



# **Bases fisiopatológicas y moleculares de la miocardiopatía arritmogénica en un modelo animal para Placofilina-2 truncada**

**JAVIER MONCAYO ARLANDI**

Tesis doctoral

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Universidad de Valencia

2016

Directores

Dr. Ramon Brugada Terradellas

Dr. Antonio Díez Juan

Tutor

Dr. José Enrique O'Connor Blasco





El **Dr. Ramon Brugada Terradellas**, director del Centro de Genética Cardiovascular del *Institut d'Investigació Biomèdica de Girona* y profesor asociado de la Universidad de Girona, en calidad de codirector.

El **Dr. Antonio Díez Juan**, jefe de sección de innovación de productos de IGENOMIX S.L. y profesor asociado de la Universidad de Valencia en calidad de codirector.

El **Dr. José Enrique O'Connor Blasco**, catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, en calidad de tutor.

Informan que:

El trabajo titulado “**Bases fisiopatológicas y moleculares de la cardiomiopatía arritmogénica en un modelo de ratón para Placofilina-2 truncada**” ha sido desarrollado por el Sr. Javier Moncayo Arlandi bajo nuestra supervisión para la obtención del grado de Doctor en Biomedicina y Biotecnología por la Universidad de Valencia, y para que así conste a los efectos oportunos, firmados este documento.

Dr. Ramon Brugada Terradellas

Dr. Antonio Díez Juan

Dr. José Enrique O'Connor Blasco



*A todos aquellos que creyeron en mí  
durante los momentos difíciles*





---

## **i. Agradecimientos**

Dicen que las victorias son más dulces cuanto más duro ha sido conseguirla... ¡No podía ser más cierto!

Echando la vista atrás, me vienen a la mente momentos difíciles, llenos de angustia y estrés que hicieron flaquear mis fuerzas en esto de la ciencia, aunque también me hicieron darme cuenta de cuanto me gusta este trabajo. Todas esas barreras que me encontré por el camino no las superé solo, sino que lo hice acompañado de muchas personas que han sido fundamentales para que yo haya llegado al día de hoy. A todas ellas debo, en gran medida esta tesis, a las cuales quiero dedicar estas líneas.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores, Toni y Ramon, sin quienes este trabajo habría sido imposible de realizar. Toni, contigo inicié este camino, y aunque no pudimos acabarlo juntos, siempre te agradeceré la oportunidad que me brindaste en tu laboratorio. Creo que pasamos muchos momentos difíciles juntos, pero también otros muchos de risas y pasión científica que, sin duda, han hecho que piense en la ciencia como algo divertido e imaginativo. Gracias por toda la ayuda que siempre me prestaste.

Que decir de ti, Ramon. Me salvaste cuando más hundido estaba, y eso lo recordaré siempre. Sin una estrategia de tesis clara y con pésimos resultados, depositaste en mi la confianza que aún no me había ganado, y eso no tiene precio. Siempre me diste buenos consejos, cosa difícil de hacer cuando tienes 20 proyectos en mente. Es una cosa sorprendente lo tuyo. Yo solo

espero no haberte defraudado, y corresponderte con un trabajo a la altura de tanta generosidad recibida por tu parte.

Gracias a Virginia, Nuria y Abelardo, por su ayuda y amistad durante mi primera etapa en el CIPF. A Pilar y a los “*chicos de Pilar*”: Delia, Rubén, Inma, Maripaz y Laura. ¡Cuántos momentos divertidos pasamos! Creo que fue una de las épocas más bonitas de mi tesis. Nahuel, fue un placer trabajar codo con codo contigo. ¡Menudo personaje estás hecho! Compañero y amigo de faena y batallitas, espero que sigamos rellenando ese libro mental de aventuras y desventuras durante muchos años más.

¡Ahora empiezo con los gironís! ¡*Déu n’hi dó*, gracias por acogerme tan bien en este laboratorio! Espero poder devolveros el favor en algún momento. A las “*niñas*” Mireia, Helena, Anna (*Petita*), Monica, Mel·lina y Cris, por el ambiente que lograsteis crear en el lab...no sabéis lo difícil que es conseguir eso. A los “*niños*” Olallo, Txus y Bernat. ¡Qué buenos momentos pasamos con las torres de cerveza! ¡Espero que siga habiendo más! A Ferran, Alexandra, Irene, Anna (*Gran*), Anna (*Superpetita*) y Joan, por ayudarme en cualquier cosa que estuviera en vuestra mano. A los post-doc e investigadores *Seniors* Eli, Oscar, Catarina, Pedro, Sara, Guillermo, Fabi y Marcel, por compartir vuestra sabiduría conmigo. *Ha sigut una etapa molt important en la meva vida, un paer i gràcies a tots!*

A los colaboradores de este proyecto tan multicéntrico. A Marta Casado y Carme Cucarella del IBV, por el desarrollo del modelo animal. A María, del Hospital Clínic de Barcelona, por su ayuda en las ecocardiografías. A Cira y Montserrat Batlle por acogerme





---

en los laboratorios CELLEX y facilitarme mi estancia. Y por supuesto, gracias a Edu del IDIBAPS. Me has ayudado mucho en este proyecto. Me enseñaste electrofisiología, estadística, escritura de artículos... ¡No se puede pedir más de un colaborador! Eres un gran científico.

Gasterópoda, ha llegado el momento de agradecerte el gran pilar que has supuesto en mi vida estos últimos años. Te debo tanto... Gracias por haber estado ahí desde aquel día de los pintxos. No has flaqueado nunca en nuestro propósito, y eso quiere decir mucho de lo que hemos creado juntos. Me has dado motivos para seguir luchando por lo que quería, y espero que lo sepas. La tesis solo ha sido el camino, la excusa para alcanzar el objetivo final, que no es más que poder estar juntos de una vez. ¡Gracias por todo! ¡Lo hemos conseguido!

Finalmente quiero agradecer esta tesis a mi familia. Si he superado esta etapa ha sido, sin duda, gracias a vosotros. Me enseñasteis que las cosas se consiguen con esfuerzo y voluntad, y creo que gracias a eso he llegado a este momento. Siempre me apoyasteis, incluso cuando la distancia o mi trabajo no me permitían estar con vosotros. Espero que sepáis que siempre os tuve muy presentes. Somos una gran familia.

***A todos ellos, gracias.***

## ii. Abreviaturas

<b>Acc</b>	Aceleración miocárdica durante la contracción isovolumétrica (del inglés <i>myocardial Acceleration during isovolumic contraction</i> )
<b>AD</b>	Aurícula Derecha
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AI</b>	Aurícula Izquierda
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>cADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>Ct</b>	Ciclos de umbra de detección (del inglés <i>Cycle Threshold</i> )
<b>CX40</b>	Conexina 40
<b>CX43</b>	Conexina 43
<b>CX45</b>	Conexina 45
<b>DAI</b>	Desfibrilador Automático Implantable
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
<b>DES</b>	Desmina
<b>DSC2</b>	Desmocolina-2
<b>DSP</b>	Desmoplaquina
<b>ECG</b>	Electrocardiograma



---

<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGM</b>	Electrograma
<b>ET</b>	Tiempo de eyección (del inglés <i>Ejection Time</i> )
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino (del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>GAPDH</b>	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )
<b>GLUT</b>	Glutaraldehido
<b>His</b>	Haz de His
<b>IL-17</b>	Interleuquina-17
<b>IL-6</b>	Interleuquina-6
<b>IVS</b>	Grosor del Septo Interventricular (del inglés <i>Interventricular Septum</i> )
<b>JUP</b>	Placoglobina (gen)
<b>LMN</b>	Laminina A/C
<b>LTR</b>	Repeticiones largas terminales (del inglés <i>Long Terminal Repeats</i> )
<b>LVDd</b>	Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la diástole (del inglés <i>Left Ventricle end-diastolic Diameter</i> )
<b>LVDs</b>	Diámetro del ventrículo izquierdo al final de la sístole (del inglés <i>Left Ventricle end-systolic Diameter</i> )

<b>LVFS</b>	Fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (del inglés <i>Left Ventricle Fraction Shortening</i> )
<b>LVmass</b>	Masa del ventrículo izquierdo (del inglés <i>Left Ventricle mass</i> )
<b>MCA</b>	Miocardiopatía Arritmogénica
<b>MCAVD</b>	Miocardiopatía Arritmogénica de Ventrículo Derecho
<b>MCD</b>	Miocardiopatía Dilatada
<b>MCH</b>	Miocardiopatía Hipertrófica familiar
<b>MCR</b>	Miocardiopatía Restrictiva
<b>MET</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>MSC</b>	Muerte Súbita Cardíaca
<b>NA</b>	Nodo Atrial
<b>NAV</b>	Nodo Atrio-ventricular
<b>Na<sub>v</sub>1.5</b>	Subunidad $\alpha$ del canal de sodio cardíaco activado por voltaje
<b>N-CAD</b>	N-Cadherina
<b>p120cnt</b>	Catenina p120
<b>PA</b>	Potencial de Acción cardíaco
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate buffer saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polimerase Chain Reaction</i> )



---

<b>PFA</b>	Paraformaldehido
<b>PG</b>	Placoglobina o $\gamma$ -Catenina
<b>PKP2</b>	Placofilina-2
<b>PI</b>	Arteria Pulmonar
<b>PLN</b>	Fosfolamban
<b>PREV</b>	Periodo refractario efectivo del ventrículo
<b>PW</b>	Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (del inglés <i>left ventricle Posterior Wall Thickness</i> )
<b>RVAd</b>	Área del ventrículo derecho al final de la diástole en el eje parasternal largo (del inglés <i>Right Ventricle end-diastolic Area parasternal axis</i> )
<b>RVDd</b>	Diámetro del ventrículo derecho al final de la diástole en el eje parasternal largo (del inglés <i>Right Ventricle end-diastolic diameter parasternal axis</i> )
<b>RVOT</b>	Tracto de salida del ventrículo derecho (del inglés <i>Right Ventricle Outflow Tract</i> )
<b>SBr</b>	Síndrome de Brugada
<b>SCN5A</b>	Subunidad $\alpha$ del canal de sodio cardíaco activado por voltaje (gen)
<b>SIV</b>	Seto interventricular
<b>TCF4/LEF1</b>	Factor de transcripción 4/Factor de unión potenciador linfoide 1 (del inglés <i>Transcription</i>

	<i>factor 4/Lymphoid enhancer-binding factor 1)</i>
<b>TE</b>	Tampón Tris-EDTA
<b>TG-A</b>	Transgénico Alto
<b>TG-B</b>	Transgénico Bajo
<b>TGF<math>\beta</math>3</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$ -3 (del inglés <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>-3</i> )
<b>TG-M</b>	Transgénico Medio
<b>TMEM43</b>	Proteína transmembrana 43 (del inglés <i>Transmembrane protein 43</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor tumoral necrótico alfa (del inglés <i>Tumor Necrotic Factor-alpha</i> )
<b>TP</b>	Tiempo al pico (del inglés <i>Time to Peak</i> )
<b>TV</b>	Taquicardia Ventricular
<b>TVPC</b>	Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica
<b>V<sub>1-6</sub></b>	Derivaciones electrocardiográficas 1-6
<b>VD</b>	Ventrículo Derecho
<b>VI</b>	Ventrículo Izquierdo
<b>WT</b>	Silvestre o no transgénico (del inglés <i>Wild Type</i> )
<b><math>\alpha</math>E-CAT</b>	Catenina $\alpha$ E
<b><math>\alpha</math>-MHC</b>	Cadena pesada de la miosina $\alpha$ (del inglés <i><math>\alpha</math> Myosin Heavy Chain</i> )



---

<b><math>\alpha</math>T-CAT</b>	Catenina $\alpha$ T
<b><math>\beta</math>-CAT</b>	beta-Catenina

### iii. Nomenclatura

#### ***Genes y proteínas***

La nomenclatura de los acrónimos para genes y proteínas a lo largo del texto siguen las normas establecidas internacionalmente para cada especie (MGI: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>). En lo referente a la especie humana, los genes se expresan en mayúsculas y cursiva (p.ej. *PKP2*) mientras que las proteínas se expresan en mayúsculas y sin cursiva (p.ej. PKP2). En el caso del ratón, *Mus musculus*, los genes se nombran en cursiva, mayúsculas la primera letra y minúsculas el resto (p.ej. *Pkp2*). Para las proteínas se nombran en mayúsculas y sin cursiva (p.ej. PKP2).

#### ***Parámetros Ecocardiográficos***

Algunos de los parámetros ecocardiográficos, son internacionalmente conocidos por sus siglas en inglés. Con el fin de mejorar el entendimiento y establecer un criterio común a todos ellos, los parámetros serán nombrados con sus siglas en inglés (p.e. RVOT= *Right Ventricle Outflow Tract*).







#### **iv. Resumen**

La miocardiopatía arritmogénica (MCA) es una enfermedad cardíaca degenerativa caracterizada por el remplazo de tejido cardíaco por tejido fibro-adiposo, la progresiva dilatación y disfunción del ventrículo derecho y la aparición de arritmias. Aunque es considerada una enfermedad rara, la MCA es una importante causa de muerte súbita cardíaca (MSC) entre personas jóvenes (<35 años). Además, su incidencia es hasta 5 veces mayor entre atletas, lo que sugiere que el ejercicio intensivo es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la enfermedad.

La MCA es una patología familiar en, al menos, un 50% de los casos, lo que demuestra su carácter hereditario. De hecho, mutaciones en todos los genes desmosomales que se expresan en corazón han sido asociados a la patología, lo que ha hecho acuñar el nombre de “enfermedad del desmosoma”. Entre todos los genes desmosomales implicados en la MCA destaca Placofilina-2 (*PKP2*), en el cual se concentran casi el 50% de todas las mutaciones encontradas en los pacientes, lo que convierte a este gen en el más importante de la patología.

Gracias a los recientes avances desde el ámbito de la genética, se han podido desarrollar modelos celulares y animales para el estudio de la MCA. Ello ha permitido desvelar algunos de los mecanismos fisiopatológicos y moleculares causantes de la enfermedad. Por ejemplo, algunos modelos animales muestran defectos eléctricos antes de cualquier anomalía estructural, lo que sugiere la independencia de ambos defectos. Por otro lado,

se ha comprobado que la supresión de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -cat no canónica es esencial para la formación del tejido fibro-adiposo, lo que permitió incluir este proceso como potencial diana terapéutica de la patología. Sin embargo, a pesar de su papel clave en el desarrollo de la enfermedad, pocos modelos han sido desarrollados hasta el momento para el estudio de las mutaciones en *PKP2*.

Por tanto, el objetivo de esta tesis doctoral es estudiar en profundidad los efectos fisiopatológicos y moleculares generados por una proteína truncada de PKP2, la mutación más frecuente entre los pacientes. Para conocer el efecto de esta mutación, también se han estudiado factores que pueden ser potenciales desencadenantes de la enfermedad: i) el contenido de PKP2 truncada, ii) el ejercicio intensivo y iii) el envejecimiento.

Para cumplir dichos objetivos, se ha desarrollado un modelo celular y otro animal, portadores de una versión truncada de PKP2. En el caso del modelo animal, se han generado tres líneas transgénicas diferentes, con un contenido creciente de transgén (TG-B, TG-M y TG-A, respectivamente). Además, se ha desarrollado un grupo animal sometido a un protocolo de entrenamiento intensivo en cinta andadora, para conocer el efecto del ejercicio sobre la enfermedad. Finalmente, debido al carácter degenerativo de la MCA, se ha estudiado el efecto del envejecimiento en el modelo a diferentes edades.

Como resultado, se observó que ningún grupo animal sufría remplazo de tejido fibro-adiposo. Asimismo, el modelo celular



mostraba una actividad normal de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -cat no canónica, en consonancia con los resultados histológicos observados en el modelo animal. A pesar de la ausencia de un fenotipo histológico, a nivel ultra-estructural se encontraron múltiples roturas de los discos intercalares de los cardiomiocitos y una reducción del número de desmosomas en el grupo de mayor contenido de transgén (TG-A). Todo ello sugiere que un alto contenido de PKP2 truncada reduce la adhesión entre los cardiomiocitos y promueve la ruptura de sus uniones.

El estudio ecocardiográfico de los diferentes grupos reveló una progresiva dilatación del ventrículo derecho en relación al contenido de PKP2 truncada en cada línea animal. Además, la dilatación se exacerbaba en animales entrenados y por el envejecimiento de los animales. Curiosamente, solo el grupo TG-A mostró anomalías a nivel del ventrículo izquierdo. Por otro lado, el estudio molecular de proteínas de adhesión cardíacas mostró una reducción y remodelado de las proteínas PKP2 endógena (proteína completa), Placoglobina (PG), Desmocolina-2 (DSC2), Desmina (DES) y  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -CAT). Ello demuestra que la degradación de las proteínas de unión celular subyace a la reducción de la adhesión entre cardiomiocitos y a la dilatación del ventrículo.

El electrocardiograma (ECG) mostraba una conducción eléctrica más lenta, donde se observaba un intervalo PR y un complejo QRS prolongados. Este efecto era más pronunciado en las líneas transgénicas con mayor contenido de transgén. Sorprendentemente, estas anomalías no se agravaban por el

ejercicio intensivo o el envejecimiento, como sí ocurría para los defectos estructurales. Asimismo, las arritmias eran más frecuentemente inducidas en ratones de las líneas con mayor contenido de transgén, mientras que el ejercicio intensivo no afectaba a ello. Finalmente, el estudio molecular reveló un remodelado y reducción de los canales Conexina 43 (CX43) y subunidad  $\alpha$  del canal de sodio cardíaco ( $\text{Na}_v1.5$ ), lo que demuestra la asociación entre estas anomalías moleculares y los defectos eléctricos del modelo.

En conclusión, esta tesis doctoral demuestra que la presencia de tejido fibro-adiposo no es indispensable para el desarrollo de la MCA. Los defectos estructurales son dependientes del contenido de PKP2 truncada, el ejercicio y el envejecimiento, mientras que las anomalías eléctricas solo dependen del contenido de PKP2 truncada. Finalmente, se han descubierto algunos de los mecanismos moleculares que subyacen a los defectos estructurales y eléctricos. Su diferente etiología molecular demuestra que las anomalías estructurales y eléctricas representan entidades fisiopatológicas independientes en este modelo.



