death; SVT, sustained ventricular tachycardia; VE, ventricular ectopics in 24-hour Holter monitoring; and VT, ventricular tachycardia.

\*Case lists individual identifications according to position in the pedigree.

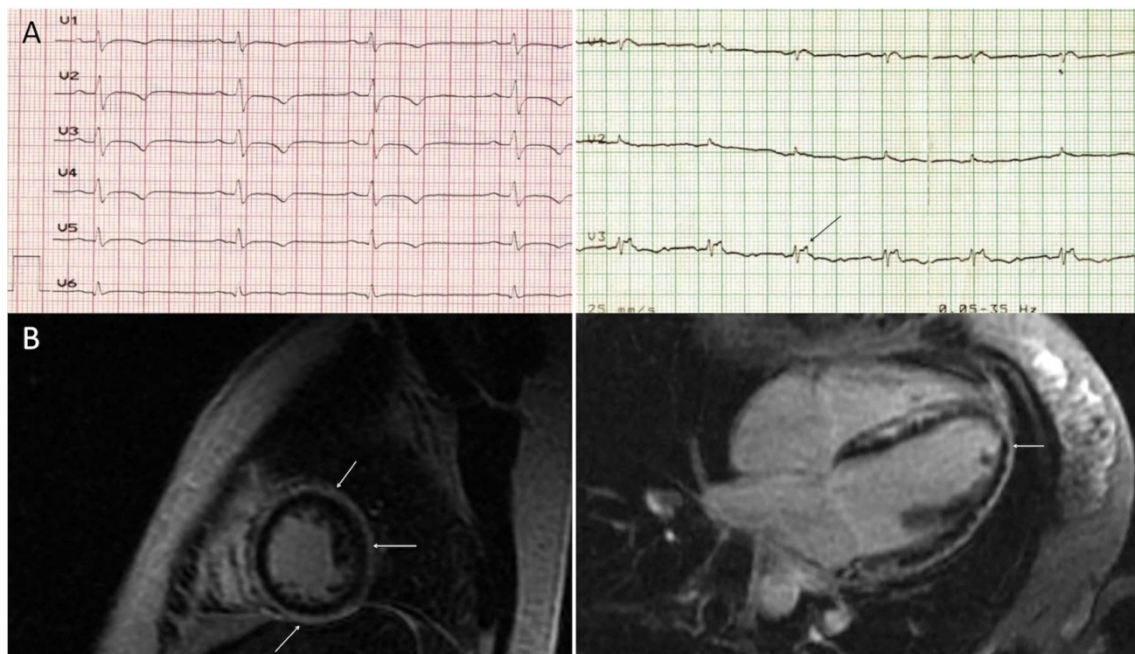
†Low voltage indicates the low QRS voltage amplitude on limb leads.

‡RV affect. shows right ventricular affection (akinesia, dyskinesia, aneurysm, dilatation, and systolic dysfunction).

§Criteria (major/minor): diagnostic status according to Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia Task Force criteria.

||Index patient.

The most characteristic finding of the cardiac structure and function studied by echocardiography and CMR was near-exclusive LV affection, with hypokinesia localized on the midapical inferolateral wall of the LV, mildly depressed LV ejection fraction ( $46\pm 8.2\%$ ), and no ventricular dilation ( $51.52\pm 5.87$  mm, normal in terms of body surface in most cases). Right ventricular involvement was demonstrated only in 5 cases that presented concomitant moderate/severe LV ejection fraction impairment, suggesting a primary involvement of

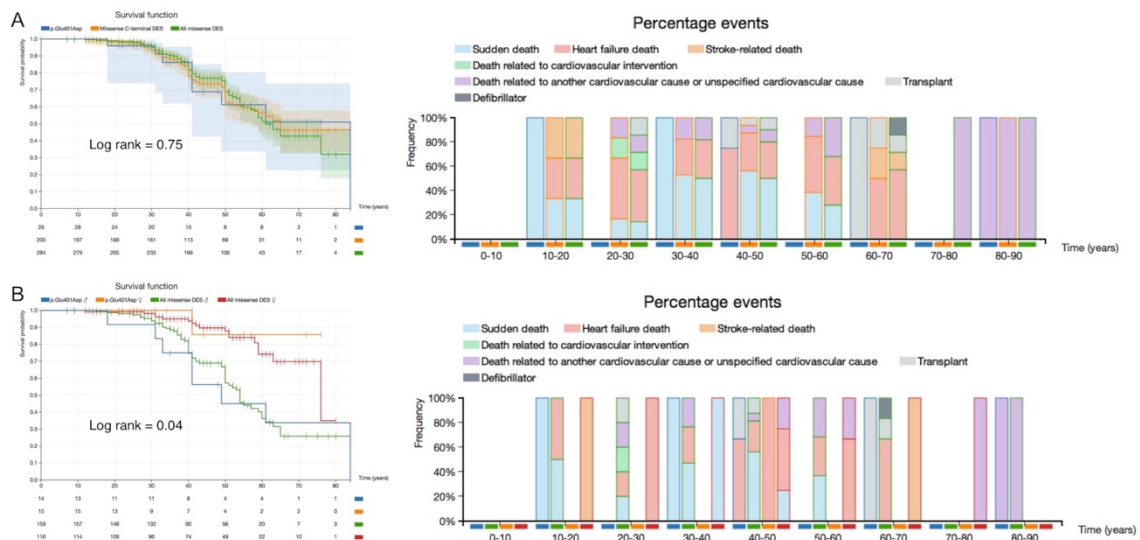


the LV and subsequent right ventricular affection. Furthermore, CMR revealed an extensive late gadolinium enhancement with a typical circumferential subepicardial pattern in most of the cases, and midapical lateral and inferolateral subepicardial distribution in the remaining patients (Figure 2B).

**Figure 2. Clinical characteristics of DES mutation carriers.**

**A**, ECG of 2 of the cases affected by mutation Glu401Asp. **Left**, The generalized inversion of the T wave, the lateral Q wave, and low voltage in body surface leads in proband's ECG (case IV.31). **Right**, The proband's mother's ECG (III.16) shows very low QRS voltage overall, with an  $\epsilon$ -wave in all precordial leads (arrow). **B**, Imaging of left ventricular late gadolinium enhancement with subepicardial annular fibrosis (arrows) of patient V.30.

During familial screening, 15 of affected individuals were asymptomatic at diagnosis, 4 presented with palpitations, 3 with heart failure symptoms, and 1 with syncope. None showed myocarditis-like symptoms. It is noteworthy that patients with heart failure showed severe LV ejection fraction impairment at presentation (2 of them had a previous diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy). A high incidence of cardiac events, mainly arrhythmic-related, was observed among carriers retrospectively and during follow-up (Table II in the online-only Data Supplement and Figure 3): 4 SCD (18, 31, 33, and 64 years old), 2 heart failure deaths (both at 41 years old), 1 atrioventricular block (84 years old), 2 heart transplantations (39 and 60 years old), 1 sustained monomorphic ventricular tachycardia (37 years old), and 5 implantable cardioverter defibrillators for primary prevention of SCD with 2 episodes of appropriate therapies on follow-up (21 and 47 years old). These findings support a high risk for malignant arrhythmias and SCD as first clinical manifestation.



### Histological Analysis of Cardiac Tissue Affected by Desmin Mutation

Histological analysis of the heart from a desmin mutation carrier (III:21) showed major differences in comparison with the control heart. Picrosirius staining in the control tissue revealed that all cardiomyocytes showed their typical branched cylindrical shape, a single and centrally located nucleus, a highly dense and strongly stained sarcoplasm, and several intercalated discs between adjacent cells (Figure 4A). With regard to cardiac tissue affected by desmin mutation p.Glu401Asp, it was possible to recognize zones affected by typical degenerative changes and others with a more conserved myocardium. Degenerative findings were found associated with the subepicardial myocardium, where picrosirius staining revealed an increase of disorganized collagen fibers, the presence of infiltrating adipose tissue, and groups of cardiomyocytes with degenerative changes. However, these findings were not accompanied by an inflammatory reaction (Figure 4B). In the myocardial zones without degenerative

#### **Figure 3. Event-free survival curves for major cardiac events in Glu401Asp DES mutation carriers.**

**A**, The curve is similar to other missense DES mutations (data obtained from our genetic laboratory and from published literature, including data from 284 patients with DES mutations). **Right**, A breakdown of all cardiac events for different age ranges according to the presence of the Glu401Asp mutation, all C-terminal DES mutations, or all missense DES mutations. Note the high incidence of SCD at younger ages among patients with Glu401Asp mutation in comparison with patients with other DES mutations. **B**, A significant poorer prognosis is observed in males in comparison with females, as described for other DES missense mutations. Note the low incidence of major cardiac events in women carrying Glu401Asp until the age of 50, with no SCD cases. SCD indicates sudden cardiac death.