## Índice

<i>i. Agradecimientos</i> .....	7
<i>ii. Abreviaturas</i> .....	10
<i>iii. Nomenclatura</i> .....	15
<i>iv. Resumen</i> .....	17
<b>I. Introducción</b> .....	29
1. Muerte Súbita Cardíaca.....	31
2. Clínica de la Miocardiopatía Arritmogénica.....	35
2.1. Definición .....	35
2.2. Epidemiología .....	37
2.3. Sintomatología y fisiopatología.....	38
2.4. Criterios Diagnósticos .....	41
2.4.1. Estructura y función cardíaca.....	42
2.4.2. Conducción y función eléctrica del corazón.....	43
2.4.2. Historia Familiar.....	46
2.4.4. Caracterización del tejido.....	46
2.5. Tratamiento.....	47
3. La MCA como “enfermedad del desmosoma” .....	49
3.1. Herencia y características genéticas .....	51
4. El disco intercalar de los cardiomiocitos .....	54
4.1. Uniones Adherentes.....	56
4.2. Unión tipo GAP .....	58
5. El desmosoma en el tejido cardíaco.....	59
5.1. Cadherinas desmosomales .....	61
5.1.1. Desmogleína-2.....	62
5.1.2. Desmocolina-2.....	63
5.2. <i>Proteínas armadillo</i> .....	65



---

5.2.1. Placoglobina .....	65
5.2.2. Placofilina-2.....	66
5.2.3. Desmoplaquina.....	68
<b>6. El canal de sodio cardíaco .....</b>	<b>69</b>
6.1. Potencial de acción cardíaco y origen de las arritmias en la MCA .....	71
<b>7. Modelos para el estudio de los mecanismos implicados en la MCA.....</b>	<b>76</b>
7.1. Formación de tejido fibro-adiposo en la MCA.....	78
7.2. Proteínas desmosomales como elementos clave del acoplamiento eléctrico en el corazón.....	80
<b>II. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>84</b>
<b>III. Material y Métodos.....</b>	<b>93</b>
<b>8. Construcción y clonaje .....</b>	<b>95</b>
8.1. Diseño .....	95
8.2. Clonación.....	98
<b>9. Modelo celular .....</b>	<b>101</b>
9.1. Células y mantenimiento <i>in vitro</i> .....	101
9.2. Producción de vectores virales y transducción.....	102
9.3. Ensayo <i>Renilla/Luciferasa</i> .....	104
<b>10. Modelo animal .....</b>	<b>106</b>
10.1. Cepa y estabulación .....	106
10.2. Transgénesis de embriones.....	107
10.3. Mantenimiento y genotipado de las líneas transgénicas.....	108
10.4. Obtención de animales doble heterocigotos.....	110
<b>11. Protocolos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>112</b>

11.1.	Entrenamiento en cinta andadora.....	112
11.2.	Estudios ecocardiográficos y electrofisiológicos ...	115
11.2.1.	Ecocardiografía.....	115
11.2.2.	Electrocardiografía.....	118
11.2.3.	Estudios electrofisiológicos.....	118
<b>12.</b>	<b>Histología.....</b>	<b>122</b>
12.1.	Tinciones histoquímicas .....	122
12.1.1.	Parafina.....	122
12.1.2.	Criostato.....	123
12.2.	Inmunofluorescencia .....	124
12.2.1.	De tejido.....	124
12.2.2.	Fluorescencia en células.....	126
12.3.	Microscopía electrónica de transmisión.....	126
<b>13.</b>	<b>Técnicas Moleculares .....</b>	<b>127</b>
13.1.	qPCR a tiempo real.....	128
13.1.1.	Expresión de transcritos.....	128
13.1.2.	Identificación de animales homocigotos.....	130
13.2.	<i>Western blot</i> .....	132
13.2.1.	De células.....	132
13.2.2.	De tejido.....	134
13.3.	Semi-cuantificación de las bandas .....	135
13.4.	Separación de las fracciones proteicas cardíacas	136
<b>14.</b>	<b>Análisis estadísticos.....</b>	<b>137</b>
<b>IV.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>141</b>
<b>16.</b>	<b>Comprobación del modelo celular y animal.....</b>	<b>143</b>
16.1.	Expresión y detección de PKP2 truncada en el modelo celular .....	143
16.2.	Identificación de animales transgénicos .....	144





16.3.	Cuantificación del transcrito .....	146
16.4.	Detección de la proteína transgénica .....	148
16.5.	Localización de la proteína .....	149
16.6.	Comprobación del modelo doble transgénico .....	151
<b>17.</b>	<b>Anatomía e histología del corazón.....</b>	<b>155</b>
17.1.	Animales sedentarios.....	155
17.2.	Efecto del entrenamiento .....	157
17.3.	Análisis ultra-estructural del tejido cardíaco .....	161
<b>18.</b>	<b>Distribución de PKP2 truncada vs endógena.....</b>	<b>165</b>
<b>19.</b>	<b>Estudio de la activación de la vía Wnt/<math>\beta</math>-cat .....</b>	<b>168</b>
<b>20.</b>	<b>Cambios estructurales y funcionales en animales transgénicos .....</b>	<b>169</b>
20.1.	Cambios en el ventrículo derecho.....	170
20.2.	Cambios en el ventrículo izquierdo .....	175
<b>21.</b>	<b>Evaluación de proteínas de adhesión celular .....</b>	<b>179</b>
21.1.	Localización .....	179
21.2.	Contenido .....	182
<b>22.</b>	<b>Anomalías electrofisiológicas del corazón .....</b>	<b>184</b>
22.1.	Electrocardiograma.....	184
22.2.	Electrofisiología e Inducibilidad de Arritmias .....	190
<b>23.</b>	<b>Alteración de proteínas implicadas en el PA cardíaco: CX43 y canal Na<sub>v</sub>1.5 .....</b>	<b>194</b>
23.1.	Localización .....	195
23.2.	Contenido .....	197
<b>V. Discusión.....</b>	<b>.....</b>	<b>201</b>
<b>25.</b>	<b>Principales resultados .....</b>	<b>204</b>
<b>26.</b>	<b>Ausencia de tejido fibro-adiposo en el modelo .....</b>	<b>211</b>
26.1.	Expresividad variable del fenotipo.....	211

26.2. Efectos en la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -cat .....	213
26.2.1. Tejido fibro-adiposo y PKP2 nuclear: ¿están ambos procesos conectados?.....	213
26.2.2. El ratio PG/ $\beta$ -CAT en la formación de grasa...	216
26.3. La infección como mecanismo desencadenante ..	217
<b>27.</b> Fenotipo ultra-estructural .....	219
<b>28.</b> Defectos estructurales y funcionales del corazón en la MCA .....	220
28.1. Las mutaciones desmosomales y el remplazo fibro- adiposo en la dilatación cardíaca .....	221
28.2. El desgaste cardíaco desencadena las anomalías estructurales en la MCA.....	223
28.3. Las proteínas de adhesión como causa de los defectos estructurales.....	225
<b>29.</b> Anomalías eléctricas en el modelo de PKP2 truncada .....	228
29.1. Implicación de PKP2 truncada en la actividad eléctrica del corazón .....	229
29.2. Defectos eléctricos derivados del envejecimiento y el ejercicio .....	231
29.3. PKP2 es esencial en la estabilidad de los canales iónicos .....	233
<b>30.</b> Interpretación clínica de los resultados .....	235
30.1. Concepto de “Miocardiopatía Arritmogénica” asociada a la MCA y la MCD .....	236
30.2. Relación entre MCA y SBr: Implicación del canal Na <sub>v</sub> 1.5.....	237
<b>31.</b> Repercusión del estudio y perspectivas .....	239



---

<b>VI. Conclusiones</b> .....	245
<b>VII. Referencias Bibliográficas</b> .....	251
<b>VIII. Apéndices</b> .....	293
<b>32.</b> Diseño de PKP2 truncada y alineamiento .....	295
<b>33.</b> Protocolos de tinciones histológicas.....	296
<b>34.</b> Desenmascaramiento de epítomos.....	300
<b>35.</b> Anticuerpos.....	301
<b>36.</b> Soluciones para Western blot .....	302
<b>37.</b> Cuantificación de proteínas.....	304



# **I. Introducción**

---





## **1. Muerte Súbita Cardíaca**

La muerte súbita cardíaca (MSC) está definida como una muerte natural de manera inesperada en personas con o sin enfermedad cardíaca pre-existente, que acontece tras una abrupta pérdida de consciencia, y antes de 1 hora tras la aparición de los síntomas[1]. Este tipo de muertes suelen deberse a la aparición de un cambio repentino en el ritmo del corazón (arritmia), la presencia de taquicardias ventriculares o la fibrilación ventricular[2]. En un 50-70% de los casos, primero aparecen las taquicardias ventriculares, las cuales evolucionan hasta desencadenar la fibrilación ventricular que, finalmente, colapsa el corazón y provoca la parada cardíaca[3, 4]. Aunque el resultado de la MSC es el punto en común entre los pacientes, esta es consecuencia de muy diversas patologías cardíacas, con etiologías muy diferentes entre ellas[5].

Los estudios epidemiológicos sobre la incidencia de la MSC muestran valores sesgados, variando entre 0,36 a 1,28 casos por cada 1.000 habitantes y año[6]. Y es que la incidencia de la MSC depende en gran medida del tipo de población donde se realice la estimación. La edad, el sexo o la raza son determinantes muy importantes ante la MSC[7]. Por ejemplo, se ha observado que en hombres de entre 60-69 años con patología cardiovascular previa, la incidencia de MSC se dispara hasta 8 por cada 1.000 habitantes y año[8]. Además, también se cree que la incidencia esta subestimada, debido a que la mayoría de los estudios descartan los casos acontecidos fuera del hospital[9].

En los países del primer mundo, las enfermedades coronarias son la mayor causa de mortalidad. Por tanto, no es de extrañar que entre un 60 a un 80% de los casos de MSC son debidos a las patologías coronarias, normalmente relacionadas con proceso isquémico de origen aterosclerótico[10]. Por otro lado, solo entre el 5 al 10% de los casos la MSC ocurre en ausencia de patología coronaria o insuficiencia cardíaca[8]. Estas muertes se deben a enfermedades valvulares congénitas, miocardiopatías no isquémicas o infiltraciones[3].

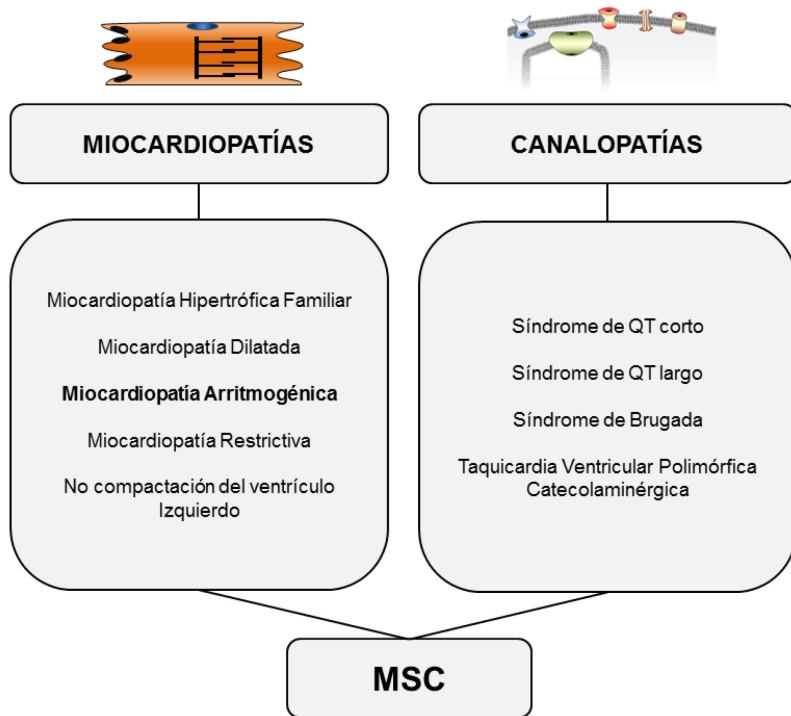
Curiosamente, aunque la patología isquémica es la causa más común de MSC en la población general, las enfermedades cardiovasculares hereditarias representan la mayor causa de MSC entre niños y jóvenes adultos (<35 años). En estos grupos de población, la incidencia en la literatura varía entre 0,8 y 2,8/100.000 personas y año[11]. Además, existe un especial riesgo de padecer MSC entre jóvenes atletas, donde la incidencia puede alcanzar las 3,6 muertes por cada 100.000 personas y año[12].

Los trastornos cardíacos de origen hereditario causantes de MSC son un conjunto de síndromes y patologías con etiologías muy diversas y diferentes manifestaciones. Este grupo de enfermedades pueden clasificarse en dos tipos: canalopatías y trastornos estructurales o miocardiopatías (Figura 1). Dicha clasificación radica en la característica morfológica e histológica del corazón. Las canalopatías no presentan cambios estructurales del corazón, manteniendo una anatomía e histomorfología normal. Por otro lado, los trastornos estructurales





desarrollan cambios evidentes en la morfología y funcionalidad cardíaca. Dentro de este grupo, cada patología muestra un cambio morfológico diferente. Desde dilataciones de los ventrículos, hasta engrosamiento de sus paredes, fibrosis, cardiomegalia (tamaño anormalmente alto de los cardiomiocitos) o remplazo del tejido cardíaco por tejido fibro-adiposo[13].



**Figura 1. Clasificación de las enfermedades cardíacas hereditarias causantes de MSC.** Para las miocardiopatías destacan las mutaciones en genes desmosomales y sarcoméricos. Para las canalopatías, las mutaciones se asocian a canales iónicos.

Dentro de las canalopatías se han descrito 4 síndromes asociados a muerte súbita: síndrome de QT largo, síndrome de QT corto, síndrome de Brugada (SBr) y taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC)[14] (Figura 1). Son

patologías sin cambios estructurales pero que presentan anomalías de carácter eléctrico que provocan, en última instancia, arritmias y la MSC. El substrato genético de estos trastornos radica en mutaciones para diferentes canales iónicos presentes en la membrana plasmática de los cardiomiocitos. No obstante, recientemente también se han encontrado mutaciones en genes que forman parte de proteínas auxiliares de dichos canales[15].

Por otra parte, dentro de los trastornos estructurales destacan 5 enfermedades causantes de MSC: miocardiopatía hipertrófica familiar (MCH), miocardiopatía dilatada (MCD), miocardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho (MCAVD o simplemente MCA), miocardiopatía restrictiva (MCR) y no compactación del ventrículo izquierdo (Figura 1). En este último caso, existe una cierta controversia sobre su consideración como miocardiopatía hereditaria[13].

Como en el caso de las canalopatías, se han descrito mutaciones en genes relacionadas con las distintas enfermedades estructurales. En este sentido, parece que estos genes se asocian a funciones muy concretas de la estructura y la mecánica del cardiomiocito. Por ejemplo, ha sido bien establecida la asociación entre mutaciones de proteínas desmosomales con la MCA[16], mientras que mutaciones en proteínas sarcoméricas están más ligadas a la MCH[17]. Sin embargo, otras enfermedades presentan una mayor heterogeneidad en los genes a los que se asocian, como es el caso de la MCD[18]. Además, existe un solapamiento de genes



causales entre las distintas enfermedades, lo que sugiere una íntima relación entre todas ellas[19].

Debido a la ausencia, en muchos casos, de síntomas en estas enfermedades hereditarias, la MSC puede acontecer como primer síntoma. Por ello, en este momento todos los esfuerzos se centran en la identificación de personas en riesgo, así como en la prevención de la MSC[20]. En este sentido, un correcto diagnóstico de dichas enfermedades se presenta como factor clave en el proceso. Por tanto, una investigación exhaustiva sobre la etiología y las características fisiopatológicas de cada una de las enfermedades permitirá un mejor diagnóstico en el futuro. Todo ello repercutirá en los pacientes de manera directa, mediante una mejor prevención de la MSC.

Con ese objetivo, esta tesis doctoral trata de profundizar en las bases fisiopatológicas y moleculares de una enfermedad causante de MSC, la miocardiopatía hereditaria Miocardiopatía Arritmogénica de Ventrículo Derecho o MCA. Por ende, los siguientes apartados introductorios tratarán los principales aspectos de esta enfermedad, desde sus características clínicas, hasta los mecanismos moleculares que subyacen a la patología.

## ***2. Clínica de la Miocardiopatía Arritmogénica***

### **2.1. Definición**

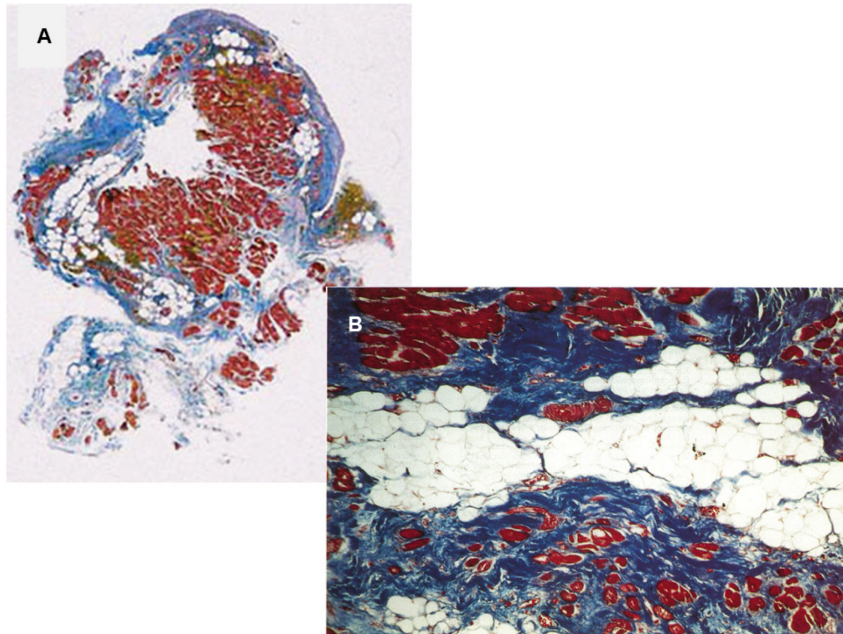
La Miocardiopatía Arritmogénica de Ventrículo Derecho o, simplemente, Miocardiopatía Arritmogénica (MCA) es una enfermedad que afecta al miocardio y que se caracteriza por el

reemplazo de tejido fibro-adiposo, dilatación ventricular y la aparición de arritmias[21]. La primera descripción histórica sobre la enfermedad la realizó Giovanni Maria Lancisi en 1736[22, 23], donde se detectó una alta incidencia de aneurismas de ventrículo derecho (VD), palpitaciones y muerte súbita en una misma familia durante 4 generaciones. Sin embargo, hubo que esperar hasta la primera mitad de los años 80 para tener una descripción clínica de la patología de manera más exhaustiva[24, 25]. Estos estudios reportaron las primeras evidencias de taquicardias ventriculares y un patrón diferencial en el electrocardiograma (ECG). Desde entonces se ha producido un gran avance en el estudio de la MCA, donde se han podido definir con mayor exactitud los síntomas y la fisiopatología característicos de la enfermedad[26, 27].

Como elemento más característico y definitorio de la enfermedad se encuentra el reemplazo de tejido fibro-adiposo (Figura 2). Se trata de una progresiva sustitución del tejido cardíaco por un tejido cicatrizante, compuesto por adipocitos y por células fibroblásticas, las cuales secretan una matriz extracelular fibrosa. De manera general, el reemplazo de tejido fibro-adiposo aparece inicialmente en el VD, al cual se asocia una dilatación del mismo. Además, este reemplazo puede desarrollarse, de manera secundaria, en la pared libre del ventrículo izquierdo (VI), donde puede llegar a ocupar >50% de su grosor[28, 29]. Asimismo, asociado o no a este problema estructural, aparecen arritmias ventriculares, síncope (desvanecimientos) o palpitaciones y MSC, la cual puede acontecer como primera manifestación clínica de la



enfermedad[21]. Se trata de una enfermedad particularmente frecuente en jóvenes (<35 años) y atletas[21, 30]. Por todas estas características, la MCA es considerada una de las enfermedades asociada a muerte súbita cardíaca (MSC).



**Figura 2. Reemplazo de tejido fibro-adiposo en corazón de pacientes con MCA. A)** Biopsia endocárdica del septo interventricular (modificado de Thiene *et al.*, 2007[21]). **B)** Microfotografía mostrando islas de tejido miocárdico (rojo) rodeado de tejido fibroso (azul) y con grandes zonas ocupadas por adipocitos (blanco) (obtenido de McKenna *et al.*, 1994[31]).

## 2.2. Epidemiología

La prevalencia de la MCA es muy diferente en función de la población de estudio, variando entre 1:1.000 a 1:5.000[21]. Esta variabilidad es debida, fundamentalmente, a la gran diversidad en las manifestaciones clínicas, así como a la influencia del fondo genético en la expresión fenotípica de la enfermedad.

Todo ello dificulta su diagnóstico, y permite que existan muchos casos no diagnosticados, lo que hace pensar que su prevalencia esté subestimada[21, 32]. Aunque es considerada por su baja prevalencia como una enfermedad rara, hay que destacar su alto porcentaje dentro de las MSC. La MCA puede representar entre un 7-23% del total de MSC, dependiendo de la población en estudio[21].

Es una enfermedad familiar en, al menos, un 50% de los casos, lo que sugiere la influencia de la genética en la enfermedad[33]. La penetrancia es mayor en hombres que en mujeres (entre 1,6:1 a 3:1)[34, 35], aunque ello no parece alterar la supervivencia a largo plazo[34]. Por otro lado, se ha observado que el riesgo de MSC en jóvenes atletas aumenta hasta 5 veces respecto a la población general[30]. Por ello, el ejercicio es considerado el mayor factor de riesgo de la enfermedad. Se cree que la sobrecarga del corazón y el estiramiento de las paredes del ventrículo durante el ejercicio aceleran la aparición de los síntomas y la probabilidad de MSC[21, 36].

### **2.3. Sintomatología y fisiopatología**

Existe una gran variabilidad en la aparición y tipos de síntomas entre los pacientes. De manera más frecuente, las primeras manifestaciones pueden ir desde la aparición de palpitaciones (67% de los casos), síncope (32%) o dolor torácico atípico (26%). Así pues, de manera menos frecuente pueden aparecer taquicardias ventriculares, arritmias, o incluso la MSC como primer síntoma. No obstante, la enfermedad puede también cursar asintomática, el cual puede representar hasta el 6% de



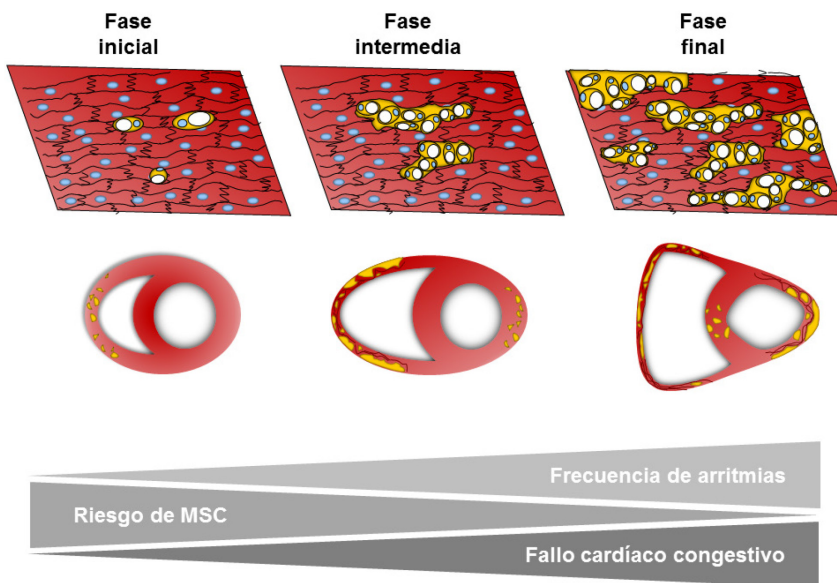
los casos[37]. En general, la penetrancia es dependiente de la edad, aunque la expresión del fenotipo difiere en cada caso[16, 31].

Desde un aspecto fisiopatológico, en fases iniciales de la enfermedad se observan pequeños acúmulos de tejido fibro-adiposo (Figura 3), aún indetectables desde un punto de vista clínico. Dicho remplazo comienza en las paredes libres de los ventrículos, extendiéndose desde el pericardio hacia el endocardio durante la progresión de la enfermedad. Asociado a ello se observa cardiomegalia, infiltrados inflamatorios y eventos arritmogénicos[32]. Hay que destacar que algunos autores denominan a este periodo inicial de la enfermedad como “fase oculta”, debido a la ausencia de síntomas que pudieran revelar la patología[21, 38].

El remplazo aparece, inicialmente, en la pared libre del VD (Figura 3). Concretamente, el área comprendida entre el tracto de salida, el ápice y el tracto de entrada (área subtricúspide) suele ser la zona del VD más afectada, lo que se ha denominado como “el triángulo de displasia”[21, 39]. Aunque esta zona sea inicialmente la más afectada, el remplazo de tejido fibro-adiposo se extiende rápidamente a la pared libre del VI (Figura 3). Por tanto, la enfermedad suele presentarse de manera biventricular, con una incidencia que puede alcanzar hasta un 70% de los casos[40].

Acompañado a este remplazo de tejido fibro-adiposo suelen aparecer arritmias, cada vez más frecuentes, y en consonancia al progresivo remplazo del tejido cardíaco (Figura 3). Sin

embargo, durante la fase oculta, las arritmias suelen ser más inestables, lo que hace a los pacientes más susceptibles de sufrir MSC, la cual puede acontecer como primer síntoma[38]. En fases más avanzadas, sin embargo, la recurrencia de las arritmias es mayor, aunque también son más estables, probablemente debido a una fase más estacionaria de la enfermedad[26] (Figura 3).



**Figura 3. Evolución de la MCA en pacientes.** Representación de la progresión de la enfermedad en el tejido cardíaco (arriba) y la degeneración de los ventrículos y el septo interventricular (medio). La frecuencia de arritmias, el riesgo de MSC y probabilidad de fallo cardíaco congestivo se muestran abajo.

Junto a estos cambios electrofisiológicos e histológicos ocurre una progresiva degeneración estructural del corazón, caracterizada por un estrechamiento de las paredes libres de los ventrículos, dilatación y aneurismas de los mismos. Todo ello conlleva una disfunción cardíaca, debido una reducción en la





contracción cardíaca y una menor fracción de eyección[37] (Figura 3). En fases finales de la enfermedad, ambos ventrículos presentan amplias zonas afectadas, incluyendo el septo interventricular (SIV), el cual es la última zona en verse afectada[31]. Por último, derivado de este compromiso estructural del corazón, ocurre la muerte por fallo cardíaco congestivo, ante el cual, el único tratamiento posible es el trasplante cardíaco (Figura 3).

La patología fue definida inicialmente como Distrofia Arritmogénica de Ventrículo Derecho, atendiendo a un desarrollo embrionario defectuoso del mismo. Sin embargo, posteriores estudios revelaron que este no se encuentra defectuoso en el momento del nacimiento[41]. Por tanto, el término fue sustituido por Miocardiopatía Arritmogénica de Ventrículo Derecho. No obstante, como se ha descrito anteriormente, la afectación del ventrículo izquierdo es generalizada. De tal forma, actualmente se sugiere el uso del término Miocardiopatía Arritmogénica (MCA), el cual es más acorde a la fisiopatología de la enfermedad, aunque el término original sigue en uso[23]. Debido a una aproximación más cercana a la realidad, se utilizará el término Miocardiopatía Arritmogénica (MCA) para esta tesis doctoral.

#### **2.4. Criterios Diagnósticos**

El diagnóstico de la enfermedad es a menudo difícil, debido fundamentalmente a la variabilidad de síntomas entre los pacientes. Además, mientras en algunos casos el primer síntoma es la MSC, en otros los síntomas no aparecen hasta

estadios muy avanzados de la enfermedad[37]. Por tanto, en ocasiones el diagnóstico no se realiza correctamente o no se puede obtener de manera precoz, lo cual permitiría tratar la enfermedad de una manera más eficaz.

Los métodos diagnósticos más importantes hacen referencia a la estructura y función del ventrículo, las propiedades eléctricas del corazón, la genética familiar o las características del tejido. En este sentido, en 1994 se establecieron una serie de criterios diagnósticos de la enfermedad, atendiendo a tales características[31]. Posteriormente, dichos criterios fueron revisados y mejorados[42]. Los criterios se definen como mayores o menores en función de su importancia, requiriéndose dos criterios mayores, uno mayor y dos menores o cuatro menores para establecer el diagnóstico (Tabla 1). En los siguientes apartados se desglosan los principales criterios.

#### 2.4.1. Estructura y función cardíaca

Una de las herramientas más habituales son las técnicas de imagen, las cuales representan el *gold standard* en el diagnóstico de la enfermedad[21]. Estas son la ecocardiografía y la resonancia magnética nuclear. En los pacientes de MCA son frecuentes las dilataciones leves o severas del VD y la aparición de aneurismas. Además, se observa la reducción de la fracción de eyección, provocada por un menor movimiento de ventrículo (hipoquinesia), un movimiento anómalo (disquinesia) o la ausencia del mismo (aquinesia)[42]. Todos ellos forman parte de los criterios diagnósticos de la enfermedad (Tabla 1).



Como parámetro a destacar se encuentra la medida del tracto de salida del ventrículo derecho (o RVOT del inglés *right ventricle outflow tract*). Dicho parámetro define la dilatación en esta zona concreta del ventrículo[43] y, en función de su diámetro, es considerado criterio mayor o menor (Tabla 1).

#### 2.4.1. *Conducción y función eléctrica del corazón*

Debido a su carácter arritmogénico, el electrocardiograma (ECG) supone una importante herramienta en el diagnóstico de la MCA. De hecho, se sabe que alrededor de un 90% de los pacientes presentan un patrón anormal en el ECG[32].

Durante un latido cardíaco ocurren diferentes eventos que se representan como ondas en el ECG. En la Figura 4 se muestra un ejemplo del ECG y en la Figura 5 una representación de lo acontecido en el corazón durante un latido. Inicialmente, las células del nodo sinusal provocan una despolarización que se extiende rápidamente por ambas aurículas (Figura 5). Esta corriente despolarizante es recogida por el ECG como una onda, denominada P (Figura 4). Luego se produce un periodo silente para el registro del ECG, en el cual la onda despolarizante circula desde el nodo auriculo-ventricular hacia el haz de His y las ramas derecha e izquierda (Figura 5). Este periodo, junto a la onda P auricular, definen el intervalo PR (Figura 4). Tras el paso por el sistema de conducción, los ventrículos se despolarizan, produciendo las ondas Q, R y S; periodo denominado complejo QRS (Figuras 4 y 5). Finalmente aparece la onda T (Figura 4), que correspondiente a la repolarización del ventrículo (Figura 5).

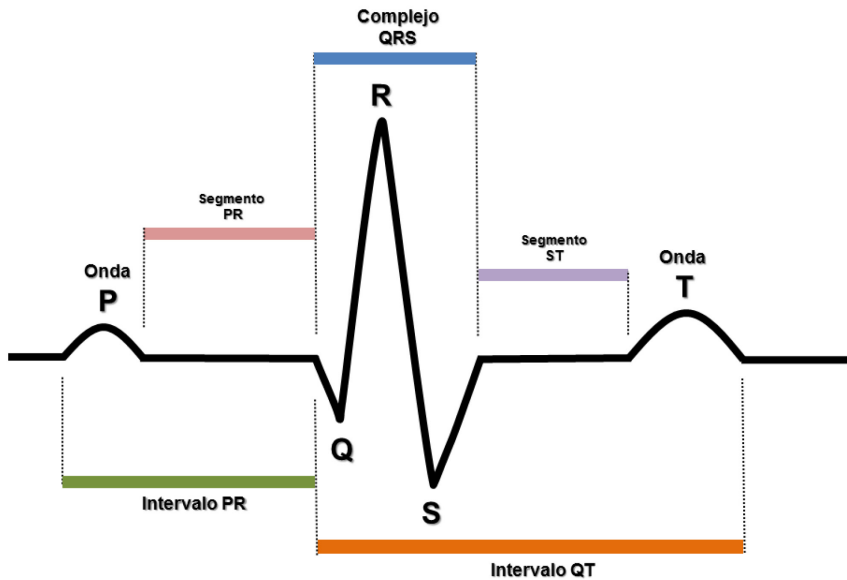


Figura 4. Descripción de los elementos que componen un electrocardiograma.

Algunas anomalías más frecuentes entre los pacientes pasan por una prolongación de diferentes ondas. La prolongación de la onda S >55ms acontece en un 90-95% de los casos. Además, la prolongación del complejo QRS >110ms aparece en un 24-70% de los casos. Por otro lado, se observa una inversión de la onda T, debido a anomalías en la repolarización, presentes en la mitad de los pacientes[32] (Tabla 1).

Por último, también se registran arritmias y taquicardias ventriculares, que reflejan las anomalías eléctricas de los pacientes (Tabla 1).

Grupo	Criterio Mayor	Criterio Menor
<b>I. Estructura o función anormal del VD*</b>	Aneurisma, aquinesia o disquinesia regional del VD y: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RVOT (eje corto) <math>\geq 32\text{mm}</math> o</li> <li>• Cambio de área fraccional <math>\leq 33\%</math></li> </ul>	Aquinesia o disquinesia regional del VD y: <ul style="list-style-type: none"> <li>• RVOT (eje corto) <math>\geq 29</math> a <math>&lt; 32\text{mm}</math> o</li> <li>• Cambio del área fraccional <math>&gt; 33\%</math> a <math>\leq 40\%</math></li> </ul>
<b>II. Caracterización del tejido</b>	$< 60\%$ de miocitos residuales con remplazo fibroso de la pared libre del VD en $\geq 1$ muestra, con o sin remplazo graso en la biopsia endomiocárdica	$60\%$ al $75\%$ de miocitos residuales con remplazo fibroso de la pared libre del VD en $\geq 1$ muestra, con o sin remplazo graso en la biopsia endomiocárdica
<b>III. ECG Despolarización/Conducción anormal</b>	Ondas Épsilon en las derivaciones derechas ( $V_1$ - $V_3$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potenciales tardíos (en el promedio del ECG)</li> <li>• Duración del QRS <math>\geq 114\text{ms}</math></li> <li>• Final de la activación del QRS <math>\geq 55\text{ms}</math></li> </ul>
<b>IV. ECG Repolarización</b>	Ondas T invertidas en derivaciones $V_1$ - $V_3$ en pacientes $> 14$ años (sin bloqueo de la rama derecha)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onda T invertida en der <math>V_1</math> y <math>V_3</math> en pacientes <math>&gt; 14</math> años (sin bloqueo de la rama derecha) o en <math>V_4</math> y <math>V_5</math> o <math>V_6</math></li> <li>• Onda T invertida en der <math>V_1</math>, <math>V_2</math>, <math>V_3</math> y <math>V_4</math> en pacientes <math>&gt; 14</math> años con bloqueo de la rama derecha</li> </ul>
<b>V. Arritmias</b>	Taquicardia ventricular por bloqueo de la rama izquierda (sostenida o no)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taquicardia ventricular del VD (sostenida o no)</li> <li>• <math>&gt; 500</math> extrasístoles ventriculares en 24h</li> </ul>
<b>VI. Historia Familiar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pariente de primer grado MCA confirmado por cirugía o autopsia (o por cumplir los criterios diagnósticos)</li> <li>• Mutación patogénica asociada a MCA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pariente de primer grado con MCA sin confirmar</li> <li>• Familiar con muerte súbita prematura (<math>&lt; 35</math> años) bajo sospecha de MCA</li> <li>• Pariente de segundo grado con MCA confirmado</li> </ul>

**Tabla 1. Criterios diagnósticos para la MCA.** El diagnóstico se confirma cumpliendo dos criterios mayores, 1 mayor y dos menores o cuatro menores. Resumido de McKenna *et al.*, 1994 y Marcus *et al.*, 2010[40, 42]. \*: Medidas basadas en ecocardiografía.