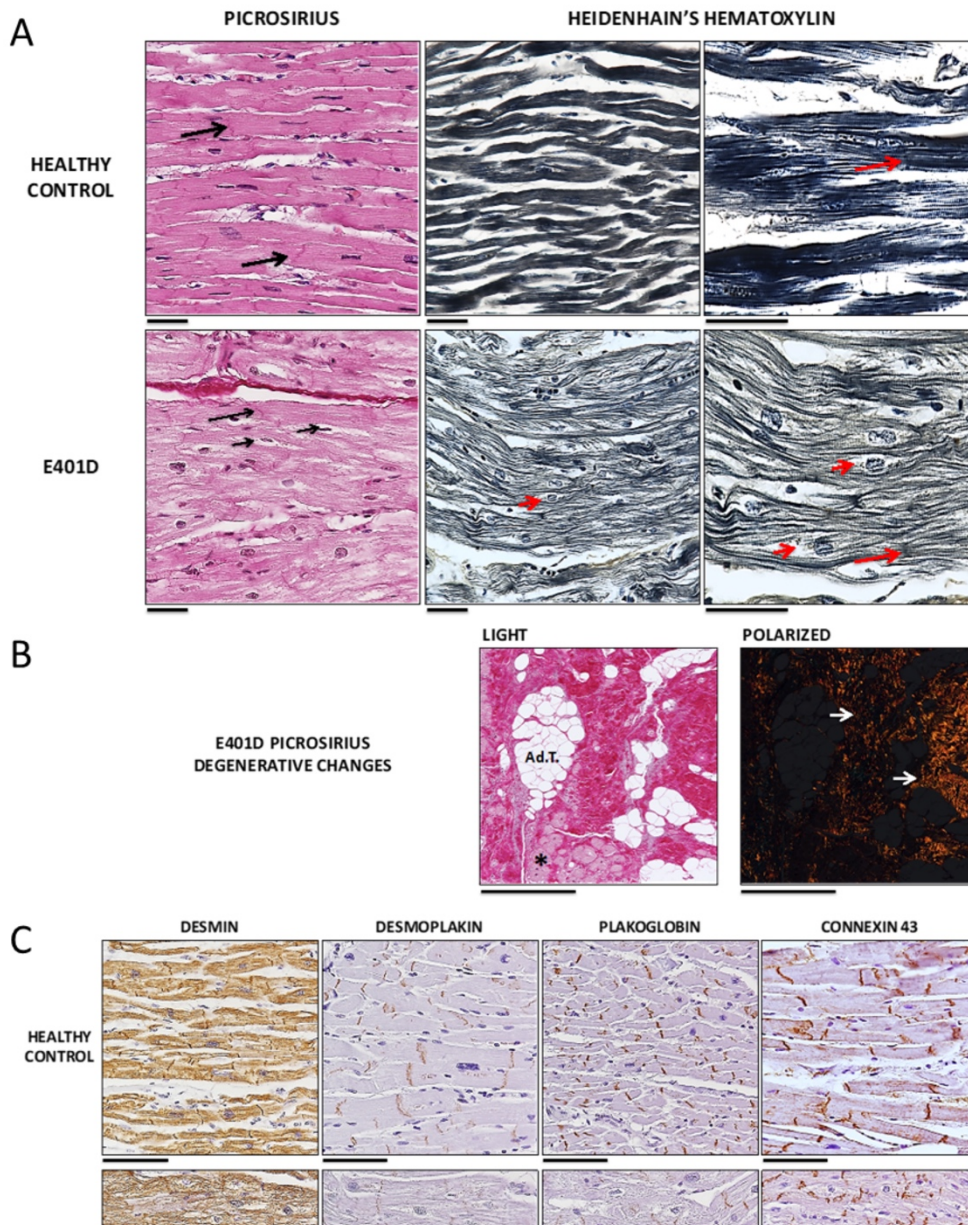
changes, the tissue organization was preserved and comparable to the control. However, cell thickness was irregular, and an increased perinuclear space, accompanied by a relatively normal nucleus, was observed. Curiously, the sarcoplasm of these cells was weakly stained, less dense with less prominent intercalated discs than the control tissue (Figure 4). Heidenhain hematoxylin staining, which specifically stains myofibrils, confirmed the presence of fewer contractile myofibrils in the desmin mutation carrier's myocardium in comparison with the control. Myofibrils were less abundant, poorly organized, and less compacted, with spaces observed among them. Immunohistochemical analysis of desmin showed an intense and homogeneously distributed staining pattern in the sarcoplasm of both cardiac tissues, although it was more intense in the control intercalated discs. In addition, we did not observe any

prominent desmin aggregates in the sarcoplasm of the cardiac tissue from this mutation carrier. After analyzing some important structural and functional proteins of cell–cell junctional complexes at the intercalated discs, desmoplakin, plakoglobin, and connexin-43 were observed to be positive in both cardiac tissues, thus confirming the presence of these junctional complexes. However, desmoplakin and plakoglobin were weakly stained in the myocardial tissue from the mutation carrier in comparison with the control. The connexin-43 intensity and pattern were comparable in control and affected tissue, as previously described with regard to another DES mutation, p.A120D32 (Figure 4C).



### ADMSC Differentiation and Gene Expression Analysis

Cell cultures established from different family members showed that all cell types were able to grow and proliferate *ex vivo* under standard culture conditions. Control cells



**Figure 4. Histological analysis of cardiac tissue affected by desmin mutation.**

**A**, Histochemical analyses of control heart (healthy control) and desmin-mutated cardiac tissue (Glu401Asp) by picrosirius and Heidenhain hematoxylin staining. Large black and red arrows show the intercalary disc, whereas the short black and red arrows show the perinuclear space in Glu401Asp. **B**, Representative images of the fibrotic reaction (arrows), adipose tissue replacement (Ad.T.) and cardiomyocyte degeneration changes (asterisk) in Glu401Asp are shown with picrosirius staining at light and polarized microscopy. **C**, Immunohistochemical analyses of desmin and junctional complex-associated proteins in control heart and desmin-mutated cardiac tissue (Glu401Asp). Positive immunoreaction is shown in brown. Scale bar=50  $\mu$ m for **A** and **B**, and 100  $\mu$ m for **C**.

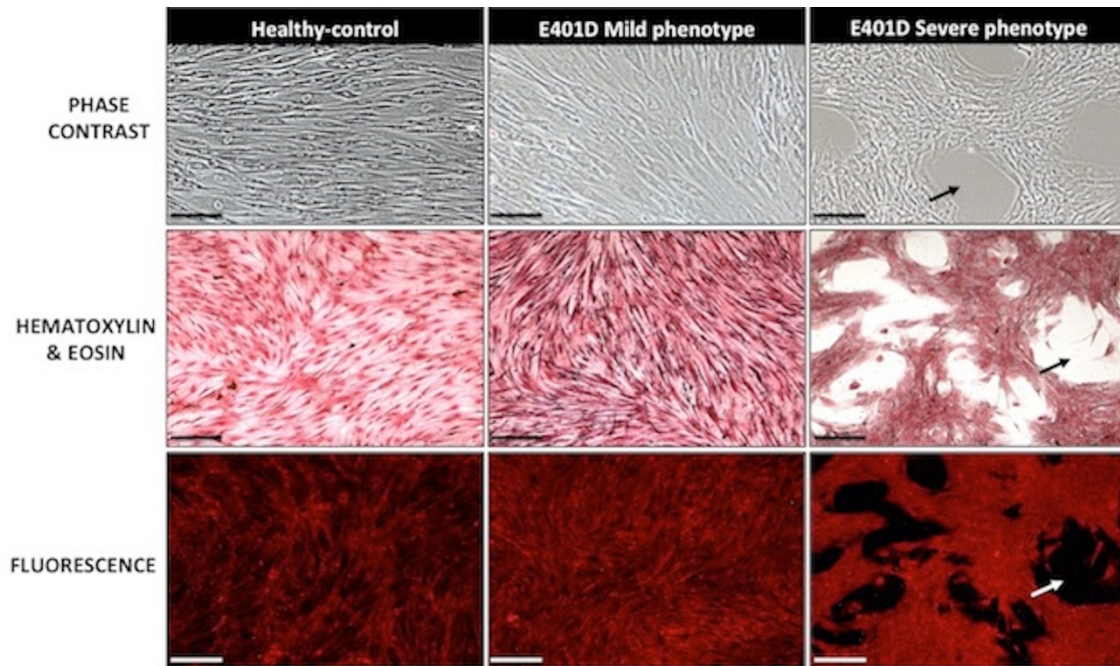
isolated from the control family members without the DES mutation (healthy control) showed a typical mesenchymal morphology (elongated, spindle-shaped, flattened cells). As expected, confluent cells managed to fully cover the culture flask surface, which is typical of mesenchymal stem cells (Figure 5). In a similar manner, cells isolated from

patients with the DES mutation showing mild symptomatology showed similar cell morphology and growth pattern to controls, although they tended to grow and proliferate more slowly. It is curious that cells from the affected DES mutation carrier patient (IV.31) grew much more slowly than the mild phenotype cell line and especially than the healthy control cell line. In addition, these cells presented a typical mesenchymal morphology, although their growth pattern was very different. In fact, they had difficulty adhering to the culture surface, resulting in a reticular pattern, with cells tending to adhere to one another rather than to the culture surface (Figure 5).

When ADMSCs were differentiated into cardiomyocytes, some cells could be observed to acquire a typical cardiomyocyte morphology, although the percentage of cells showing this phenotype was low. Differentiated cells were characterized by a large and polygonal cytoplasm with a thick, well-organized cytoskeleton (see representative images in Figure IIIA in the online-only Data Supplement). Differentiation was confirmed by immunofluorescence for the TNNT2 cardiac marker, which demonstrated that most cells were positive.

Quantitative analysis using real-time quantitative PCR (Figure 6 and Table III in the online-only Data Supplement) showed that desmin gene expression increased more than 23-fold in differentiated cells. However, cells carrying the DES-p.Glu401Asp did not show increased DES expression after cardiomyogenic differentiation. Analysis of the genes selected in this study showed that 9 genes were overexpressed at least 2-fold in cells from probands with mild symptomatology in comparison with healthy control samples, and 40 genes were downregulated at least 2-fold in the same samples. In turn, samples from the proband with advanced cardiomyopathy showed 11 upregulated and 37 downregulated genes in comparison with healthy controls. It is interesting to note that 4 of these genes were overexpressed and 24 downregulated in both the mild-phenotype and severe-phenotype carrier samples in comparison with healthy control samples.





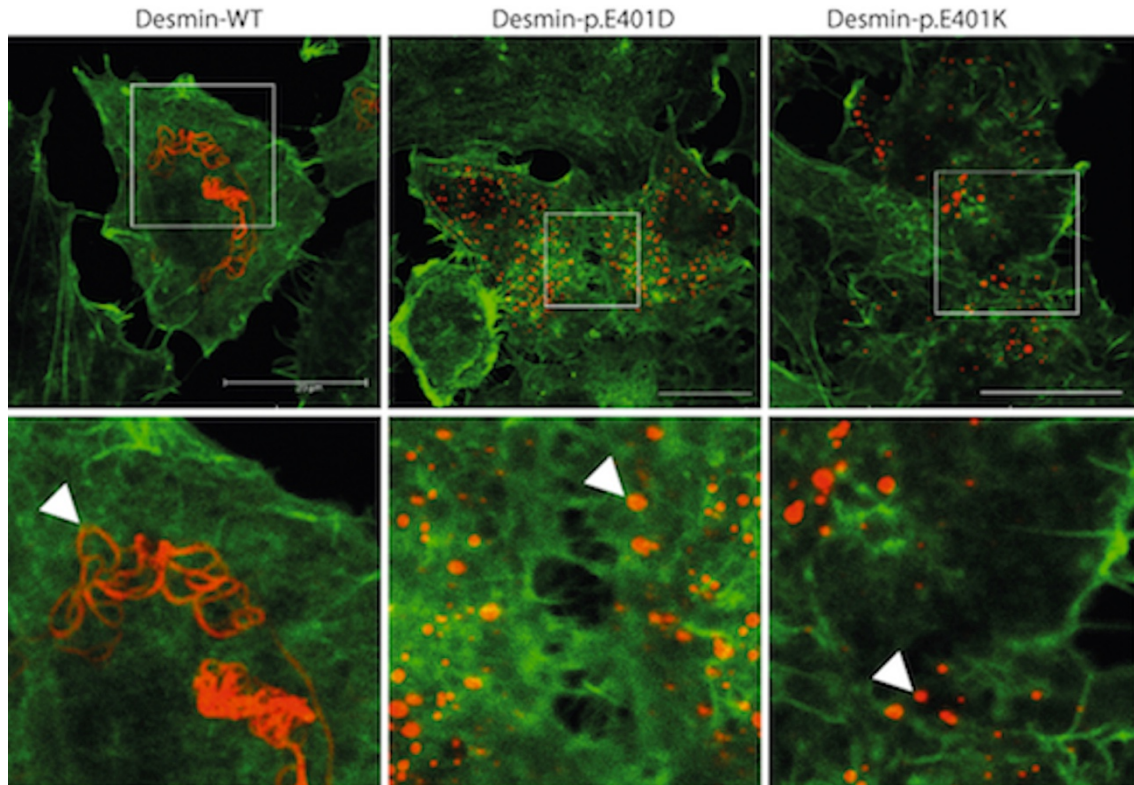
**Figure 5. ADMSC differentiation analysis.** Adherence and ex vivo growth pattern of ADMSCs isolated from 3 members of the family studied, as determined by phase-contrast microscopy, hematoxylin-eosin staining, and fluorescence microscopy, showing the typical spindle-shape, elongated, and flat morphology of cells corresponding to healthy-control and mild-phenotype carrier cases and the reticular pattern shown by severe-phenotype carrier cells, with areas of the culture flask remaining uncovered by cells (arrows). Scale bar=200  $\mu$ m. ADMSC indicates adipose-derived mesenchymal stem cell.

Gene	Mild-Phenotype vs. Healthy-Control	Severe-Phenotype vs. Healthy-Control
ABCC9	4,32768	0,86106
ACTN1	0,36636	0,52371
ACTR1A	0,64766	0,57178
AFAP1	1,45183	0,94535
AKAP9	0,23164	0,41312
ANK2	0,38679	0,46873
ATP2A2	0,3536	0,32125
ATP2B4	0,49358	0,97577
CACNA1C	0,20212	0,2703
CACNA1D	0,06076	0,54382
CACNA1G	0,96445	0,15366
CACNA2D1	0,3289	0,30276
CACNB2	4,05873	0,15948
CALD1	0,1821	0,40811
CALM1	0,77329	0,79171
CALM2	0,31902	0,94116
CALM3	0,37843	0,78607
CAV3	0,48896	0,15495
CCNA1	0,29103	0,10184
CD36	5,49962	0,72231
DES	0,00361	0,02895
DSP	0,1792	0,73246
GAPDH	1	1
GJA1	0,0961	0,03799
GJA5	0,35027	0,10962
GPD1L	0,43803	0,56477
HAND2	0,43266	0,3182
ITGA2	2,80462	2,68293
ITGA7	0,08457	0,01089
JUP	0,07756	6,78413
KCNA5	1,12118	0,23189
KCNE1	0,42075	0,05139
KCNE1L	0,42671	0,30235
KCNE2	0,16991	0,99062
KCNE3	0,04464	1,08117
KCNH2	0,36499	0,13576
KCNJ2	3,79161	0,12035
KCNJ8	1,13837	0,46946
KRT18	0,66643	2,33748
KRT8	0,42898	0,42499
LAMA1	0,14111	0,18654
LAMA2	0,19148	0,30703
LAMA3	1,30486	25,6674
LAMA5	0,11125	0,3885
LAMB1	0,24282	0,67949
LAMB3	5,031	3,35547
LAMC2	0,50877	12,87661
LAMC3	43,35802	72,74506
LAMP2	0,3967	0,40589
LMNA	0,60073	0,83252
MST1R	0,6644	0,2444
NKX2-5	4,54454	0,26178
NPPA	1,10368	0,26172
NTN1	7,39271	4,13974
PLP1	0,60079	0,07703
PRKAG2	0,32955	0,43151
RANGRF	0,46279	0,98886
SCN1B	0,78088	3,58001
SCN3B	0,44988	0,24171
SCN4B	0,25705	0,95074
SNTA1	1,27253	1,67713
TGFB1	0,30877	1,00793
THY1	0,0618	1,164
TNF	0,87931	0,17522
TNNT2	0,01643	0,01114
TRPM4	0,70643	0,41484
TUBA1A	0,36721	1,18692
TUBA3C	0,9077	0,11774
TUBA4A	1,54778	3,58712
TUBB3	0,76403	0,30394
VIM	1,61242	5,56528