### *2.4.2. Historia Familiar*

El alto componente hereditario de la MCA, con una afectación familiar de hasta un 50%, hace de la historia familiar un factor clave[33, 36]. El diagnóstico previo de un familiar de primer grado de parentesco (padres, hermanos e hijos) es un criterio mayor, mientras que si se trata de un familiar de segundo grado (abuelos, tíos, sobrinos y nietos) o de primer grado con dudoso diagnóstico, se trata de un criterio menor (Tabla 1).

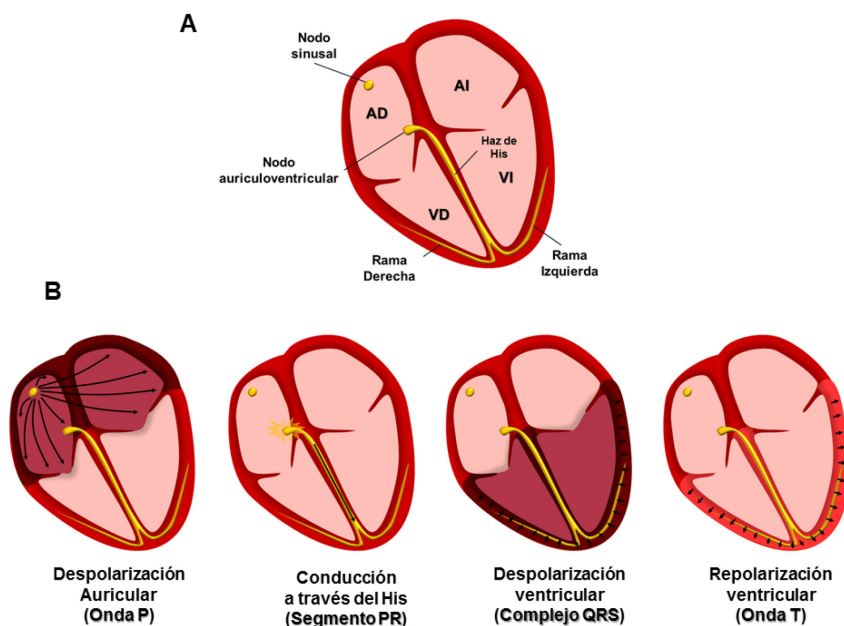
Recientemente se han descrito mutaciones asociadas a pacientes de MCA. Por tanto, en la última revisión realizada sobre los criterios diagnósticos se ha incluido, como criterio mayor, la presencia de dichas mutaciones (Tabla 1)[42].

### *2.4.3. Caracterización del tejido*

La infiltración fibro-adiposa en el corazón es el síntoma más definitorio y característico de la MCA. Por ello, es un criterio fundamental para su diagnóstico (Tabla 1). Sin embargo, la imposibilidad de obtener tejido cardíaco de los pacientes hace de este método diagnóstico poco viable. Dicho esto, en algunos casos se pueden obtener biopsias cardíacas mediante catéter intracavitario (Figura 2). Aunque la presencia de tejido fibro-adiposo es un factor decisivo en el diagnóstico, la ausencia del mismo en la biopsia no puede descartar la enfermedad. Por un lado, la muestra obtenida es sesgada y poco representativa del estado general del corazón, sobre todo conociendo la heterogeneidad en la localización y cantidad de tejido fibro-adiposo para cada paciente. Por otro, la muestra extraída suele



proceder del septo interventricular (SIV), área menos propensa a la presencia de infiltrados[31]. Por este motivo, en algunos casos el diagnóstico definitivo se realiza post-mortem, mediante un examen histológico del corazón de manera más amplia.



**Figura 5. Procesos eléctricos acontecidos durante un latido cardíaco. A)** Sistema de conducción eléctrica del corazón. AD: aurícula derecha; VD: ventrículo derecho; AI: aurícula izquierda; VI: ventrículo izquierdo. **B)** Ciclo y dirección de despolarización durante un latido cardíaco. Observese que cada fase corresponde a un elemento del ECG (Figura 4).

## 2.5. Tratamiento

Una vez diagnosticado un paciente, no existen tratamientos específicos para impedir la degeneración cardíaca y la progresión de la enfermedad. Para atenuar las arritmias, los enfermos suelen ser tratados con drogas anti-arrítmicas generales, tales como  $\beta$ -bloqueantes, sorbatol, bloqueantes de

sodio, amiodarone o verapamil[21]. Estos fármacos son comúnmente utilizados en pacientes que padecen arritmias, independientemente del origen de las mismas. Los anti-arrítmicos son capaces de suprimir o, al menos reducir, la aparición de arritmias en estos pacientes, llegando a alcanzar una eficiencia del 68% en los enfermos[44]. A pesar de ello, la progresiva degeneración cardíaca acarrea una mayor frecuencia en la aparición de arritmias, situación en la cual la administración de fármacos anti-arrítmicos es insuficiente[45].

Otra de las terapias más utilizadas en los pacientes es la ablación celular. Este método suele utilizarse en combinación al tratamiento con anti-arrítmicos. La ablación consiste en la eliminación, mediante un catéter, de zonas concretas del miocardio, las cuales son el origen de las arritmias[46]. La ablación permite eliminar el tejido alterado, reduciendo así la aparición de las arritmias. Este procedimiento reduce hasta en un 40% la recurrencia de arritmias en un periodo de 3 años, aumentando así la supervivencia de los pacientes sometidos a la intervención[45]. Aunque la terapia es efectiva a corto plazo, la progresión de la enfermedad provoca de nuevo la aparición de los síntomas, lo cual indica la naturaleza paliativa del procedimiento[21].

Puesto que en muchos casos el tratamiento con fármacos o la ablación celular no son eficaces, también se suelen utilizar los desfibriladores automáticos implantables o DAI. El DAI suele colocarse a enfermos con alto riesgo de MSC de manera preventiva. Este método resulta efectivo, aumentando





significativamente la supervivencia de los pacientes. Por ejemplo, Corrado *et al.*, describieron en 2008 que la implantación de un DAI suponía la supresión de fibrilaciones ventriculares en un 76% de los pacientes[47].

Por último, el tratamiento definitivo es el trasplante cardíaco. En algunos casos, los pacientes en una fase muy avanzada de la enfermedad sufren un fallo cardíaco congestivo, que hace del trasplante la única terapia efectiva[21, 32].

### **3. La MCA como “enfermedad del desmosoma”**

Durante mucho tiempo se ha ignorado cual era la causa de la MCA. Sin embargo, la alta incidencia de la enfermedad en miembros de una misma familia hacía pensar en un componente genético determinante para su desarrollo. De hecho, en 1994 fue descrito por primera vez un locus cromosómico (14q23-q24) asociado a una familia italiana con un alto índice de enfermos[48]. Posteriormente, fue reportada la primera evidencia de que defectos en las proteínas desmosomales eran el origen de la MCA. Ello fue descrito en pacientes del síndrome de Naxos[49]. Este síndrome fue descubierto inicialmente en familias originarias de la isla griega de Naxos y se caracteriza por la presencia de pelo lanudo, queratodermia palmo-plantar y desarrollo de MCA[50]. En estos enfermos fue encontrada una mutación homocigota en el gen desmosomal placoglobina o *JUP* (PG2157delTG). La mutación generaba un cambio en el marco de lectura, lo que provocaba un truncamiento de la proteína placoglobina[49].

Por otro lado, los enfermos del síndrome de Carvajal, enfermedad descrita en varias familias de Ecuador e India, presentan una tipología similar a los enfermos del síndrome de Naxos[51]. En este sentido, el estudio genético de los pacientes reveló una mutación homocigota en el gen desmosomal desmoplaquina o *DSP* (*DSP7901delG*) que causaba el truncamiento de la proteína[52].

Desde entonces se ha producido un gran avance en la genética de la MCA, donde se han identificado gran número de mutaciones en diferentes genes, asociadas a los pacientes[53, 54]. De entre todos estos genes, destacan las mutaciones en todas las proteínas desmosomales cardíacas, lo cual confirma la íntima relación entre el desmosoma y la enfermedad[36]. Los genes desmosomales asociados a la enfermedad son las cadherinas desmogleína-2 (*DSG2*) y desmocolina-2 (*DSC2*), las proteínas armadillo placofilina-2 (*PKP2*) y placoglobina o  $\gamma$ -catenina (*JUP*) y desmoplaquina (*DSP*)[55]. Además, se han encontrado mutaciones en otros 7 genes distintos a los desmosomales, como son, entre otros, el factor de crecimiento transformante beta 3 (*TGF $\beta$ 3*), desmina (*DES*) o la proteína transmembrana 43 (*TMEM43*)[16]. En total, más de 300 mutaciones potencialmente patogénicas han sido descritas, siendo responsables aproximadamente de un 60-65% de todos los casos de MCA diagnosticados[16, 56]. Entre todos ellos, las mutaciones en los genes *DSP*, *DSG2*, y *DSC2* son responsables, en conjunto, del 20-25% de los casos[57, 58], mientras que las mutaciones en el gen *PKP2* pueden suponer casi un 50% del total[59, 60] (Figura 6).

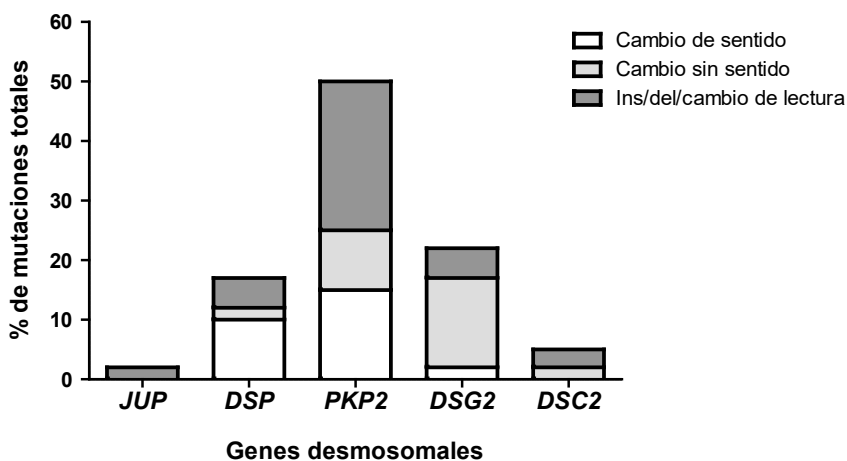


Figura 6. Porcentaje de mutaciones únicas encontradas para todos los genes desmosomales cardíacos (adaptado de Awad *et al.*, 2008[36]).

### 3.1. Herencia y características genéticas

Las mutaciones asociadas a pacientes de MCA suelen presentarse habitualmente en heterocigosis, con una herencia autosómica dominante. La penetrancia es incompleta y su expresividad variable, presentándose diferentes síntomas y con distinta severidad, incluso en pacientes con la misma mutación[16]. Esto puede ser debido a que el fondo genético, así como la forma de vida, desempeñan un papel importante en el desarrollo de la patología[21, 40, 61]. En el caso de que la mutación se encuentre en homocigosis, los primeros síntomas aparecen antes y con mayor severidad, como ocurre en los pacientes de los síndromes de Naxos[50] y Carvajal[50, 51].

Por otro lado, el tipo de mutación parece ser también determinante en el desarrollo de la enfermedad. Desde un punto

de vista genético, las mutaciones descritas en las proteínas desmosomales pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Mutación con cambio de sentido (o *missense*): Es una mutación no sinónima, que origina un codón que codifica para un aminoácido diferente de la proteína. La secuencia de la proteína es idéntica a la nativa, donde únicamente cambia el aminoácido correspondiente al codón mutado.
- Mutación sin sentido (o *nonsense*): Se debe a una mutación que origina un condón de parada o *stop* en el gen, lo que provoca el truncamiento de la proteína en el sitio de la mutación.
- Inserción/delección/cambio de pauta de lectura (o *frameshift*): Se trata de una mutación producida por la adición o la pérdida de uno o varios nucleótidos en la secuencia codificante del gen. En el caso de que esta inserción/delección ocurra en uno o varios codones, la proteína resultante ganará o perderá uno o varios aminoácidos en su secuencia, respectivamente. Sin embargo, en la mayoría de los casos, esta mutación produce un cambio en la pauta de lectura del transcrito. Ello origina la aparición de una secuencia aminoacídica diferente. De esta forma, el cambio en los codones corriente abajo (o en inglés *downstream*) puede originar



---

un codón de parada o *stop*, que provoca, finalmente, el truncamiento de la proteína.

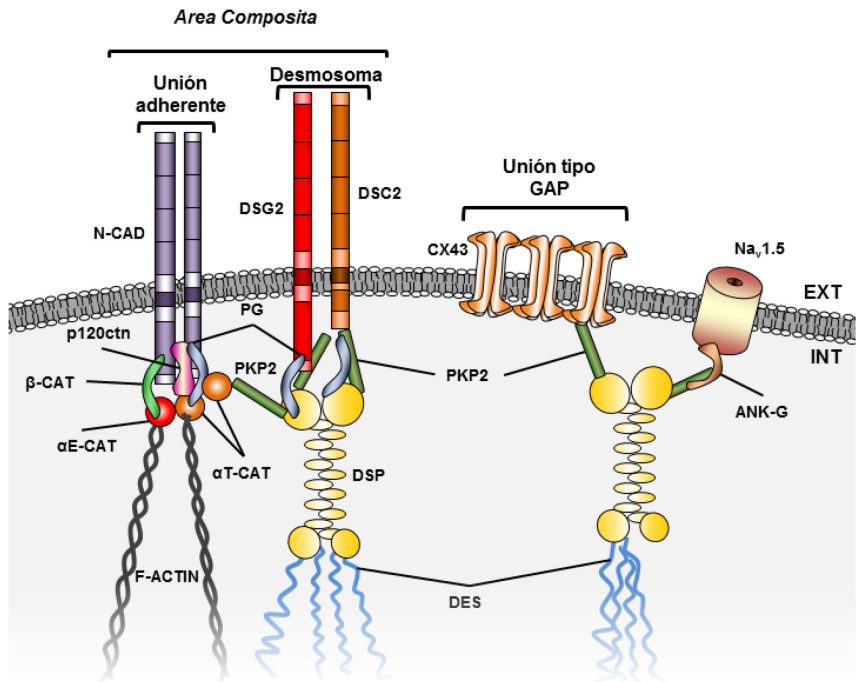
Estas mutaciones se comportan de manera desigual entre los pacientes con MCA. Por norma general, las mutaciones con variaciones genéticas “radicales” como son las mutaciones *nonsense* y *frameshift* son más habituales entre los pacientes, y cosegregan más frecuentemente que las *missense*[16, 56, 62](Figura 6). De hecho, los portadores de mutaciones radicales manifiestan la enfermedad más tempranamente y de manera más severa[36]. Esto no es de extrañar, puesto que el truncamiento de las proteínas que finalmente causan las mutaciones *nonsense* y *frameshift* sugiere un mayor efecto desde un punto de vista molecular. Por tanto, estas mutaciones son consideradas altamente patogénicas.

Por otro lado, en las mutaciones *missense*, se ha puesto en valor la influencia del fondo genético en la aparición de los síntomas. En un estudio comparativo de mutaciones *missense* entre diferentes poblaciones, se demostró que existía una cierta predisposición a padecer la enfermedad en algunas poblaciones y con determinadas mutaciones[57]. Por tanto, en un contexto genético determinado, la mutación podría ser clave para desencadenar la enfermedad, mientras en otros la mutación no sería tan determinante. Como el fondo genético parece desempeñar un papel importante en la enfermedad, el factor ambiental puede ser también otro factor clave para el desarrollo de MCA[61].

Por último, se ha observado que las mutaciones tienden a acumularse en regiones concretas de las proteínas desmosomales, las denominadas zonas calientes o en inglés *hot spot*. Por ejemplo, se han encontrado muchas mutaciones asociadas a pacientes concentradas en la región N-terminal de DSP[57, 63] o en las regiones extracelulares de la cadherina DSG2[57]. Dichas regiones parecen fundamentales para un correcto ensamblaje del desmosoma (Figura 7). En conjunto, estos datos revelan el alto grado de complejidad de la enfermedad, no solo en el ámbito puramente genético, sino también en el ambiental.

#### **4. El disco intercalar de los cardiomiocitos**

Los cardiomiocitos están estrechamente conectados entre sí por sus extremos, formando los discos intercalares. Dichas zonas presentan evaginaciones e invaginaciones que permiten aumentar la superficie de contacto en estas zonas. Aquí se encuentran varios tipos de uniones, que permiten el anclaje de las distintas estructuras del citoesqueleto (actina, filamentos intermedios y microtúbulos). Esto permite que el cardiomiocito soporte la continua tensión mecánica derivada de la contracción y dilatación que sufren. Además, permite establecer un acoplamiento eléctrico y metabólico entre las células, lo cual genera un sincitio funcional dentro del tejido cardíaco[64].



**Figura 7. Estructuras funcionales en el disco intercalar.** Las uniones adherentes y los desmosomas pueden también formar estructuras mixtas, denominadas *Area composita*. En ellas se observan interacciones entre proteínas desmosomales y adherentes (p.e. PKP2, αT-CAT[65] o PG[66]). Las uniones tipo GAP están formadas en el tejido cardíaco por CX43, la cual interacciona lateralmente para formar los complejos. Luego, interacciones heterófilas permiten conectar los citoplasmas de ambas células[67]. Tanto las uniones tipo GAP como los canales Na<sub>v</sub>1.5 están unidos a múltiples proteínas en la membrana[68, 69]. A fin de simplificar el esquema, solo se han dibujado las interacciones con proteínas desmosomales.