**Figure 6. Quantitative gene expression analysis.** Quantitative RNA analysis heatmap revealing relative endogenous gene expression patterns after cardiomyogenic differentiation between the 2 *DES*-mutation carrier cell lines studied (mild-phenotype patient and severe-phenotype patient) and a healthy-control cell line. Colors indicate the range of each gene's expression with least expression shown in red and highest expression shown in green. For absolute quantitative values see [Table III in the online-only Data Supplement](#).

Plasmids and Cell Culture

Given the effect of DES mutations on filament formation in vitro,<sup>33</sup> we attempted to determine whether this is also the case for the novel mutation DES-p.Glu401Asp. We used SW13 cells without any endogenous cytoplasmic intermediate filament protein expression.<sup>34</sup> These experiments showed that both mutations p.Glu401Asp and p.Glu401Lys, which have been previously described,<sup>35</sup> disrupted the intermediate filament structure in the transiently transfected cells. Both mutant desmins formed cytoplasmic aggregates, whereas wild-type desmins formed regular filaments (Figure 7).



**Figure 7. Desmin localization in transfected SW13 cells.** It is worth noting that the *DES* mutation p.Glu401Asp and the previously described mutation p.Glu401Lys form cytoplasmic aggregates (white arrows), whereas wild-type (WT) desmin forms intermediate filaments of different size and shape. Green, fluorescein isothiocyanate-phalloidin; red, desmin; scale bars=20  $\mu$ m.

## **DISCUSSION**

The genes most commonly responsible for classic iARVC/D are those that encode for cardiac desmosomal proteins, being LV involvement and SCD commonly reported because of DSP variants.<sup>36</sup> Nevertheless, with the development of the advanced imaging techniques available today, we know that biven tricular impairment is common, with an even worse prognosis. Also, with the advent of massive parallel sequencing techniques, nondesmosomal genes, such as TMEM43,<sup>13</sup> TGFB3,<sup>37</sup> PLN,<sup>38</sup> and DES,<sup>39</sup> whose mutations generate an iARVC/D phenotype, have been discovered. However, DES mutations more frequently produce a dilated or restrictive cardiomyopathy phenotype, atrioventricular conduction disorder, and skeletal myopathy.<sup>39</sup> This study provides strong evidence on the pathogenicity of this novel DES mutation as a cause of biventricular inherited arrhythmogenic cardiomyopathy/dysplasia with dominant primary LV affection, without conduction system abnormality or traces of skeletal muscular involvement. To our knowledge, this study involves the largest family of a single DES mutation and provides accurate genotype-phenotype cosegregation data. It is based on an interesting functional analysis that suggests the presence of a pathogenic mechanism by which desminopathy is capable of producing an iARVC/D phenotype. In addition, this mutation was not present in healthy controls and does not appear in public databases such as ClinVar or the Exome Aggregated Consortium database. Our results allow us to classify DES p.Glu401Asp as pathogenic according to American College of Medical Genetics and Genomics guidelines on the interpretation of genetic variants.<sup>20</sup>

DES mutations as a cause of iARVC/D were first described in 2009 as typically affecting the right ventricle or causing severe biventricular dysplasia.<sup>40,41</sup> Later, isolated cases of single mutations causing iARVC/D, which involved limited or even with no familial study, were presented.<sup>42-44</sup> Information on the pathogenic mechanisms of DES mutations to produce the inherited arrhythmogenic cardiomyopathy/dysplasia phenotype is rare. Likewise, the reasons for their cardiac and skeletal expression variability are poorly understood. Given the ability of desmin to form a network between the cytoskeleton and desmosomes, the abnormal interaction between both cellular multiprotein complexes may lead to cellular adhesion defects. The desmin molecule contains 3 domains: a central  $\alpha$ -helical rod domain flanked by 2 globular N- and C-terminal domains. The p.Glu401Asp mutation is located in segment 2B of the central rod domain, a highly conserved region in vertebrates, where most DES mutations were found previously.<sup>45</sup> Mutations at this position could eventually produce a critical break in the intra- and interhelical ionic bridges between desmin dimers, as already reported with regard to the mutation p.Glu401Lys.<sup>35</sup> The presence of this mutation could potentially lead to a loss of structural integrity and, consequently, of cellular adhesion, which is considered a crucial factor in the pathogenesis of iARVC/D. Our results corroborate the hypothesis of a disruption in the cellular membrane structural integrity of cells affected by mutation p.Glu401Asp. It is interesting to note that the phenotype exhibited by mutation p.Glu401Asp differs considerably from that associated with mutation p.Glu401Lys, which was described in a 20-year-old man with advanced atrioventricular block and skeletal myopathy.<sup>35</sup> This suggests that aspartic acid in position 401 is likely involved in the specific development of the ARVC/D phenotype with no conduction or skeletal muscle system involvement.

The histological study of the explanted heart of subject III.21 reveals affected (fibrofatty tissue replacement) and more preserved myocardial zones. It is interesting to note that, in the most preserved areas, cardiomyocytes showed an abnormal organization of their contractile apparatus, which was less abundant and poorly organized than in the control myocardium. Furthermore, the immunohistochemical study showed lower expression of desmoplakin and plakoglobin in cell junctions and did not detect any differences in connexin 43, as described elsewhere.<sup>46</sup> The interaction

between the rod region and tail of desmin, which contain recognition binding sites implicated in the interaction with desmoplakin at the desmosome, has been previously described.<sup>47</sup> This means that the position of the mutation and the reduced presence of desmoplakin in the heart tissue are in line with previously published data and could be related to the increased risk of arrhythmic complications observed and to the iARVC/D phenotype. Regarding the slight decrease of plakoglobin in the intercalated disc, it could be supported by previous studies, where a decrease of plakoglobin immunoreaction is considered a consistent feature in patients with iARVC/D.<sup>48</sup> Surprisingly, in our study, we did not observe desmin cytoplasmic aggregates in the cardiac tissue of heterozygous carrier III.21, which appeared in transfected cells *in vitro*. It is well known that most of the desmin mutations are characterized by desmin-positive sarcoplasmic aggregates.<sup>17,49</sup> However, it was demonstrated that desmin mutations (for example, the c.1289-2A>G mutation) can manifest without the formation of these aggregates.<sup>17,50</sup> In our case, this absence could be related to the patient's heterozygous condition. Furthermore, we used a strong cytomegalovirus promoter *in vitro*, which may provoke misfolding of the mutant desmin in cell cultures. In addition, the patient's disease stage could be characterized by Z-disc disorganization and disruption of the intermediate filament network, but, with no desmin aggregates, may also explain the discrepancy of *in vivo* and cell culture findings of this study.<sup>47</sup> Finally, it is probable that this novel DES p.Glu401Asp mutation does not result in the formation of desmin aggregates, but its pathogenic mechanism could be related to an impairment of the adequate myofibril formation and 3-dimensional organization in the sarcoplasm. However, future studies are needed to elucidate the pathogenic mechanism related to this novel desmin mutation.

Analysis of ADMSC cultures revealed early differences between control, mild, and severe phenotypes, with striking cellular growth and adhesion defects in the patient with the severe phenotype. Following its differentiation into cardiomyocytes, RNA analysis showed that desmin expression was lower in the severe phenotype carrier. In addition, significant differences were detected in the RNA expression of different genes associated with cardiomyopathies or channelopathies. It is noteworthy that the lower RNA expression levels of a wide variety of potassium channels in both carrier groups, and the higher expression of SCNIB, a sodium channel with great arrhythmic potential, as well, were found. We also detected differences in the RNA expression of certain proteins between the mild and severe phenotype carriers (Figure 6 and Table III in the online-only Data Supplement). This could explain the variable clinical penetrance of iARVC/D observed in this family. These findings must be interpreted with caution, because their influence *in vivo* on the development of the disease remains unknown. In addition, RNA levels do not necessarily correspond to those of functional proteins in the myocardium. Incomplete clinical penetrance observed in this family is a common feature of iARVC/D. Although genetic, epigenetic, and environmental factors have been proposed, the origin of the incomplete penetrance observed in this family mentioned above is still unclear. Recent data suggest that a specific genetic background can lead to an increased susceptibility to myocarditis as part of an active phase of the disease. In our study, we did not find any myocarditis-like presentation, or suggestive data from histological analysis. However, we cannot definitely discard this possibility in this case. Future investigations are needed to address this issue.<sup>51</sup> It has even been suggested that sex could play a role, because the disease is usually more severe in males.<sup>52</sup> This was also found in the case of the family described in our study; the 4 SCD events and the 2 cardiac transplants occurred in men and, as Figure 3 shows, at an earlier age in males than in females, something described not only for p.Glu401Asp but also for other DES mutations.<sup>53,54</sup> According to our data, cardiac events in p.Glu401Asp carriers are particularly prevalent in men from 20 to 40 years, especially SCD, and life-saving therapies such as cardiac defibrillators should be promptly indicated in these cases.

In conclusion, DES mutation p.Glu401Asp causes iARVC/D with predominant LV

involvement in the absence of skeletal myopathy and conduction system disturbance, with a high incidence of adverse clinical events. The pathogenic mechanism likely corresponds to alterations in desmin dimer assembly and its connection with membrane proteins that disrupt the membrane and cell–cell adhesion integrity.

### **ARTICLE INFORMATION**

Received April 3, 2017; accepted November 9, 2017.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028719/-/DC1>.

#### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Drs Rosa Ortega and Salvador Arias-Santiago for collecting tissue from the explanted heart and the adipose biopsies, respectively, for research purposes, and Laura Cortiñas for her assistance in image collecting. These results are from Dr Bermudez-Jiménez's PhD program.

#### **Sources of Funding**

Dr Milting was funded by grants from the German Research Foundation (MI 1146/2-1) and the Erich and Hanna Klessmann Foundation (Gütersloh, Germany). Histological, histochemical, immunohistochemical, real-time quantitative reverse transcription PCR, and mesenchymal stem cells differentiation studies were performed and supported by members of the Tissue Engineering Group of the Department of Histology of the University of Granada, Spain (Drs Carriel, Alaminos, and Campos).

#### **Disclosures**

None.



**SUPPLEMENTAL MATERIAL**

<b>Antibodies</b>	<b>Pretreatment</b>	<b>Dilution Incubation time</b>	<b>Reference</b>
Rabbit monoclonal anti-desmin, clone Y66	Buffer EDTA pH8 25 min at 95°C.	1:75 PBS+tween20 Overnight at 4°C	Abcam: Cat. No: ab32362
Mouse monoclonal anti-Desmoplakin, clone DPI/II 236.23.1	Buffer citrate pH6 25 min at 95°C.	Ready-to-use 1 h r/t	Acris Antibodies: Cat.no: AM09122SU-N
Mouse monoclonal anti-plakoglobin, clone PG 5.1	Buffer citrate pH6 25 min at 95°C.	1:25 PBS+tween20 1 h r/t	Acris Antibodies: Cat. no: BM5100
Rabbit polyclonal Anti-connexin 43/GJA1	Buffer citrate pH6 25 min at 95°C.	1:5000 PBS+tween20 1 h 1 h r/t	Abcam: Cat. No: ab11370
Immpress anti-mouse IgG (peroxidase)	-	Ready-to-use 30 min.	Vector Laboratories Cat. no.: MP 7402
Immpress anti-rabbit IgG (peroxidase)	-	Ready-to-use 30 min.	Vector Laboratories: Cat. No.: MP-7401

Supplemental Table 2: Co-segregation and phenotype features

	<b>Carriers (n=23)</b>	<b>Non-carriers (n=43)</b>	<b>Value <i>p</i></b>
<b>Age, years</b>	38,6±21,5	45,8±17,9	<i>p</i> = 0.150
<b>Females, n (%)</b>	13 (56,5)	19 (44,2)	<i>p</i> = 0.339
<b>Arrhythmogenic cardiomyopathy phenotype</b>	23 (100 %)	0 (0 %)	<i>p</i> = 0.00001
<b>Events</b>	<b>(n = 25)</b>	<b>(n = 43)</b>	
<b>Sudden death, n (%)</b>	4 (16)	0	<i>p</i> = 0.041
<b>Cardiac transplantation, n (%)</b>	2 (8)	0	<i>p</i> = 0.115
<b>Heart failure deaths, n (%)</b>	2 (8)	1 (2,3)	<i>p</i> = 0.009
<b>AV block, n (%)</b>	1 (4)	1 (2,3)	<i>p</i> = 0.545
<b>Asymptomatic individuals, n (%)</b>	15 (60)	41 (95,3)	<i>p</i> = 0.001
<b>Electrocardiogram</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=42)</b>	
<b>Sinus rhythm, n (%)</b>	16 (80)	40 (95.2)	<i>p</i> = 0.079
<b>PR, ms</b>	156,8±33,22	158,8±31,9	<i>p</i> = 0.831
<b>QRS, ms</b>	96,9±24,2	83,5±12,4	<i>p</i> = 0.007
<b>Epsilon wave, n (%)</b>	2 (10)	0	<i>p</i> = 0.104
<b>Inverted T-wave*, n (%)</b>	14 (70)	1 (2,4)	<i>p</i> = 0.001
<b>S wave, ms</b>	48,80±17,61	31±7	<i>p</i> = 0.001
<b>Low voltage†, n (%)</b>	12 (60)	4 (9,5)	<i>p</i> = 0.001
<b>Q wave, n (%)</b>	3 (9,1)	0	<i>p</i> = 0.008

Data expressed as mean±SD or as absolute and percentage values. AV block=atrio-ventricular block; LBBB=left bundle branch block; LAFB=left anterior fascicular block; LPFB=left posterior fascicular block. \*Inverted T wave in at least 3 precordial consecutive leads. †Low voltage as QRS below 5 mm in frontal leads and below 10 mm in precordial leads. N = 19 for S wave, Q wave and low voltage values which are not assessable in patients with pacemakers.



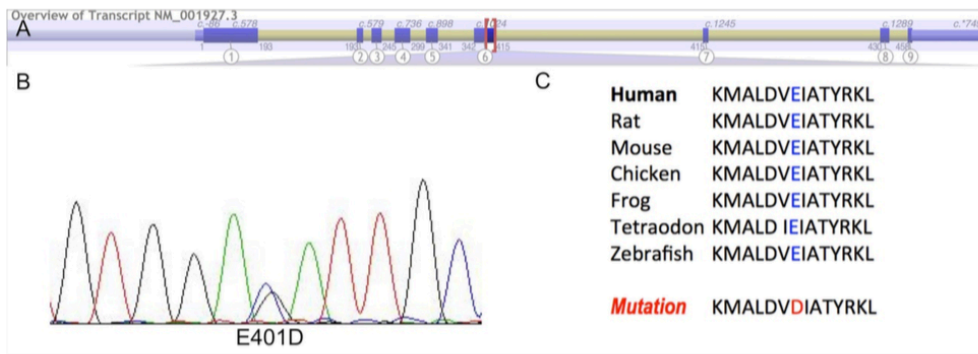
**Supplemental Table 3. Average fold-change expression of each gene for the three cell types studied.**