Las características del disco intercalar lo aportan tres tipos de uniones básicas: las uniones tipo Gap, las uniones adherentes y los desmosomas. Además, dichas estructuras coexisten con otras proteínas en el disco intercalar, tales como los canales iónicos, encargados de las propiedades eléctricas del tejido cardíaco. Aunque sus funciones son muy diversas, parece que

todas las estructuras que conviven aquí tienen una relación muy íntima entre ellas. Es por esto que, actualmente, se entiende al disco intercalar como una única unidad funcional, lo que ha sido definido como “conexoma”[70] (Figura 7).

En los siguientes apartados se desglosarán las principales estructuras y proteínas presentes en el disco intercalar. Por otro lado, el desmosoma se detallará más ampliamente en el apartado 5, mientras que el canal de sodio cardíaco se explicará en el apartado 6.

#### **4.1. Uniones Adherentes**

Se forman por proteínas encadenadas, que conectan mecánicamente a las células adyacentes. En el tejido cardíaco, las uniones adherentes están formadas por la proteína transmembrana N-cadherina (N-CAD), que se une en la superficie con otras N-CAD de la célula adyacente. En su región citoplasmática, N-CAD conecta con las proteínas  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -CAT) y catenina p120 (p120ctn). Finalmente, estas proteínas se conectan con  $\alpha$ E-catenina ( $\alpha$ E-CAT) y  $\alpha$ T-catenina ( $\alpha$ T-CAT), las cuales se conectan a su vez con los filamentos de actina del citoesqueleto (Figura 7)[71].

Hasta hace relativamente poco tiempo, tanto las uniones adherentes como los desmosomas se presentaban como elementos separados dentro del disco intercalar. Sin embargo, ahora se sabe que también existen grandes complejos proteicos formados por la “mezcla” de ambas estructuras, denominadas *Area composita*[71, 72]. Por ejemplo, se sabe que  $\alpha$ T-CAT es





capaz de interactuar con la proteína desmosomal PKP2 dentro del *Area composita*[65]. Además, el *knock-out* de  $\alpha$ T-cat reduce el contenido de PKP2 *in vivo*[73], lo que demuestra su íntima relación en este tipo de estructuras. Del mismo modo, la proteína desmosomal PG también puede encontrarse en las uniones adherentes, cumpliendo funciones similares a  $\beta$ -CAT aquí[66] (Figura 7).

Además de sus funciones mecánicas, las uniones adherentes pueden actuar como señalizadores intracelulares, con  $\beta$ -CAT como mediadora del proceso[66]. Esta proteína participa de manera crucial en la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -cat no canónica[74].  $\beta$ -CAT es capaz de translocarse al núcleo, uniéndose a receptores nucleares para la activación de genes. Dicha ruta de señalización es fundamental en el desarrollo embrionario, diferenciación de tejidos y proliferación[75].

Por último, debido a su homología con  $\beta$ -CAT (~83%)[66], la proteína desmosomal PG también puede formar parte de las uniones adherentes, sustituyendo a esta dentro de la estructura. Debido a que cumplen funciones similares, PG es también capaz de translocarse al núcleo, donde puede modular la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -cat[76, 77]. Por tanto, las uniones adherentes actúan, no solo como complejos proteicos de adhesión celular, sino también como reguladores de la señalización intracelular[78].

## 4.2. Unión tipo GAP

Se trata de uniones comunicantes que permiten el paso de iones y metabolitos entre los cardiomiocitos. Se forman por proteínas denominadas conexinas. Son proteínas transmembrana que se acoplan en múltiplo de seis para formar un poro en la membrana (Figura 7). Luego, estos hexámeros pueden interaccionar con otros de la célula vecina, creando así un poro comunicante entre ambas células[67]. Existen diferentes conexinas, con localizaciones muy diversas. Por un lado, conexina 40 (CX40) se expresa principalmente en las aurículas y en el sistema de conducción. Por otro, conexina 45 (CX45) se encuentra específicamente en los nodos y en las ramas derecha e izquierda del haz de His (Ver Figura 5). Finalmente, la conexina más importante del corazón es conexina 43 (CX43), la cual se localiza ampliamente distribuida por aurículas y ventrículos[79] (Figura 5).

Como se ha descrito antes, la función de las uniones tipo Gap es conectar a las células para formar un sincitio funcional, lo cual es fundamental para la propagación eléctrica dentro del tejido. Ante la despolarización de un cardiomiocito, las conexinas permiten la difusión de los iones a la célula adyacente, lo que permite la despolarización de dicha célula. Por tanto, tales proteínas son esenciales para mantener la homeostasis eléctrica dentro del corazón, y su alteración puede ser fatal. Por ejemplo, la deficiencia en ratón de Cx43 provoca una menor velocidad de conducción y MSC[80]. Además, su ausencia en el embrión es



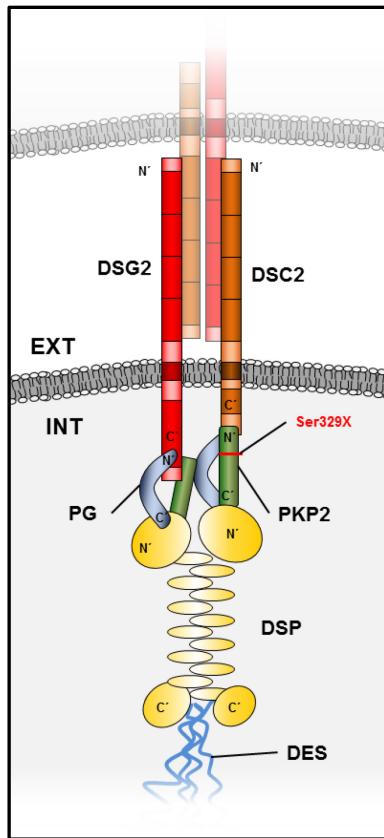
letal, debido a malformaciones del corazón[81], lo que sugiere también una función durante la embriogénesis cardíaca.

Además de estas funciones, parece que el defecto de CX43 afecta a otras estructuras dentro disco intercalar. La ausencia de su extremo C´terminal es fundamental para el correcto anclaje a la membrana de otras estructuras funcionales aquí, como es el canal de sodio cardíaco activado por voltaje o  $Na_v1.5$ [82]. Además, esto corrobora la idea de que el disco intercalar forma una única entidad funcional: el conexoma. Por tanto, las conexinas son esenciales, no solo para la propagación de la corriente eléctrica, sino también para la organización y estabilización de otras proteínas en el disco intercalar.

### **5. El desmosoma en el tejido cardíaco**

La tercera estructura de unión presente en los discos intercalares de los cardiomiocitos es el desmosoma. Se trata de un complejo proteico que permite el anclaje de la célula a su sustrato u a otra célula adyacente. Las proteínas desmosomales interaccionan entre sí para crear una cadena, estableciendo una unión mecánica (Figura 8).

Estas estructuras se expresan de manera ubicua en todos los epitelios. Destacan especialmente en epidermis y corazón, donde cumplen funciones esenciales en la integridad mecánica del tejido. Por tanto, es comprensible que exista afectación de ambos tejidos en patologías severas de origen desmosomal, como son los Síndromes de Naxos[83] y Carvajal[51, 84].



**Figura 8. Estructura de un desmosoma.** Se destacan las regiones N-terminales (N') y C-terminales (C') para cada proteína. La línea roja señala el lugar de mutación de proteína transgénica en los modelos.

En el corazón se expresan 5 proteínas desmosomales[55]. Las cadherinas DSG2 y DSC2 interactúan en el espacio extracelular formando un conglomerado de proteínas en la membrana que conecta ambas células (Figura 8 y CAD en Figura 9). Tras esta primera capa se encuentran las proteínas PKP2 y PG, las cuales interactúan con los dominios citoplasmáticos de las cadherinas. Esta unión a los dominios citoplasmáticos ocurre, principalmente, con el extremo

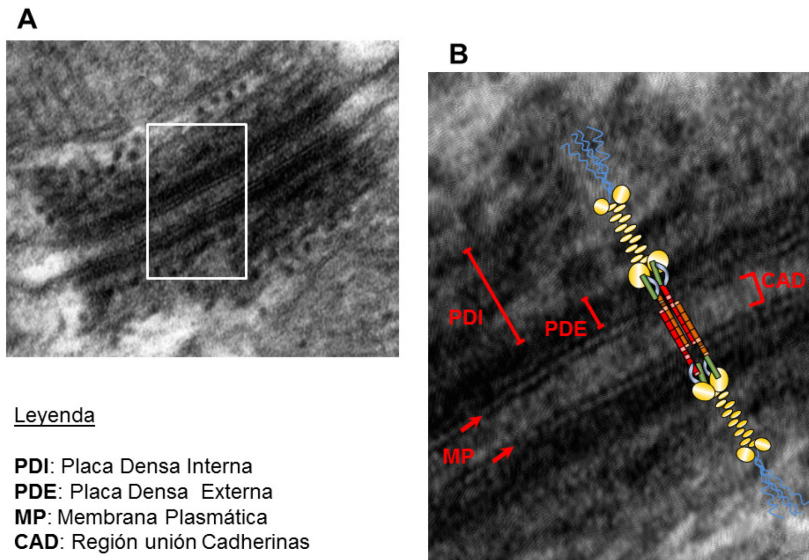


N-terminal de PKP2 y PG (Figura 8). De esta forma, sus extremos C-terminales se orientan hacia el interior celular (Figura 8). Esta capa ha sido denominada placa densa externa (PDE; Figura 9), donde coinciden todas las proteínas desmosomales. Mediante sus dominios armadillo, PKP2 y PG interaccionan con el extremo N-terminal de DSP (Figura 8), proteína de alto peso molecular (331KDa) que forma la denominada placa densa interna (PDI; Figura 9). Finalmente, el filamento intermedio DES, conecta con el extremo C-terminal de DSP[85] (Figuras 8 y 9). Las propiedades de estas proteínas serán descritas a continuación.

### **5.1. Cadherinas desmosomales**

Las cadherinas desmosomales forman parte de la familia de proteínas desmogleínas, la cual integra también a las desmocolinas. Además de ser el componente transmembrana en los desmosomas, son las proteínas mayoritarias de los mismos[86].

Mientras que el resto de los miembros de la familia desmogleínas restringen su expresión a epitelios estratificados, DSG2 y DSC2 se encuentran de manera ubicua en todos aquellos tejidos que presentan estructuras desmosomales. Es por ello que a estas dos cadherinas se les nombre como “cadherinas desmosomales”[55]. Así pues, estas son las únicas cadherinas que se expresan en el tejido cardíaco. A continuación se describen las principales características de cada una de ellas.



**Figura 9. Apariencia del desmosoma a nivel ultra-estructural. A)** Aspecto de un desmosoma de un cardiomiocito. **B)** Ampliación de la fotografía A, donde se detallan las capas y se representa la organización de las diferentes proteínas dentro del complejo.

### 5.1.1. Desmogleína-2

Todas las desmogleínas (DSG1-4) están compuestas por cuatro dominios extracelulares (EC1-4), un dominio de anclaje extracelular (AE) e intracelular (AI) muy conservados entre especies, un dominio transmembrana (TM) y una cola citoplasmática[86] (Figura 10).

Por sus dominios extracelulares, DSG2 es capaz de interactuar de manera heterofílica (unión con proteínas diferentes a ella misma) con las cadherinas desmocollinas de la célula adyacente (Figura 10). Es precisamente en estos dominios extracelulares donde se concentran muchas de las mutaciones encontradas en enfermos de MCA, las cuales suelen

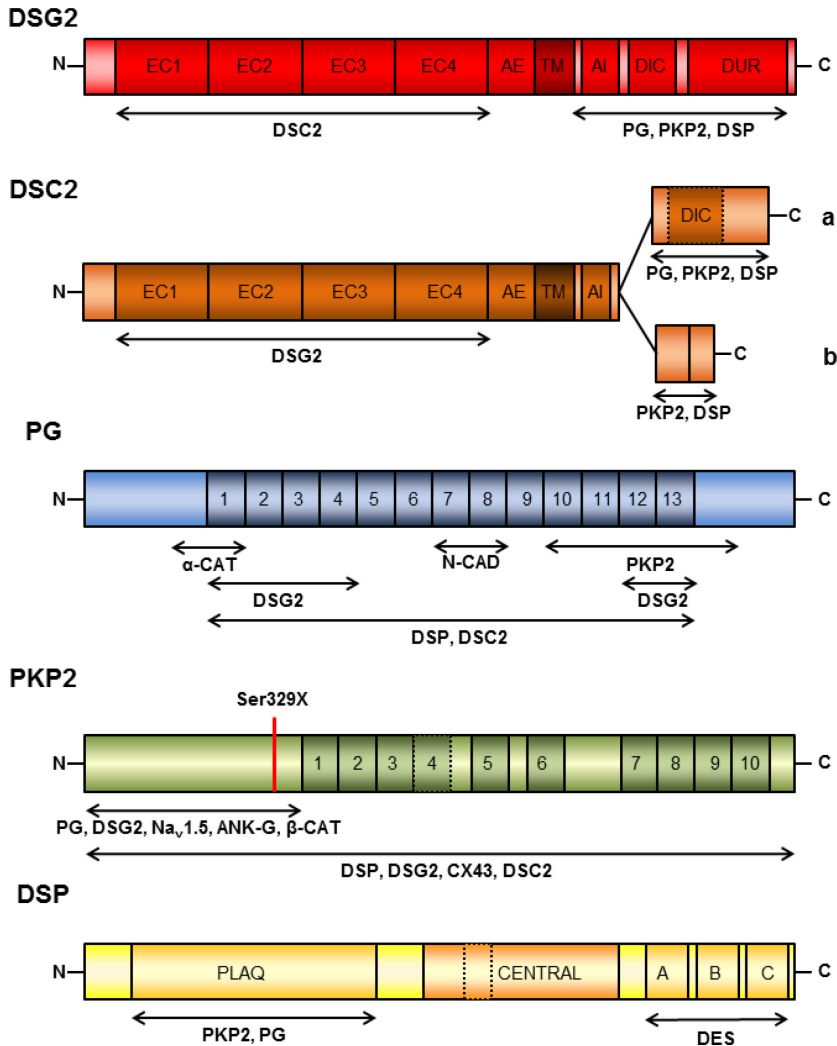


ser del tipo *missense*[36, 57]. Recientemente, un estudio *in vitro* describió una reducción drástica de la adhesión intercelular en presencia de DSG2 mutada. Ello demuestra la función esencial de DSG2 en la cohesión tisular[87]. Además, modelos *in vivo* para DSG2 mutada en regiones extracelulares muestran un severo fenotipo de MCA, lo que refuerza dicha idea[88, 89].

### 5.1.2. Desmocolina-2

Como DSG2, todas las desmocolinas (DSC1-3) están compuestas por 4 regiones extracelulares (EC1-4), un dominio de anclaje extracelular (AE) y una región transmembrana (TM), seguida por un dominio de anclaje interno (AI) (Figura 10). A diferencia de DSG2, DSC2 presenta un ajuste o *splicing* alternativo en su región citoplasmática, que genera las isoformas: DSC2a y b (Figura 10). Ambas isoformas coexisten en el desmosoma, donde la isoforma b es más corta, ya que pierde su región de anclaje interno, lo que impide su interacción con PG[78, 86] (Figura 10).

Desde un punto de vista genético, DSC2 ha sido el último gen desmosomal en ser relacionado con la enfermedad. Se conocen unas 50 mutaciones diferentes, con una baja frecuencia entre los pacientes[36]. Aunque no se han realizado estudios sobre mutaciones de *Dsc2* en ratones, la supresión de su expresión en el pez cebra provoca bradicardia, reducida contractilidad y dilatación de las cámaras cardíacas[90] (Tabla 2).



**Figura 10. Proteínas desmosomales del corazón.** Se representan los diferentes dominios estructurales para cada proteína. Debajo de cada una se especifican las regiones de interacción conocidas con cada proteína del disco intercalar. **EC1-4**: repeticiones extracelulares cadherina; **AE**: dominio de anclaje extracelular; **AI**: dominio de anclaje intracelular; **TM**: dominio transmembrana; **DIC**: dominio intracelular cadherina; **DUR**: dominio de unidad repetida; **1-13**: repeticiones armadillo (solo en PG y PKP2); **PLAQ**: dominio plaquina globular; **CENTRAL**: dominio central α-hélice; **A, B, C**: dominios homólogos a plaquinas. La línea roja destacada en PKP2 representa el sitio de mutación para la proteína truncada estudiada en esta tesis.





## 5.2. *Proteínas armadillo*

La familia de las proteínas armadillo se caracteriza por la presencia de una serie de motivos repetidos de unos 45 aminoácidos del mismo nombre. Los miembros de esta familia destacan por sus funciones estructurales y por su implicación en la señalización nuclear. Las proteínas desmosomales PKP2 y PG forman parte de esta familia, aunque evolutivamente se encuentran muy separadas entre sí[66, 91, 92].

En el desmosoma, tanto PKP2 como PG participan de manera fundamental en el tráfico y ensamblaje de las diferentes proteínas desmosomales[93-95]. Asimismo, se han observado funciones en la señalización celular, aunque en este sentido, difieren entre ellas[76, 96]. En los siguientes apartados se describen sus distintas características.

### 5.2.1. *Placoglobina*

La proteína placoglobina, también llamada  $\gamma$ -catenina (PG o  $\gamma$ -CAT) y codificada por el gen *JUP*, presenta 13 motivos armadillo en su zona central, flanqueada por sus extremos N' y C'terminales (Figura 10). Además de su interacción con DSP, PKP2 y ambas cadherinas, PG es capaz de unirse a diferentes proteínas de las uniones adherentes (Figuras 8 y 10).

Su región central tiene una homología del 83% con  $\beta$ -CAT, otro de los miembros de esta familia y con múltiples funciones conocidas[66]. Debido a esto, PG es capaz de realizar funciones similares a  $\beta$ -CAT, como por ejemplo, formar parte de las uniones adherentes (Figura 7).

Por otro lado, se sabe que PG es necesaria para el tráfico de DSG2 a la membrana, a través de su interacción con las proteínas kinesinas[97]. Además, su ausencia en queratinocitos reduce el anclaje de DSP y los filamentos intermedios a la placa, sugiriendo una función en el ensamblaje de estas proteínas al desmosoma[98].