GENE	HEALTHY-CONTROL (BASAL LEVELS)	MILD-PHENOTYPE CARRIER	SEVERE-PHENOTYPE CARRIER	MILD-PHENOTYPE VS. HEALTHY-CONTROL	SEVERE-PHENOTYPE VS. HEALTHY-CONTROL
ABCC9	0.37485	1.62223	0.32277	4.32768 <sup>†</sup>	0.86106
ACTN1	0.62804	0.23009	0.32891	0.36636*	0.52371
ACTR1A	0.94679	0.6132	0.54136	0.64766	0.57178
AFAP1	0.85164	1.23644	0.8051	1.45183	0.94535
AKAP9	1.03355	0.23941	0.42698	0.23164*	0.41312*
ANK2	2.30319	0.89086	1.07958	0.38679*	0.46873*
ATP2A2	0.89712	0.31722	0.2882	0.3536*	0.32125*
ATP2B4	0.26699	0.13178	0.26052	0.49358*	0.97577
CACNA1C	1.5354	0.31034	0.41502	0.20212*	0.2703*
CACNA1D	7.37249	0.44794	4.00928	0.06076*	0.54382
CACNA1G	29.03732	28.00506	4.46191	0.96445	0.15366*
CACNA2D1	1.03869	0.34163	0.31447	0.3289*	0.30276*
CACNB2	10.61038	43.0647	1.69219	4.05873 <sup>†</sup>	0.15948*
CALD1	0.56151	0.10225	0.22916	0.1821*	0.40811*
CALM1	0.51251	0.39632	0.40576	0.77329	0.79171
CALM2	0.28876	0.09212	0.27177	0.31902*	0.94116
CALM3	0.66462	0.25151	0.52244	0.37843*	0.78607
CAV3	10.40851	5.08932	1.61281	0.48896*	0.15495*
CNNA1	9.53847	2.77602	0.97142	0.29103*	0.10184*
CD36	4.94351	27.18741	3.57076	5.49962 <sup>†</sup>	0.72231
DES	23.34169	0.08425	0.67582	0.00361*	0.02895*
DSP	0.55323	0.09914	0.40522	0.1792*	0.73246
GAPDH	1	1	1	1	1
GJA1	6.27905	0.60342	0.23851	0.0961*	0.03799*
GJA5	18.50405	6.48133	2.02842	0.35027*	0.10962*
GPD1L	1.62785	0.71305	0.91936	0.43803*	0.56477
HAND2	1.65023	0.71399	0.52511	0.43266*	0.3182*
ITGA2	0.16148	0.45289	0.43324	2.80462 <sup>†</sup>	2.68293 <sup>†</sup>
ITGA7	63.78739	5.39448	0.69433	0.08457*	0.01089*
JUP	3.38439	0.2625	22.96015	0.07756*	6.78413 <sup>†</sup>
KCNA5	8.04724	9.02239	1.86604	1.12118	0.23189*
KCNE1	15.27384	6.42647	0.78489	0.42075*	0.05139*
KCNE1L	0.83943	0.35819	0.2538	0.42671*	0.30235*
KCNE2	5.83094	0.99076	5.77625	0.16991*	0.99062
KCNE3	2.58353	0.11532	2.79323	0.04464*	1.08117
KCNH2	10.959	3.99992	1.48776	0.36499*	0.13576*
KCNJ2	2.43261	9.22352	0.29276	3.79161 <sup>†</sup>	0.12035*
KCNJ8	0.4561	0.51921	0.21412	1.13837	0.46946*
KRT18	1.08858	0.72546	2.54453	0.66643	2.33748 <sup>†</sup>
KRT8	2.76621	1.18665	1.17562	0.42898*	0.42499*
LAMA1	3.7576	0.53022	0.70093	0.14111*	0.18654*
LAMA2	6.94451	1.32971	2.13218	0.19148*	0.30703*
LAMA3	0.29489	0.38479	7.56906	1.30486	25.6674 <sup>†</sup>
LAMA5	10.82171	1.20392	4.20427	0.11125*	0.3885*
LAMB1	2.05762	0.49964	1.39813	0.24282*	0.67949
LAMB3	0.17675	0.88923	0.59308	5.031 <sup>†</sup>	3.35547 <sup>†</sup>
LAMC2	0.18527	0.09426	2.38565	0.50877	12.87661 <sup>†</sup>
LAMC3	1.03242	44.7637	75.10345	43.35803 <sup>†</sup>	72.74506 <sup>†</sup>
LAMP2	0.94054	0.37311	0.38176	0.3967*	0.40589*
LMNA	0.67015	0.40258	0.55791	0.60073	0.83252
MST1R	6.13946	4.07908	1.50047	0.6644	0.2444*
NKX2-5	6.13766	27.89287	1.60672	4.54454 <sup>†</sup>	0.26178*
NPPA	1.6961	1.87195	0.44391	1.10368	0.26172*
NTN1	0.38644	2.85684	1.59976	7.39271 <sup>†</sup>	4.13974 <sup>†</sup>
PLP1	13.81188	8.29808	1.06397	0.60079	0.07703*
PRKAG2	1.14761	0.3782	0.4952	0.32955*	0.43151*
RANGRF	0.6157	0.28494	0.60884	0.46279*	0.98886
SCN1B	0.44925	0.35081	1.60832	0.78088	3.58001 <sup>†</sup>
SCN3B	2.67196	1.20205	0.64583	0.44988*	0.24171*
SCN4B	0.41837	0.10754	0.39776	0.25705*	0.95074
SNTA1	0.7211	0.91762	1.20938	1.27253	1.67713
TGFB1	0.60009	0.18529	0.60485	0.30877*	1.00793
THY1	1.55788	0.09627	1.81337	0.0618*	1.164
TNF	8.87714	7.80576	1.55546	0.87931	0.17522*
TNNT2	226.44801	3.72025	2.52363	0.01643*	0.01114*
TRPM4	0.92799	0.65556	0.38497	0.70643	0.41484*
TUBA1A	0.25925	0.0952	0.30771	0.36721*	1.18692
TUBA3C	11.23201	10.19527	1.32242	0.9077	0.11774*
TUBA4A	0.26664	0.4127	0.95647	1.54778	3.58712 <sup>†</sup>
TUBB3	2.96315	2.26394	0.90063	0.76403	0.30394*
VIM	0.43189	0.69639	2.40359	1.61242	5.56528 <sup>†</sup>

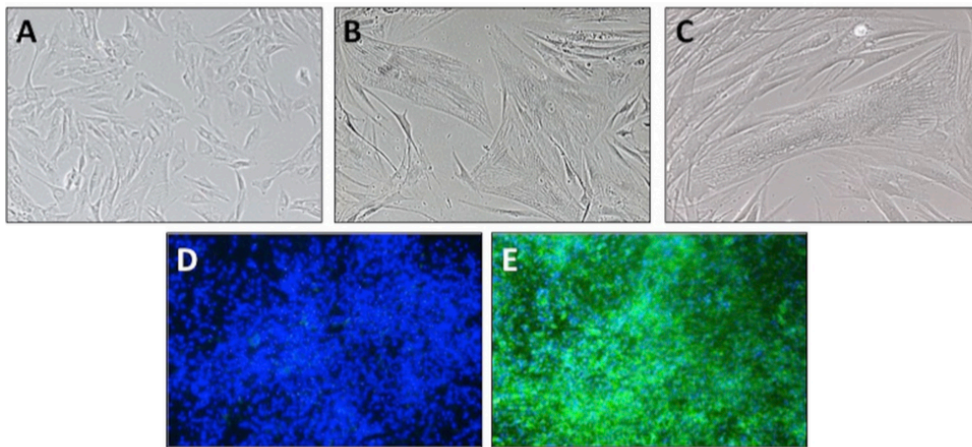
Values in columns on the left correspond to relative expression of each gene after cardiomyogenic differentiation (fold-change of differentiated cells vs. non-differentiated cells). Columns on the right show the relative increase or decrease for each gene as compared to healthy-control basal levels. Genes showing at least a 2-fold decrease relative to basal levels are labeled with an asterisk (\*); genes showing at least a 2-fold increase are labeled with two asterisks (†).