### 5.2.2. Placofilina-2

La subfamilia de las placofilinas está compuesta por 3 miembros (PKP1-3), con una estructura muy similar entre ellas. Todas las PKP contienen 9-10 repeticiones armadillo, concentradas en sus extremos C´terminales. Además, contienen un extremo N´terminal, relativamente poco conservadas entre ellas[91].

Como componente esencial de los desmosomas en los epitelios, las PKP se encargan del sostén mecánico de los mismos. Además, también son conocidos por su participación en la señalización nuclear, lo que indican la dualidad de funciones de las PKP en el tejido: adhesión y señalización celular[91]. Las tres PKP están presentes en los epitelios, exhibiendo un patrón de distribución diferencial dentro de los mismos. Como excepción a esta localización, PKP2 es la única de las 3 placofilinas que se expresa en el tejido cardíaco[92].

PKP2 presenta un ajuste o *splicing* alternativo en el exón 6, lo que genera una isoforma larga (PKP2b) y otra corta (PKP2a), la cual carece de la repetición armadillo número 4[92] (Figura 10). Ambas isoformas han sido descritas en las uniones intercelulares y también en el núcleo[99].



Como las PKP1 y 3, PKP2 contiene dos dominios claramente definidos en su estructura. Por un lado, la región N-terminal de la proteína comprende los primeros 351 aminoácidos, y se denomina dominio delantero o, en inglés, *head domain*. Se trata de una región poco conocida, con una secuencia peptídica muy variable entre especies y que se ha demostrado, es capaz de interactuar por sí sola con las proteínas desmosomales DSG2, DSP y PG[100]. También es capaz de unirse a otras proteínas no desmosomales como  $\beta$ -CAT[100], CX43[101] o la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio cardíaco ( $\text{Na}_v1.5$ ) [102, 103] (Figura 10).

La región C-terminal, comprendida entre el aminoácido 352 al 837-881 (en función de si se trata de la isoforma b o a, respectivamente), contiene las diferentes repeticiones armadillo. Esta región es fundamental para el correcto acoplamiento de PKP2 a la membrana. Además, el dominio armadillo es capaz de interactuar con PG y DSP[100] (Figura 10).

PKP2 juega un importante papel durante la secuencia de ensamblaje del desmosoma. Se ha sugerido que esta proteína interactúa con la kinesina 2 para facilitar el tráfico de vesículas cargadas con DSC2[97]. Además, en un estadio más avanzado del ensamblaje desmosomal, PKP2 es requerido para el anclaje de DSP en la membrana[94].

Por último, aunque su localización en el núcleo fue descrita hace tiempo[99], poco se sabe sobre su función allí. Por un lado, se ha demostrado su interacción con componentes de la RNA polimerasa III, sugiriendo una función en la estabilización de las

subunidades en ausencia de transcripción[96]. Por otro, la sobreexpresión de PKP2 en células activa la vía Wnt/ $\beta$ -cat, lo que podría indicar una función reguladora de la misma[100].

### 5.2.3. Desmoplaquina

Desmoplaquina (DSP) es una proteína de la familia de las plaquinas, esencial en el mantenimiento y homeostasis de los desmosomas. Permite la unión del complejo desmosomal con las proteínas del citoesqueleto, en el caso del tejido cardíaco, con el filamento intermedio desmina (Figura 7). Presenta estructuras globulares en sus extremos, que flanquean una región central en  $\alpha$ -hélice. Su región N-terminal está compuesta por un dominio plaquina (PLAQ), mientras que su región C-terminal contiene tres dominios homólogos a las plaquinas (A, B y C en Figura 10). Además, su región central es capaz de interactuar con otro dominio igual de otra DSP, permitiendo la dimerización de la proteína (Figura 7). Finalmente, en el tejido cardíaco coexisten dos variantes de DSP, una más larga que otra, denominadas DSP de tipo I y tipo II respectivamente. Esta última se originan por un ajuste o *splicing* alternativo de su zona central[55, 85, 103] (Figura 10). A través de su extremo N-terminal, DSP es capaz de interactuar con los dominios intracelulares de las cadherinas, así como con la región N-terminal de PKP2 y las repeticiones armadillo de PG (Figuras 8 y 10). Finalmente, todo el complejo desmosomal se ancla al filamento intermedio desmina (DES), a través del extremo C-terminal de DSP.



Hasta el momento, al menos 100 mutaciones diferentes en *DSP* han sido asociadas a pacientes de MCA[104]. Cabe destacar la mutación homocigota presente en pacientes del síndrome de Carvajal, los cuales presentan unos síntomas muy severos[51, 52]. En este sentido, parece que *DSP* es esencial en el mantenimiento de la integridad del tejido cardíaco. Por ejemplo, un estudio de mutaciones en la región C´terminal de *DSP* muestra un desacople de la interacción *DSP-DES* en el disco intercalar. Esto provoca múltiples defectos, desde cambios ultra-estructurales, hasta problemas en la función cardíaca[105]. Mientras que la supresión de *DSP* es letal en ratón[106], su depleción en el adulto induce la aparición de tejido fibro-adiposo y el desarrollo de las características típicas de la MCA[107].

Por último, como en el caso de *DSG2*, se ha descrito una alta concentración de mutaciones en la región N´terminal de la proteína asociada a la enfermedad[57]. Se cree que este *hot spot* surge como consecuencia de que dicha región es la que permite interaccionar a *DSP* con *PG* y *PKP2*, elementos esenciales en la estabilidad de los desmosomas (Figuras 8 y 10).

## **6. El canal de sodio cardíaco**

Existen varios canales iónicos en el disco intercalar que le dan al cardiomiocito sus propiedades eléctricas. Entre ellos destaca el canal de sodio cardíaco activado por voltaje o  $Na_v1.5$ . Se trata del canal mayoritario en el tejido cardíaco, el cual se aloja en el

disco intercalar y, en menor medida, en la membrana basolateral de los cardiomiocitos[68].

Está formado por la subunidad  $\alpha$  ( $\text{Na}_v1.5$ ), formadora del poro, y varias subunidades accesorias, denominadas subunidades  $\beta$  (1-4) y que facilitan su correcta función y anclaje a la membrana[108]. Es un canal dependiente de voltaje que permite la entrada selectiva de iones  $\text{Na}^+$  a la célula. Participa de manera clave en la creación del potencial de acción cardíaco (PA), lo que permite reproducir y propagar la corriente eléctrica a través del tejido[109] (Figura 11).

La disfunción del canal es el origen de diferentes enfermedades arritmogénicas causantes de MSC. Se ha visto que mutaciones en el gen *SCN5A* (codificante para el canal  $\text{Na}_v1.5$ ) alteran la corriente de sodio a través de la membrana[110]. Ello es la causa de algunas canalopatías, tales como el síndrome de Brugada (SBr), síndrome de QT corto, síndrome de QT largo o fibrilación auricular familiar[111] (Figura 1). No obstante, otro tipo de disfunciones pueden provocar también este tipo de alteraciones. Las modificaciones post-traduccionales del canal[112-114], la mutación de subunidades  $\beta$ [15] o una desregulación de la expresión del propio gen *SCN5A* pueden alterar también la corriente de sodio, originando dichas enfermedades. Por tanto, cualquier alteración del canal está relacionada, de algún modo, con enfermedades de MSC.

En este sentido, la alteración de proteínas estructurales también puede originar una disfunción del canal  $\text{Na}_v1.5$ . La supresión *in vitro* e *in vivo* de anquirina-G (*ANKG*) provoca una reducción del

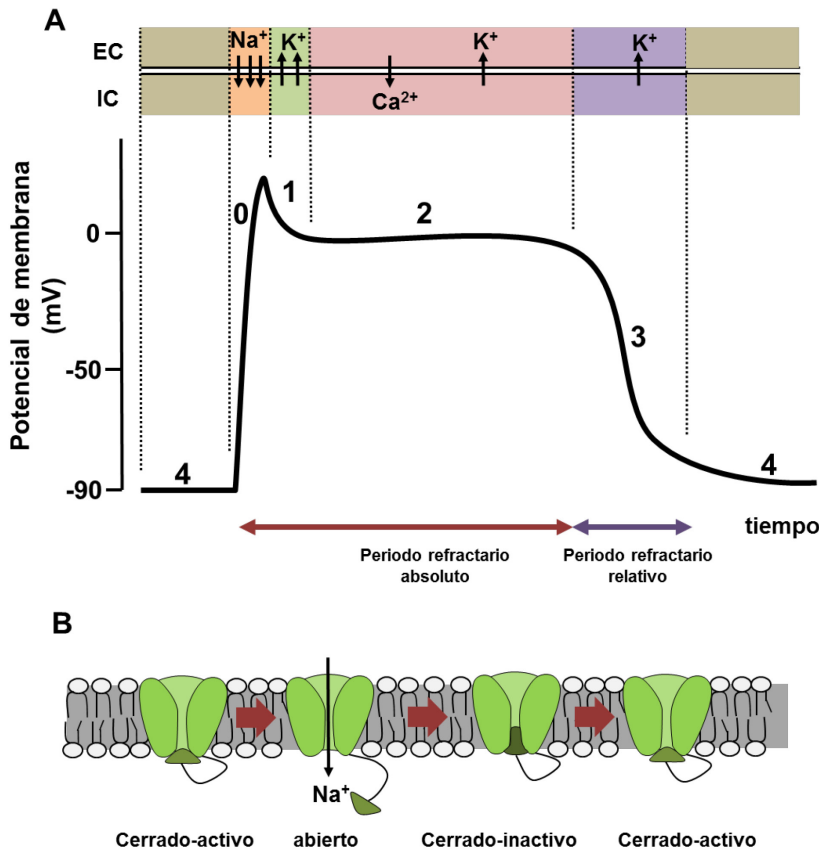


contenido de  $\text{Na}_v1.5$  en la célula[115, 116]. Además, la supresión de la proteína desmosomal PKP2 produce un remodelado del canal en la membrana, lo cual reduce la corriente de sodio[102, 117]. Y es que dichas proteínas interaccionan, directa o indirectamente con el canal (Figura 7), lo que indica la íntima relación de las diferentes proteínas en el disco intercalar, no solo física, sino también funcional[118].

### **6.1. Potencial de acción cardíaco y origen de las arritmias en la MCA**

La correcta contracción del tejido cardíaco es la base para un funcionamiento normal del corazón. Por tanto, la propagación rítmica y coordinada de la onda despolarizante dentro del tejido cardíaco es esencial. El potencial de acción cardíaco (PA) y el acoplamiento eléctrico entre cardiomiocitos son los mecanismos que regulan dichos procesos.

El PA es el mecanismo por el cual el cardiomiocito se despolariza y posteriormente vuelve a su potencial de membrana basal, permitiendo transmitir y reproducir la corriente eléctrica. En el corazón, el PA es particular, y se define por los diferentes canales presentes en el tejido[119]. Estos canales tienen unas propiedades físico-químicas determinadas, que permiten desarrollar las distintas fases del PA, como veremos a continuación.



**Figura 11. Potencial de acción cardíaco (PA).** **A)** Arriba se representa el flujo de los iones a través de la membrana plasmática durante las diferentes fases del PA. Abajo se observa el cambio en el PA y las diferentes fases. Además, se indican los periodos refractarios absolutos y relativos dentro del potencial. **B)** Representación de los estados conformacionales del canal Na<sub>v</sub>1.5 durante el PA cardíaco. EC: exterior celular. IC: interior celular.

En la Figura 11A se muestra la representación del PA en el ventrículo, donde se diferencian 5 fases (0-4). Cuando la corriente eléctrica pasa al cardiomiocito a través de las conexinas, la membrana de este sufre una pequeña despolarización, que es detectada por el canal de sodio activado





por voltaje ( $\text{Na}_v1.5$ ) (Figura 11B). Como consecuencia, los canales se abren y se produce una entrada masiva de iones  $\text{Na}^+$  que despolarizan la membrana, iniciándose así la fase 0 del PA (Figura 11). Luego comienza la fase 1, denominada en inglés “*notch*”, en la que ocurre una repolarización leve de la membrana por el cierre del canal  $\text{Na}_v1.5$  y la apertura de canales de  $\text{K}^+$  activados por voltaje. Además, la despolarización provoca la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje, lo que determina el inicio de la fase 2. La salida de  $\text{K}^+$  y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta fase crean un equilibrio eléctrico, que mantiene a la célula despolarizada (Figura 11A). Debido al cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  al final de esta fase, el ininterrumpido flujo de iones  $\text{K}^+$  inicia la fase 3, la repolarización del potencial de membrana. Finalmente, los canales de  $\text{K}^+$  se cierran y se alcanza el potencial de reposo, la denominada fase 4 (Figura 11A)[119].

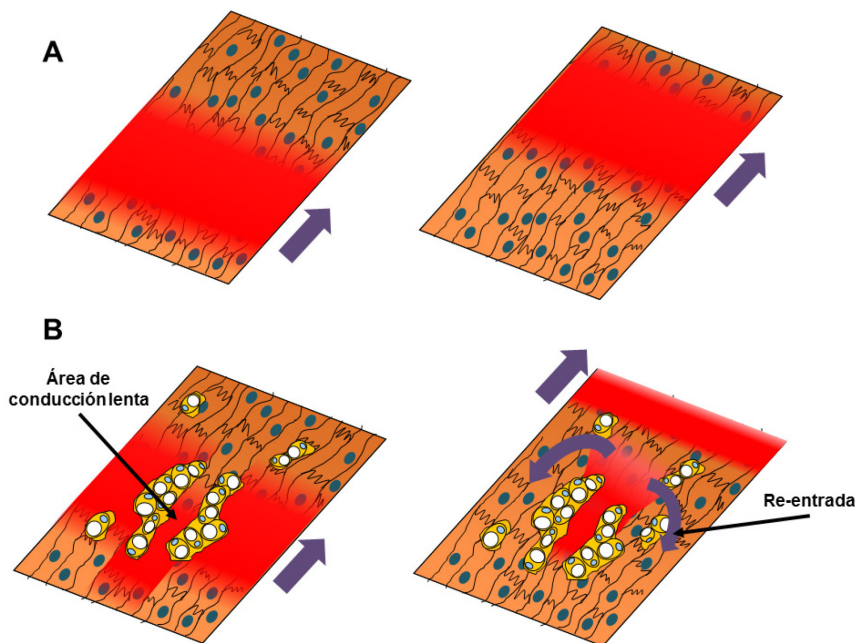
Una de las características más singulares del PA es la presencia de un periodo refractario. Este periodo se define como el tiempo en el cual la célula es incapaz de desarrollar un nuevo potencial de acción ante un estímulo eléctrico. Durante este tiempo podemos describir un periodo absoluto, donde la célula nunca puede activarse, y uno relativo, en el cual es capaz de activarse ante un estímulo excepcionalmente alto[120] (Figura 11).

En gran medida, el periodo refractario del cardiomiocito está determinado por las propiedades del canal  $\text{Na}_v1.5$ . Este canal adquiere diferentes conformaciones, que coinciden con las fases del PA (Figura 11B). Durante la fase de reposo, el canal se

encuentra en una conformación cerrado-activado, donde impide el paso de iones, pero es sensible a los cambios de voltaje. Cuando hay una bajada del potencial de membrana, el canal adquiere una conformación abierta, dejando pasar iones  $\text{Na}^+$  y generando la fase 1 del PA. Luego, al final de esta fase, el canal se cierra con una conformación de cerrado-inactivado, en el cual es insensible a cualquier cambio de voltaje en la membrana (Figura 11B). De esta manera, el estado cerrado-inactivo del canal coincide con el periodo refractario de la célula. Finalmente, el canal vuelve a su estado inicial de cerrado-activado, en el cual es de nuevo sensible, pudiendo así generar otro PA (Figura 11).

A nivel tisular, el periodo refractario permite la circulación unidireccional de la corriente eléctrica. Ante el estímulo originado en los nodos, el tejido propaga una onda despolarizante, seguido por un periodo refractario. De esta manera, aunque los iones circulan en ambas direcciones, la generación del PA solo es posible en una única dirección (Figura 12A).

Por contraposición, en un tejido cardíaco patológico, la circulación de la onda despolarizante es heterogénea. Esta heterogeneidad puede deberse a la disfunción de los canales o conexinas, así como a la heterogeneidad estructural del propio tejido[120] (por ejemplo en presencia de tejido fibro-adiposo). Sea cual sea el origen, las diferentes características electrofisiológicas dentro del tejido pueden desencadenar arritmias, mediante un mecanismo denominado re-entrada. Las arritmias acontecidas entre los pacientes de MCA se deben a un mecanismo de re-entrada.



**Figura 12. Mecanismo de reentrada en MCA.** A) Propagación de la corriente eléctrica a través del tejido cardíaco sano. B) Generación de re-entrada en tejido afectado por MCA. La heterogeneidad del tejido, con áreas de conducción lenta, genera nuevos PA en el tejido adyacente sano, generando la arritmia. Rojo: onda despolarizante. Flechas moradas: dirección de la propagación.

En la MCA, la heterogeneidad del tejido cardíaco es debida a la presencia de tejido fibro-adiposo. De esta forma, hay tejido defectuoso que favorece la formación de dichas re-entradas, y que son el origen de las arritmias en los pacientes (Figura 12).

Por último, estos focos pro-arrítmicos son identificables clínicamente. Luego, mediante el método de ablación celular es posible eliminar el tejido dañado. De esta manera, se crea un tejido cicatrizante no conductor, que reduce la frecuencia de las arritmias[45] (Figura 12).

## **7. Modelos para el estudio de los mecanismos implicados en la MCA**

La complejidad de la patología, diversidad de síntomas entre los pacientes y la importancia del fondo genético y del ambiente hacen difícil el estudio de la MCA desde un ámbito clínico. Además de esto, hay que destacar la baja frecuencia de la enfermedad entre la población, así como la gran dificultad para obtener muestras cardíacas. Sin embargo, la asociación entre las mutaciones en proteínas desmosomales y la MCA ha permitido desarrollar modelos animales y celulares para el estudio de la enfermedad (Tabla 2). Con dichos modelos se han podido dilucidar mecanismos moleculares y celulares esenciales para comprender en profundidad la enfermedad.