**Supplemental Figure 1: List of genes included in the NGS panel.**

AARS2, ABCC9, ACAD9, ACADVL, ACTA1, ACTA2, ACTC1, ACTN2, AGK, AGL, AGPAT2, ALMS1, ANK2, ANKRD1, ATPAF2, BAG3, BRAF, BSCL2, CALR3, CASQ2, CAV3, CBL, CO12, COX15, COX6B1, CRELD1, CRYAB, CSRP3, CTF1, CTNNA3, DES, DLD, DMD, DNAJC19, DOLK, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, ELN, EMD, EYA4, FAH, FHL1, FHL2, FHOD3, FKRP, FKTN, FLNA, FLNC, FOXD4, GAA, GATA4, GATA6, GATAD1, GFM1, GJA1, GJA5, GLA, GLB1, GNPTAB, GUSB, HCN4, HFE, HRAS, JAG1, JPH2, JUP, KCNH2, KCNJ2, KCNJ8, KCNQ1, KLF10, KRAS, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, LIAS, LMNA, MAP2K1, MAP2K2, MIB1, MLYCD, MRPL3, MRPS22, MTO1, MURC, MYBPC3, MYH11, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK2, MYOT, MYOZ2, MYPN, NEBL, NEXN, NKX2-5, NOTCH1, NRAS, OBSL1, PDHA1, PDLIM3, PHKA1, PITX2, PKP2, PLN, PMM2, PRDM16, PRKAG2, PSEN1, PSEN2, PTPN11, RAF1, RBM20, RYR2, SCN5A, SGCA, SGCB, SGCD, SHOC2, SLC22A5, SLC25A4, SMAD3, SOS1, SPRED1, SURF1, TAZ, TBX1, TBX20, TBX5, TCAP, TGFB3, TMEM43, TMEM70, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRIM63, TSFM, TTN, TTR, TXNRD2, VCL.

**Supplemental Figure 2: Desmin mutation Glu401Asp.**

A. Localization of residue 401 in coil 2B of helical alpha central rod domain. B: Sanger sequencing electropherogram of mutation. C. Species alignment reveals high degree of conservation of aspartate 401.

**Supplemental Figure 3: Adipose-derived mesenchymal stem cells differentiated to the cardiomyogenic phenotype**

Illustrative images corresponding to non-differentiated ADMSCs (A and D) and ADMSCs differentiated to the cardiomyogenic phenotype (B, C and E) analyzed by phase contrast microscopy (A, B and C) and TNNT2 immunocytochemistry (D, E)

**REFERENCES**

1. Corrado D, Basso C, Thiene G, McKenna WJ, Davies MJ, Fontaliran F, Nava A, Silvestri F, Blomstrom-Lundqvist C, Wlodarska EK, Fontaine G, Camerini F. Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1512–1520.
2. Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C, Grosgogeat Y. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation*. 1982;65:384–398.
3. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, McKenna WJ. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. *Circulation*. 2007;115:1710–1720. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660241.
4. Basso C, Corrado D, Bauce B, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:1233–1246. doi: 10.1161/CIRCEP.111.962035.
5. Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med*. 1998;339:364–369. doi: 10.1056/NEJM199808063390602.
6. Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G, Martini B, Stritoni P, Fasoli G. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: a study involving nine families. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:1222–1228.
7. Michalodimitrakis M, Papadomanolakis A, Stiakakis J, Kanaki K. Left side right ventricular cardiomyopathy. *Med Sci Law*. 2002;42:313–317. doi: 10.1177/002580240204200406.
8. Berte B, Denis A, Amraoui S, Yamashita S, Komatsu Y, Pillois X, Sacher F, Mahida S, Wielandts JY, Sellal JM, Frontera A, Al Jefairi N, Derval N, Mon- taudon M, Laurent F, Hocini M, Haïssaguerre M, Jaïs P, Cochet H. Char- acterization of the left- sided substrate in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:1403–1412. doi: 10.1161/CIRCEP.115.003213.
9. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Prasad SK, Hughes SE, Merrifield R, Ward D, Pennell DJ, McKenna WJ. Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopa- thy: an underrecognized clinical entity. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2175– 2187. doi: 10.1016/j.jacc.2008.09.019.
10. Schuler PK, Haegeli LM, Saguner AM, Wolber T, Tanner FC, Jenni R, Corti N, Lüscher TF, Brunckhorst C, Duru F. Predictors of appropriate ICD therapy in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: long term experience of a tertiary care center. *PLoS One*. 2012;7:e39584.
11. Yu J, Hu J, Dai X, Cao Q, Xiong Q, Liu X, Liu X, Shen Y, Chen Q, Hua W, Hong K. SCN5A mutation in Chinese patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Herz*. 2014;39:271–275. doi:10.1007/s00059-013- 3998-5.
12. van der Zwaag PA, van Rijsingen IA, Asimaki A, Jongbloed JD, van Veld- huisen DJ, Wiesfeld AC, Cox MG, van Lochem LT, de Boer RA, Hofstra RM, Christiaans I, van Spaendonck-Zwarts KY, Lekanne dit Deprez RH, Judge DP, Calkins H, Suurmeijer AJ, Hauer RN, Saffitz JE, Wilde AA, van den Berg MP, van Tintelen JP. 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.* 2012;14:1199–1207. doi: 10.1093/eurjhf/hfs119.

13. Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, Kupprion C, Ramadanova K, Thierfelder L, McKenna W, Gallagher B, Morris-Larkin L, Bassett AS, Parfrey PS, Young TL. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet.* 2008;82:809–821. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.01.010.

14. Milting H, Klauke B, Christensen AH, Müsebeck J, Walhorn V, Grannemann S, Münnich T, Šarić T, Rasmussen TB, Jensen HK, Mogensen J, Baecker C, Romaker E, Laser KT, zu Knyphausen E, Kassner A, Gummert J, Judge DP, Connors S, Hodgkinson K, Young TL, van der Zwaag PA, van Tintelen JP, Anselmetti D. The TMEM43 Newfoundland mutation p.S358L causing ARVC-5 was imported from Europe and increases the stiffness of the cell nucleus. *Eur Heart J.* 2015;36:872–881. doi: 10.1093/eurheartj/ehu077.

15. Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M, Zorio E, Salgado-Aranda R, Climent V, Padrón-Barthe L, Duro-Aguado I, Jiménez-Jáimez J, Hidalgo-Olivares VM, García-Campo E, Lanzillo C, Suárez-Mier MP, Yonath H, Marcos-Alonso S, Ochoa JP, Santomé JL, García-Giustiniani D, Rodríguez-Garrido JL, Domínguez F, Merlo M, Palomino J, Peña ML, Trujillo JP, Martín-Vila A, Stolfo D, Molina P, Lara-Pezzi E, Calvo-Iglesias FE, Nof E, Calò L, Barriales-Villa R, Gimeno-Blanes JR, Arad M, García-Pavía P, Monserrat L. Truncating FLNC mutations are associated with high-risk dilated and arrhythmogenic cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68:2440–2451. doi: 10.1016/j.jacc.2016.09.927.

16. Sarantitis I, Papanastasopoulos P, Manousi M, Baikoussis NG, Apostolakis E. The cytoskeleton of the cardiac muscle cell. *Hellenic J Cardiol.* 2012;53:367–379.

17. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;32:113–120. doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.004.

18. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt JU. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015;16:233–270. doi: 10.1093/ehjci/jev014.

19. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, Calkins H, Corrado D, Cox MG, Daubert JP, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard MH, Protonotarios N, Saffitz JE, Sanborn DM, Steinberg JS, Tandri H, Thiene G, Towbin JA, Tsatsopoulou A, Wichter T, Zareba W. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J.* 2010;31:806–814. doi: 10.1093/eurheartj/ehq025.

20. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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.* 2015;17:405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.