Los primeros diseños *in vivo* sobre proteínas desmosomales se centraban en la supresión (en inglés *knock-out*, *KO*) de sus genes codificantes. En este sentido, la depleción de *Jup* (codificante para PG) provocaba la muerte prenatal del feto, debido a malformaciones cardíacas y al adelgazamiento de las paredes ventriculares[121]. Del mismo modo, modelos desarrollados posteriormente para los genes *Dsp*, *Pkp2* y *Dsc2*, ofrecieron similares resultados, demostrando que las proteínas desmosomales son fundamentales para el desarrollo embrionario del corazón[90, 106, 122]. Por contra, estos resultados impedían estudiar en profundidad la evolución y el origen de la enfermedad en humanos.



Gen	Tipo de Mutación	Reemplazo de cardiomiocitos	Disfunción eléctrica	Dilatación (VI/VD)	Alteración desmosoma	Otras	Referencia
<b>Jup</b>	KO	No	-	-	Sí	Defectos en piel	[121]
	KO condicional	Fibrosis, inflamación	Sí* <sup>†</sup>	Sí/Sí	Sí	Incremento $\beta$ -catenina	[128, 129]
	Haploinsuficiencia	No	Sí* <sup>†</sup>	No/Sí	No	Efectos dependientes de edad y ejercicio	[126]
	Naxos <sup>PG2157del2</sup>	Fibro-adiposo	Sí <sup>†</sup>	Sí/-	-	PG nuclear	[137]
	KD-M	No	-	Sí	Sí	Malformación cardíaca	[138]
<b>Dsp</b>	KO	Muerte prenatal	-	-	-	Defectos en piel	[139]
	KO condicional	Fibro-adiposo	Sí	Sí/Sí	-	PG nuclear; defecto conexinas	[107, 125, 140]
	Tg-R2834H	Fibro-adiposo	Sí	Sí/Sí	Sí	Reducida interacción DSP-DES; Ejercicio altera vía Wnt/ $\beta$ -cat	[105]
<b>Pkp2</b>	KO	No	-	-	Sí	Deslocalización DSP	[122]
	KD-M	No	-	-	Sí	Defectos señalización celular	[141]
	Haploinsuficiencia	No	Sí* <sup>†</sup>	-	No	Fenotipo revelado con flecainida	[133]
	Tg-R735X (virus)	No	Sí*	No/Sí	No	Efectos dependiente de ejercicio	[142]
<b>Dsg2</b>	Del_EC1-2 <sup>‡</sup>	Calcificación, necrosis	Sí* <sup>†</sup>	Sí/Sí	Sí	Inflamación aséptica	[89, 143]
	Tg-N271S	Calcificación, necrosis	Sí* <sup>†</sup>	Sí/Sí	Sí	Defectos eléctricos antes del reemplazo	[88, 132]
<b>Dsc2</b>	KD-M	No	-	Sí	Sí	Bradicardia	[90]

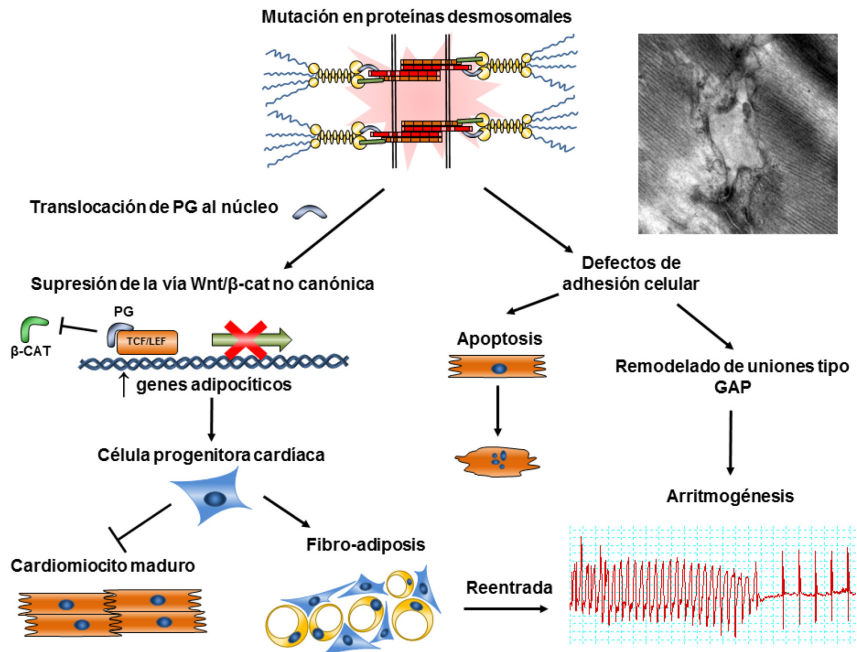
**Tabla 2. Modelos animales para proteínas desmosomales.** \* Defectos de conducción eléctrica (alteración ECG o disminución de la velocidad de conducción en el tejido). <sup>†</sup> Arritmias (inducidas o no). *KD-M*: *Knock-down* mediante morfolino. *KO*: *Knock-out*. <sup>‡</sup> Deleción de regiones extracelulares 1 y 2.

Posteriores diseños experimentales han permitido crear nuevos modelos viables, y que han desvelado importantes mecanismos sobre la MCA. En la Tabla 2 se resumen los principales modelos animales desarrollados, así como sus principales características. A continuación se describen los avances más trascendentes realizados sobre los modelos.

### **7.1. Formación de tejido fibro-adiposo en la MCA**

El tejido fibro-adiposo es la característica más definitoria de la enfermedad. Mucho se ha especulado sobre el tema, aludiendo a diferentes hipótesis, basadas o no, en un substrato empírico. La primera de estas hipótesis radica en la idea de que una reducción de la adhesión entre cardiomiocitos provoca su apoptosis[66] (Figura 13). Por tanto, el tejido fibro-adiposo sería un tejido cicatrizante particular, consecuencia de la apoptosis dispersa de los cardiomiocitos.

Por otra parte, la presencia de infiltrados inflamatorios hace pensar en un origen infeccioso, promovido por la reducción de la adhesión[123]. De hecho, se ha demostrado la presencia de ARN de origen viral en muestras de pacientes, lo que apoyaría esta teoría[124]. De este modo, los procesos inflamatorios generados por la infección provocarían efectos de toxicidad en las células, induciendo a su apoptosis y el remplazo.



**Figura 13. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la MCA.** La mutación de proteínas desmosomales provoca una cascada de eventos que desencadenan la enfermedad. Por un lado, la translocación al núcleo de PG suprime la vía Wnt/β-cat, induciendo una diferenciación adipocítica de las células progenitoras cardíacas. Por otro, la deficiencia en la adhesión celular provoca apoptosis del cardiomiocito y remodelado de proteínas implicadas en el PA cardíaco, induciendo así las arritmias. Modificado de Swope *et al.*, 2013[66].

Finalmente, estudios en modelos animales ha permitido desvelar el verdadero origen del tejido fibro-adiposo. El modelo de ratón *KO* condicional para *Dsp* (depleción del gen en el animal adulto) muestra un fenotipo muy severo, con dilatación ventricular, arritmogénesis y remplazo de tejido fibro-adiposo[107] (Tabla 2).

Tal supresión de *Dsp* promueve la translocación de PG al núcleo, lo que está detrás de la formación del tejido fibro-adiposo. En el núcleo, debido a su homología con β-CAT, PG es

capaz de unirse a los factores TCF4/LEF1 (del inglés *Transcription factor 4/Lymphoid enhancer-binding factor 1*), que regulan la expresión de genes diana de la vía Wnt/ $\beta$ -cat[66]. Como resultado, PG bloquea la actividad constitutiva de dicha vía, promoviendo un fenotipo más adipocítico en el cardiomiocito. Más tarde, Lombardi *et al.*, demostraron que este proceso ocurre específicamente en las células progenitoras cardíacas, lo que promueve una diferenciación anómala de estas células hacia un destino adipogénico[125] (Figura 13).

Otros modelos han aportado datos que refuerzan esta teoría. La haploinsuficiencia de PG en ratón no induce la aparición de tejido fibro-adiposo, aunque sí defectos eléctricos[126, 127]. Además, otros modelos *KO* condicionales para *Jup* muestran un severo fenotipo de MCA, con presencia de tejido fibroso pero no adiposo[128, 129] (Tabla 2), lo sugiere la necesidad de PG para la formación de adipocitos. Por último, el truncamiento de PG induce su localización nuclear, lo que provoca una inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, promoviendo así una trans-diferenciación de miocitos hacia un fenotipo más adipocítico[130]. Todo ello demuestra la necesidad de la presencia de PG nuclear para inducir la aparición de tejido adiposo en el tejido.

## **7.2. Proteínas desmosomales como elementos**

### **clave del acoplamiento eléctrico en el corazón**

Como se ha descrito previamente, la presencia de tejido fibro-adiposo es el causante de las anomalías eléctricas en los pacientes (ver apartado 6.1). Sin embargo, nuevas





investigaciones han demostrado que tales anomalías aparecen en ausencia de tejido fibro-adiposo[118, 131]. Ello sugiere que las proteínas desmosomales actúan de manera activa en el acoplamiento eléctrico del corazón. Así mismo, varios estudios en modelos animales han apoyado esta teoría.

En ausencia de tejido fibro-adiposo, la haploinsuficiencia de PG en ratón induce una conducción más lenta, taquicardias ventriculares y la aparición de arritmias, las cuales son más severas con la edad y el ejercicio[126]. Por otro lado, la mutación de DSG2 provoca también defectos eléctricos, incluso antes de la aparición de los cambios estructurales[132]. Por último, la haploinsuficiencia de PKP2 en ratón no provoca cambios estructurales pero sí induce arritmogénesis y defectos en la conducción[133] (Tabla 2).

Y es que, intuitivamente, parece que los defectos eléctricos son debidos a una menor adhesión entre las células. De hecho, la supresión de PKP2 o la mutación de DSG2 en cultivo reducen de manera drástica la adhesión celular[87, 115], lo que podría reducir el acoplamiento eléctrico entre los cardiomiocitos. Sin embargo, nuevas investigaciones demuestran que las anomalías eléctricas surgen por un efecto directo de las mutaciones desmosomales sobre las proteínas encargadas del acoplamiento eléctrico.

El análisis del tejido cardíaco de pacientes muestra una menor señal de CX43 y  $Na_v1.5$  en los discos intercalares, lo que podría deberse a un efecto de las proteínas desmosomales sobre la

estabilidad de dichos canales[134, 135]. En este sentido, estudios *in vitro* demuestran que hay una íntima relación entre las mutaciones desmosomales y la estabilidad de proteínas encargadas del acoplamiento eléctrico. Por ejemplo, la supresión de PKP2 provoca el remodelado de  $\text{Na}_v1.5$  y CX43 en la célula[115]. Asimismo, también se ha comprobado que esta y otras proteínas desmosomales son capaces de interactuar con diferentes canales eléctricos en la célula[101, 102, 132, 136].

Todo ello se refleja en una pérdida de la función de los canales. La supresión de PKP2 en cultivo reduce la velocidad de conducción y la corriente de sodio[102, 103], lo que causa una mayor susceptibilidad a las re-entradas *in vitro*[117]. Es más, se ha comprobado que la haploinsuficiencia de PKP2 en ratón provoca las mismas anomalías, aunque en este caso, solo revelado por la adición de flecainida, agente bloqueante del canal de sodio cardíaco ( $\text{Na}_v1.5$ )[133]. Todo ello contribuye a pensar que PKP2 es una proteína clave en la estabilización y la correcta función de los canales y proteínas encargadas del PA.





## **II. Hipótesis y Objetivos**

---





En el apartado de introducción se han analizado los principales aspectos clínicos, fisiológicos y moleculares que intervienen en el desarrollo de la MCA. En este sentido, las investigaciones clínicas han aportado información clave para comprender la fisiopatología de la enfermedad y sus factores de riesgos. Sin embargo, la baja prevalencia de la enfermedad así como la dificultad para obtener muestras, supone una importante limitación en su estudio.

No obstante, el descubrimiento de los factores genéticos asociados a la enfermedad, ha permitido abrir una nueva vía de investigación para el estudio, en mayor profundidad, de los factores fisiológicos y moleculares que desencadenan la MCA. En este sentido, los resultados genéticos son contundentes: >40% de las mutaciones encontradas en los pacientes se acumulan en el gen *PKP2*[56]. Por ello, el estudio de la biología de esta proteína es un aspecto fundamental en la investigación básica de la patología.

A pesar de que los modelos animales han sido una herramienta esencial para esclarecer aspectos fundamentales sobre los mecanismos que intervienen en la MCA, solo dos modelos animales han sido desarrollados para el estudio de *PKP2*[133, 142]. Sin embargo, dichos modelos no profundizan en aspectos fisiológicos, eléctricos y moleculares de una manera global, lo que permitiría dar luz a la etiología y al comportamiento de la enfermedad.

En esta tesis doctoral se ha pretendido indagar en todas estas cuestiones, con la intención de cubrir ese vacío de conocimiento esencial para comprender la MCA. Todo ello con el fin último de aportar información indispensable a un ámbito clínico, ya sea a través de una detección precoz, un diagnóstico más conciso o un tratamiento más eficaz.

Por este motivo, se ha desarrollado un modelo animal transgénico que porta un transgén, codificante para una PKP2 truncada, la mutación más frecuente entre los pacientes[36]. A partir de aquí se han propuesto una serie de hipótesis de trabajo:

1. La presencia de la proteína truncada PKP2-Ser329X en el tejido cardíaco reproduce, al menos en parte, el fenotipo característico de la MCA. Además, pensamos que la acción tóxica de este transgén es debido a un efecto de dominancia negativa. Por tanto, el fenotipo es dependiente del contenido de proteína truncada, afectando con más severidad en los casos donde exista un mayor contenido.
2. Los defectos fisiológicos encontrados en el modelo son debidos a cambios a nivel molecular. Dichos cambios acontecen de manera coordinada junto a las anomalías fisiológicas que previsiblemente aparezcan en el modelo, ya que son la causa principal que subyacen a dichos defectos.





3. El fenotipo del modelo animal está modulado por los factores ambientales asociados a la enfermedad en los pacientes. De tal modo, el ejercicio intensivo y el envejecimiento aceleran el desarrollo de anomalías cardíacas en modelo. Además, tales factores son capaces de desencadenar defectos cardíacos que permanecían enmascarados en el modelo.

A partir de las hipótesis expuestas se han desarrollado una serie de objetivos que tratan de contrastar tales conjeturas:

1. Desarrollo y comprobación de modelos transgénicos portadores de la mutación PKP2-Ser329X:
  - a. Modelo de ratón: generación de distintas líneas transgénicas de ratones que expresen diferentes niveles de proteína PKP2-Ser329X. Para ello se estudiará el contenido de transgén en cada una de las líneas fundadoras del modelo, y se seleccionaran aquellas que expresen diferente contenido de transgén.
  - b. Modelo celular: desarrollar un modelo celular portador de la mutación PKP2-Ser329X de manera estable en células atriales de ratón inmortalizadas (HL-1). El modelo servirá como herramienta para el estudio de mecanismos moleculares que no se puedan estudiar directamente en el modelo animal.

Posteriormente, se comprobarán los modelos desarrollados mediante el análisis del contenido de transcrito y proteína en cada línea y modelo.

2. Explorar las características fisiológicas del modelo de ratón, centrándonos en los aspectos más relevantes de la patología:
  - a. Estudiar la morfología del tejido cardíaco. Se pretende analizar la organización tisular y su composición. Además, se profundizará en la organización ultra-estructural de los cardiomiocitos, sus discos intercalares y sus desmosomas.
  - b. Profundizar en la estructura fisiológica del corazón mediante un estudio ecocardiográfico.
  - c. Estudiar anomalías eléctricas del corazón, centrándonos en la conducción eléctrica y posibles arritmias que puedan desarrollar.
  
3. Estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a los defectos fisiológicos encontrados en el modelo. Previsiblemente nos centraremos en diferentes aspectos moleculares:
  - a. Análisis de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -cat.
  - b. Estudio de PKP2 truncada y PKP2 nativa (endógena) dentro del tejido cardíaco.
  - c. Estudio de proteínas de adhesión celular presentes en el disco intercalar de los cardiomiocitos.



- 
- d. Estudio de canales con función en la generación del PA y la propagación de la corriente eléctrica a través del tejido.
- 
- 4. Analizar el efecto fisiológico de los factores ambientales más relevantes en la MCA. Nos centraremos en:
    - a. El estudio de la evolución de características eléctricas y estructurales durante el envejecimiento.
    - b. El estudio de la evolución de las características eléctricas y estructurales tras ejercicio intensivo.



## **III. Material y Métodos**

---





## 8. Construcción y clonaje

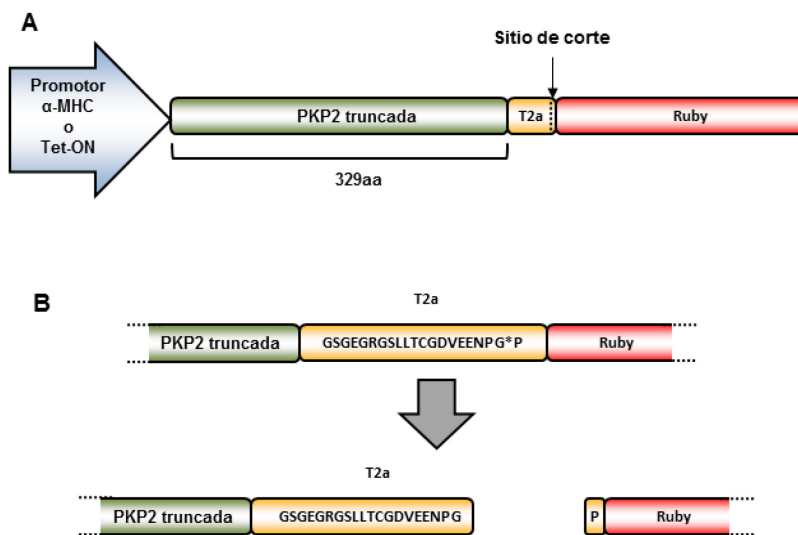
### 8.1. Diseño

Para este trabajo se utilizó la secuencia nucleotídica de *Pkp2*, obtenida del cDNA perteneciente a la especie murina *Mus musculus*. Dicha secuencia fue obtenida de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponible en línea con referencia NM\_026163.2 (Medline: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Para la generación de la proteína truncada, se escogió una mutación similar a la descrita en algunos pacientes de MCA. La deleción del nucleótido 987 de la secuencia del gen *Pkp2* (c.987del) ha sido descrita en varias familias con una alto índice de enfermos de MCA[63, 144]. Se trata de una mutación de cambio de pauta de lectura (o en inglés *frameshift*) que genera una secuencia aminoacídica aleatoria a partir de la Serina 329 de PKP2. Finalmente, aparece un codón de parada tras la adición de 23 aminoácidos aleatorios, lo que lleva a la parada prematura de la traducción (Ser329ArgfsX23).