21. Carriel V, Campos F, Aneiros-Fernández J, Kiernan JA. Tissue fixation and processing for the histological identification of lipids. *Methods Mol Biol.* 2017;1560:197–206. doi:10.1007/978-1-4939-6788-9\_14.
22. Carriel V, Aneiros-Fernández J, Ruyffelaert M, Arias-Santiago S, Riady V, Izquierdo-Martínez F, Roda O, Cornelissen M, Campos A, Alaminos M. Histological and immunohistochemical study of an unusual type of gall-bladder duplication. *Histol Histopathol.* 2014;29:957–964. doi: 10.14670/HH-29.957.
23. Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* 3rd ed. Boston, MA: Butterworth Heinemann; 1999.
24. Carriel V, Garzón I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bioartificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11:553–563. doi: 10.1002/term.1949.
25. Brodehl A, Dieding M, Biere N, Unger A, Klauke B, Walhorn V, Gummert J, Schulz U, Linke WA, Gerull B, Vorgert M, Anselmetti D, Milting H. Functional characterization of the novel DES mutation p.L136P associated with dilated cardiomyopathy reveals a dominant filament assembly defect. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;91:207–214. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.015.
26. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003;21:577–581. doi: 10.1002/humu.10212.
27. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:308–311.
28. Fu W, O'Connor TD, Jun G, Kang HM, Abecasis G, Leal SM, Gabriel S, Rieder MJ, Altshuler D, Shendure J, Nickerson DA, Bamshad MJ, Akey JM; NHLBI Exome Sequencing Project. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature.* 2013;493:216–220. doi: 10.1038/nature11690.
29. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Hoover J, Jang W, Katz K, Ovetsky M, Riley G, Sethi A, Tully R, Villamarin-Salomon R, Rubinstein W, Maglott DR. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D862–D868. doi: 10.1093/nar/gkv1222.
30. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won HH, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285–291. doi: 10.1038/nature19057.

31. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, Kan NG, Forcales S, Puri PL, Leone TC, Marine JE, Calkins H, Kelly DP, Judge DP, Chen HS. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494:105–110. doi: 10.1038/nature11799.
32. Brodehl A, Dieding M, Klauke B, Dec E, Madaan S, Huang T, Gargus J, Fatima A, Saric T, Cakar H, Walhorn V, Tönsing K, Skrzypczyk T, Cebulla R, Gerdes D, Schulz U, Gummert J, Svendsen JH, Olesen MS, Anselmetti D, Christensen AH, Kimonis V, Milting H. The novel desmin mutant p.A120D impairs filament formation, prevents intercalated disk localization, and causes sudden cardiac death. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6:615–623. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000103.
33. Brodehl A, Hedde PN, Dieding M, Fatima A, Walhorn V, Gayda S, Šarić T, Klauke B, Gummert J, Anselmetti D, Heilemann M, Nienhaus GU, Milting H. Dual color photoactivation localization microscopy of cardiomyopathy-associated desmin mutants. *J Biol Chem*. 2012;287:16047–16057. doi:10.1074/jbc.M111.313841.
34. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res*. 1991;69:1476–1486.
35. Goudeau B, Rodrigues-Lima F, Fischer D, Casteras-Simon M, Sambuughin N, de Visser M, Laforet P, Ferrer X, Chapon F, Sjöberg G, Kostareva A, Se-jersen T, Dalakas MC, Goldfarb LG, Vicart P. Variable pathogenic potentials of mutations located in the desmin alpha-helical domain. *Hum Mutat*. 2006;27:906–913. doi: 10.1002/humu.20351.
36. Bauce B, Basso C, Rampazzo A, Beffagna G, Daliento L, Frigo G, Malacrida S, Settimo L, Danieli G, Thiene G, Nava A. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations. *Eur Heart J*. 2005;26:1666–1675. doi: 10.1093/eurheartj/ehi341.
37. Beffagna G, Occhi G, Nava A, Vitiello L, Ditadi A, Basso C, Bauce B, Carraro G, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA, Rampazzo A. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res*. 2005;65:366–373. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.10.005.
38. Groeneweg JA, van der Zwaag PA, Jongbloed JD, Cox MG, Vreeker A, de Boer RA, van der Heijden JF, van Veen TA, McKenna WJ, van Tintelen JP, Dooijes D, Hauer RN. Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy in a large family: associated desmosomal or nondesmosomal genotype? *Heart Rhythm*. 2013;10:548–559. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.12.020.
39. Taylor MR, Slavov D, Ku L, Di Lenarda A, Sinagra G, Carniel E, Haubold K, Boucek MM, Ferguson D, Graw SL, Zhu X, Cavanaugh J, Sucharov CC, Long CS, Bristow MR, Lavori P, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry; BEST (Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial) DNA Bank. Prevalence of desmin mutations in dilated cardio- myopathy. *Circulation*. 2007;115:1244–1251. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646778.
40. van Tintelen JP, Van Gelder IC, Asimaki A, Suurmeijer AJ, Wiesfeld AC, Jongbloed JD, van den Wijngaard A, Kuks JB, van Spaendonck-Zwarts KY, Notermans N, Boven L, van den Heuvel F, Veenstra-Knol HE, Saffitz JE, Hofstra RM, van den Berg MP. Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single mis- sense mutation in the DES gene. *Heart Rhythm*. 2009;6:1574–1583. doi: 10.1016/j.hrthm.2009.07.041.

41. Otten E, Asimaki A, Maass A, van Langen IM, van der Wal A, de Jonge N, van den Berg MP, Saffitz JE, Wilde AA, Jongbloed JD, van Tintelen JP. Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks. *Heart Rhythm*. 2010;7:1058–1064. doi: 10.1016/j.hrthm.2010.04.023.
42. Klauke B, Kossmann S, Gaertner A, Brand K, Stork I, Brodehl A, Dieding M, Walhorn V, Anselmetti D, Gerdes D, Bohms B, Schulz U, Zu Knyphausen E, Vorgerd M, Gummert J, Milting H. De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*. 2010;19:4595–4607. doi: 10.1093/hmg/ddq387.
43. Lorenzon A, Beffagna G, Bauce B, De Bortoli M, Li Mura IE, Calore M, Dazzo E, Basso C, Nava A, Thiene G, Rampazzo A. Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2013;111:400–405. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.10.017.
44. Ripoll-Vera T, Zorio E, Gámez JM, Molina P, Govea N, Crémer D. Phenotypic patterns of cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. a clinical and genetic study in two inherited heart disease units. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015;68:1027–1029.
45. Azzimato V, Genneback N, Tabish AM, Buyandelger B, Knöll R. Desmin, desminopathy and the complexity of genetics. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;92:93–95. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.01.017.
46. Goldfarb LG, Dalakas MC. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest*. 2009;119:1806–1813. doi: 10.1172/JCI38027.
47. Lapouge K, Fontao L, Champlaud MF, Jaunin F, Frias MA, Favre B, Paulin D, Green KJ, Borradori L. New insights into the molecular basis of desmoplakin and desmin-related cardiomyopathies. *J Cell Sci*. 2006;119(pt 23):4974–4985. doi: 10.1242/jcs.03255.
48. Asimaki A, Tandri H, Huang H, Halushka MK, Gautam S, Basso C, Thiene G, Tsatsopoulou A, Protonotarios N, McKenna WJ, Calkins H, Saffitz JE. A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2009;360:1075–1084. doi: 10.1056/NEJMoa0808138.
49. Smolina N, Bruton J, Sjoberg G, Kostareva A, Sejersen T. Aggregate-prone desmin mutations impair mitochondrial calcium uptake in primary myotubes. *Cell Calcium*. 2014;56:269–275. doi: 10.1016/j.ceca.2014.08.001.
50. Cetin N, Balci-Hayta B, Gundesli H, Korkusuz P, Purali N, Talim B, Tan E, Selcen D, Erdem-Ozdamar S, Dincer P. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *J Med Genet*. 2013;50:437–443. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101487.
51. Lopez-Ayala JM, Pastor-Quirante F, Gonzalez-Carrillo J, Lopez-Cuenca D, Sanchez-Munoz JJ, Oliva-Sandoval MJ, Gimeno JR. Genetics of myocarditis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Heart Rhythm*. 2015;12:766–773. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.01.001.
52. Mazzanti A, Ng K, Faragli A, Maragna R, Chiodaroli E, Orphanou N, Monteforte N, Memmi M, Gambelli P, Novelli V, Bloise R, Catalano O, Moro G, Tibollo V, Morini M, Bellazzi R, Napolitano C, Bagnardi V, Priori SG. Arrhythmogenic right



ventricular cardiomyopathy: clinical course and predictors of arrhythmic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68:2540–2550. doi: 10.1016/j.jacc.2016.09.951.

53. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quiñones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1999;100:461–464.

54. Bär H, Schopferer M, Sharma S, Hochstein B, Mücke N, Herrmann H, Willenbacher N. Mutations in desmin's carboxy-terminal "tail" domain severely modify filament and network mechanics. *J Mol Biol.* 2010;397:1188–1198. doi: 10.1016/j.jmb.2010.02.024.