Con esta mutación como referencia, se ha desarrollado una secuencia de cADN para *Pkp2* codificante para los primeros 329 aminoácidos de la proteína (Figura 14). Esto implica la eliminación de toda la región armadillo y parte de la región delantera (N´terminal) de la proteína (Figura 10). Además, varios nucleótidos a lo largo de la secuencia de *Pkp2* fueron modificados, generando nuevos codones sinónimos a los anteriores (Figura 54). Dichas variaciones nucleotídicas generan

una secuencia de cDNA diferente al del gen silvestre, mientras que la secuencia aminoacídica se mantiene inalterada. Esta modificación permite identificar tanto la construcción de ADN de *Pkp2* truncada como su transcrito mediante cebadores específicos, sin reacción cruzada con la secuencia de *Pkp2* endógena.



**Figura 14. Construcción diseñada para la generación del modelo celular y animal.**

**A)** Esquema de la construcción genética diseñada para el estudio. **B)** Auto-procesamiento del péptido T2a para la escisión de la proteína Ruby del complejo. El asterisco de la secuencia T2a indica el lugar de hidrólisis.

Una vez diseñada la secuencia de *Pkp2* truncada ( $Pkp2^{Tr}$ ), se introdujo otra secuencia nucleotídica en el mismo marco de lectura y codificante para el péptido T2a y la proteína fluorescente Ruby (Figura 14A). Dichos péptidos se sintetizan fusionados a la región C´terminal de PKP2 truncada y sirven





como etiquetas para esta proteína en el tejido. A continuación se describen sucintamente estas etiquetas:

- T2a: Este péptido procede del virus *Thoseaasigna*, del grupo de los picornavirus, y contiene una secuencia de 21 aminoácidos capaz de auto-procesarse. Como se muestra en la Figura 14B, la última prolina de su secuencia peptídica es capaz de escindirse mediante un mecanismo auto-proteolítico[145]. Como consecuencia de ello, separa a la proteína PKP2 truncada de la proteína Ruby, lo que evita que esta afecte a la interacción de PKP2 truncada con sus dianas en la célula. Además, T2a se mantiene unido a PKP2 truncada, lo cual permite detectarla sin interferir en su función, debido a su pequeño tamaño (Figura 14A). Este mecanismo es una herramienta común en estudios celulares y moleculares[146, 147].
- Ruby: es una proteína fluorescente monomérica, modificación de la proteína fluorescente tetramérica eqFP611[148]. Esta proteína fluorescente sirve como indicador de la expresión del transgen en el tejido mediante su excitación a una longitud de onda de 558nm.

El diseño de la construcción  $Pkp2^{Tr}$ -T2a-Ruby fue realizada mediante el programa informático Vector NTI® Software y la secuencia fue finalmente obtenida de síntesis a través de la compañía Genart.

## 8.2. Clonación

La construcción *Pkp2<sup>Tr</sup>-T2a-Ruby* fue extraída del plásmido original usando las enzimas de restricción *Agel* y *XhoI* (Promega). Para ello se añaden en un tubo 2  $\mu$ L del tampón *Restriction Enzyme 20X Buffer D*, 0,2  $\mu$ L de BSA acetilada a una concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, 1  $\mu$ L del stock de las enzimas endonucleasas *Agel* y *XhoI* (5-12 unidades de actividad, U), 1  $\mu$ g de plásmido conteniendo la construcción y hasta 20  $\mu$ L de volumen final de agua libre de nucleasas. Posteriormente, la mezcla se incuba 2h a 37°C y agitación a 220rpm. El resultado de la digestión se corre en un gel de agarosa al 0,8% y se recoge la banda con un tamaño de 1.722pb, correspondiente a la construcción. Finalmente se purifica la banda con el kit *Nucleospin gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel). La banda se mezcla con 200  $\mu$ L del tampón NT por cada 100mg de gel y se calienta a 50°C durante 10min. Luego se vierte a la columna suplementada en el kit y se centrifuga 1min a 11.000g. Se lava la membrana con 700  $\mu$ L del tampón NT, se centrifuga dos veces a 11.000g durante 2min y finalmente se eluye el ADN con 30  $\mu$ L de tampón NE centrifugando a 11.000g durante 1min.

Ahora, el fragmento se sub-clona en plásmidos bajo dos promotores diferentes (Figura 14), para desarrollar distintas estrategias:

- $\alpha$ -MHC: Se trata de un promotor bien descrito, que limita la expresión del gen al tejido cardíaco, dándole especificidad a la expresión de la construcción. Fue utilizado para la transgénesis de los animales. Este



promotor ha sido muy utilizado en estudios *in vivo* sobre MCA[88, 125, 137]. El plásmido pcDNA conteniendo dicho promotor fue obtenido comercialmente ( $\alpha$ MHC-mCherry-Rex-Blasticidin; Addgene, cat: #21228).

- Tet-ON: Es un promotor de origen bacteriano (*Escherichia coli*), que reprime la expresión del gen en condiciones normales. Sin embargo, en presencia de tetraciclina (o su molécula análoga doxiciclina) activa la expresión del gen[149]. Dicho promotor fue utilizado para regular la expresión de nuestro transgén en células HL-1. Además, flanqueando al inserto Tet-ON-*Pkp2*<sup>Tr</sup>-T2a-Ruby, se introdujeron las denominadas secuencias terminales repetitivas o en inglés *long terminal repeats* (LTR). Se trata de secuencias reconocibles por la maquinaria empaquetadora de virus lentivirales. De esta forma, la secuencia contenida entre estos dominios son cortados y empaquetados en partículas virales, para su posterior transducción en las células diana. El vector pTRIPZ contiene todos los elementos necesarios para la expresión y empaquetamiento del inserto (GE Dharmacon; cat: RHS4740).

Para el sub-clonaje de la construcción de PKP2 truncada se cortan los plásmidos pcDNA y pTRIPZ, donde se contienen los promotores  $\alpha$ -MHC y tet-ON, respectivamente. Se utilizaron las enzimas AgeI y XhoI para ello, siguiendo el mismo protocolo descrito para la extracción de la construcción *Pkp2* truncada. Tras purificar las bandas correspondientes a los vectores

plasmídicos, se une el inserto siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega). Se realiza un proporción molar 3:1 (vector:inserto) para la ligación. Para ello se añaden 150ng de vector (pcDNA o pTRIPZ), 17ng de inserto, 1µL del tampón *Ligase 10X Buffer*, 0,5µL de la enzima *T4 DNA Ligase* y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 10µL. Por último, la mezcla se incuba toda la noche a 4°C y se congela a -20°C hasta su transformación en bacterias.

Para la transformación del plásmido correspondiente, se usan células bacterianas *E. coli* de la cepa DH5α (Biomedal; cat: KT-4694). Para ello se mezclan 25µL de las células en stock con 3µL del ADN plasmídico, incubando todo ello en hielo durante 30 min. Posteriormente se provoca un shock térmico a 42°C durante 45s y se añade medio de cultivo *Luria Bertani* (LB) (Sigma-Aldrich). Luego se incuba a 37°C en agitación durante 1h y se siembra en placas de agar a una concentración de 100µg/mL de ampicilina para, posteriormente, incubar toda la noche a 37°C. Se recogen 10 colonias y se incuban durante 6-8 horas en 3mL de medio LB con ampicilina 100µg/mL a 37°C y agitación. Finalmente, el cultivo se añade a otros 100mL de medio LB con ampicilina durante toda la noche a 37°C y agitación.

Una vez crecidas las bacterias, se procede a la extracción y purificación de los plásmidos. Para ello se utiliza el kit *Endofree Plasmid Maxi* (Qiagen; cat: 12362) según las instrucciones del fabricante. El cultivo bacteriano se centrifuga a 6.000g durante 15min y 4°C. El sobrenadante se descarta, se añaden 10mL de tampón *P1* y se resuspende el pellet de células completamente,



mediante pipeteo o agitación mecánica. Luego se añaden 10mL de tampón *P2*, invirtiendo 4-6 veces el tubo e incubándolo a temperatura ambiente durante 5min. Se vierten 10mL de tampón *P3* y se invierte el tubo 4-6 veces, añadiendo inmediatamente a un tubo *QIAfiter Maxi* e incubándolo a temperatura ambiente durante 10min. Luego se filtra y el líquido se vierte a columnas *QIAGEN-tip 500*, previamente equilibradas con 10mL del tampón *QBT*, y se deja vaciar por gravedad. Ahora se lava la columna dos veces con 30mL del tampón *BQ* y se eluye el plásmido con 15mL del tampón *QF*. Para precipitar el ADN se añaden 10,5mL de isopropanol, se mezcla y se centrifuga a 5.000g durante 60min. Posteriormente se retira el sobrenadante y se lava el ADN precipitado con 5mL de Etanol 70° y se centrifuga a 5.000g durante otros 60min. Finalmente, se retira el sobrenadante, dejando secar el precipitado durante 5-10min y volviéndolo a resuspender con 300µL de tampón TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA en agua) durante toda la noche a 4°C. El plásmido se cuantifica con *NanoDrop*<sup>®</sup> y se conserva a -80°C hasta su uso. En los apartados 11.2 y 12.2 se detalla su uso.

## **9. Modelo celular**

### **9.1. Células y mantenimiento *in vitro***

Para los experimentos *in vitro* fue utilizada la línea de células inmortalizadas HL-1. Dicha línea celular deriva de cardiomiocitos atriales de ratón inmortalizada con la inserción en su genoma del oncogén SV40[150]. Para el mantenimiento de las células se utiliza en medio de cultivo Claycomb (Sigma; cat: 51800C) suplementado con 10% FBS (del inglés *Fetal Bovine Serum*;

Sigma-Aldrich), penicilina 100 U/mL, estreptomina 100µg/mL (GIBCO), L-glutamina 10mM (GIBCO) y 0,1mM de noradrenalina (Sigma-Aldrich). Además, la siembra de las células se hace en placas previamente tratadas con una solución de 0,02% de gelatina (Sigma-Aldrich; cat: G9391) y 5µg/mL de fibronectina (Sigma-Aldrich; cat: F-1141) en PBS e incubadas durante al menos 10min a 37°C. Las células se mantienen en incubadora a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> y se transfieren a una nueva placa a una dilución 1:3 cuando se encuentran en una confluencia del 100%.

## **9.2. Producción de vectores virales y transducción**

Se utiliza el sistema de virus de segunda generación para la producción de las partículas virales. Dicho sistema consta de 2 vectores plasmídicos, que contienen toda la maquinaria de empaquetamiento y envoltura viral: el plásmido PAX2 (Addgen; cat: 12260) contiene la maquinaria que permite el reconocimiento y empaquetamiento del ADN diana, mientras que el plásmido VSV-G (Addgen; cat: 8454) produce los componentes de la envoltura de las partículas virales. Además, se utilizaron las células HEK293T como células productoras y empaquetadoras de las partículas virales. Estas células proceden de las células humanas embrionarias de riñón humano 293, a las cuales se les ha introducido el transgén SV40 antígeno T. Dicha línea celular tiene la capacidad de ser fácilmente transfectada, y han sido usadas de manera rutinaria como células “empaquetadoras” de partículas retrovirales[151].



Para la producción de partículas virales, en primer lugar se siembran 3 millones de células HEK293T en una placa de 100mm de diámetro con 5mL de DMEM 4.500mg/mL de glucosa (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de FBS, penicilina 100 U./mL, estreptomina 100 µg/mL (GIBCO) y L-glutamina 10mM (GIBCO). Tras su incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h, el medio se sustituye por 5mL de DMEM suplementado fresco, y se incuban a las mismas condiciones durante 3 horas para equilibrar el pH. Para la transfección de los plásmidos se siguen las instrucciones del kit *Protransfection Calcium Phosphate* (Promega, cat: E1200). Para la transfección se mezclan 6,55µg de PAX2, 3,3µg de VSV-G y 10µg del vector que contiene el inserto, en este caso, el plásmido pTRIPZ con la construcción Tet-ON-Pkp2<sup>Tr</sup>-T2a-Ruby. A la mezcla de plásmidos se añaden 62µL de CaCl<sub>2</sub> a una concentración de 1,5M y 500µL de agua estéril. Finalmente, el ADN se precipita con la adición, gota a gota y en constante agitación, de 500µL de *Hepes Balance Salt Solution* (HBSS) 2x a pH=7,4. Tras 20min de incubación de la mezcla, el precipitado se añade al cultivo y este se incuba durante 6-8 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras este tiempo, el medio se sustituye por DMEM suplementado fresco y las células se incuban durante 36h para permitir la producción y liberación de las partículas virales al medio. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se recoge y se vierte a través de un filtro de nailon con un tamaño de poro de 40µm para evitar contaminar el cultivo con células empaquetadoras HEK293T. Al sobrenadante filtrado se añade polybrene<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 8µg/mL. Polybrene<sup>®</sup> facilita la adsorción de las partículas virales a los receptores en la célula diana,

mejorando la infección de dichas células[152]. El sobrenadante es entonces añadido a células HL-1, sembradas a una densidad de 120.000 células/mL 48h antes de la transducción. Finalmente, transcurridas 24h, el sobrenadante se retira del cultivo de HL-1 y se añade medio Claycomb suplementado. Pasados 5 días, se realiza una selección de las células transducidas mediante la adición al medio del antibiótico puromicina 2,5 µg/mL y se mantiene este antibiótico durante 10 días.

### 9.3. Ensayo *Renilla/Luciferasa*

Los ensayos *Renilla/Luciferasa* se realizan sobre la línea estable HL-1 transducidas con la construcción *Pkp2<sup>Tr</sup>-T2a-Ruby* y regulada por el promotor Tet-ON. El control para este experimento son células HL-1 sin infectar. Para conocer el nivel de activación de la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina se utiliza un promotor que contiene motivos de reconocimiento de los factores de transcripción LEF1/TCF, los cuales participan en dicha vía (Figura 13). Este promotor regula la expresión de la enzima luciferasa. Toda la construcción se integra en el plásmido M50 Super 8x TOPFlash (Addgene, Cat: #12456), utilizado en otros estudios realizados sobre las células HL-1[107]. Por último, el plásmido pGL2 (Promega), conteniendo el promotor de EF1 $\alpha$  corriente arriba del gen *Renilla*, se usa como control de la transfección en cada experimento[153].

El ensayo se realiza en células sembradas a una confluencia de 80.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos previamente tratadas con una solución gelatina/fibronectina





e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Algunos cultivos se tratan con el antibiótico doxiciclina 2µg/mL para la activación de la expresión del transgén (Ver tet-ON en apartado 8.2). Transcurridas 24h de incubación, el medio de cultivo Claycomb se sustituye por medio Claycomb sin antibiótico (el cual afectaría al proceso de transfección) y se incuba durante 2h más.

Durante este proceso de incubación se preparan los reactivos de transfección. El proceso de transfección se realiza mediante el producto Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para cada experimento se realizan 3 réplicas. Se consideran réplicas de un experimento a los pocillos transfectados usando la misma mezcla de Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 y plásmidos. Para cada réplica se mezclan 0,5µg de plásmido M50 Super 8x TOPFlash, 10ng de plásmido pGL2-promotor EF1α-Renilla y 50µL de medio OPTI-MEM<sup>®</sup> (Invitrogen). En otro tubo se añaden 4µL de Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 y 50µL de medio OPTI-MEM<sup>®</sup> y ambas mezclas se dejan reposar 5min. Luego, las soluciones de ambos tubos se mezclan y se incuban otros 20-30min antes de añadirlo al pocillo de células. Tras una incubación de las células con esta solución durante 4-6h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio de cultivo se sustituye por medio Claycomb suplementado fresco y se vuelven a incubar en las mismas condiciones durante 48h. Finalmente, las células se lavan con PBS frío, se añaden 200µL del tampón PLB 1x del kit *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System* (Promega; Cat: E1980) y las muestras se congelan a -80°C hasta su uso.

Para la detección y cuantificación de las enzimas *Luciferasa* y *Renilla* se usa el mismo kit nombrado arriba. La solución de lisis se recoge de los pocillos y se centrifuga a máxima velocidad a 4°C durante 2min para eliminar los restos celulares. 10µL del sobrenadante se añaden por duplicado en placas opacas de 96 pocillos. Para la adición de los reactivos y la medición de la luz emitida, se utiliza el luminómetro *GloMax 96 microplate* (Promega). El instrumento se programa para la adición de 50µL de la solución *LARII* (sustrato de *Luciferasa*), posterior agitación y una medida a los 10s tras la mezcla. Luego se añaden otros 50µL de la solución *Stop&Glo*<sup>®</sup> (sustrato de *Renilla*), se agita y se vuelve a medir a los 10s tras la mezcla.

Las medidas obtenidas para el ensayo *Luciferasa* se relativizan con las medidas de *Renilla* para el mismo pocillo. La normalización de los datos se realiza utilizando los controles (HL-1 no infectadas) para cada experimento.

## **10. Modelo animal**

### **10.1. Ceba y estabulación**

Para el desarrollo del modelo animal se utilizaron ratones de la cepa híbrida B6D2F1/OlaHsd. Esta cepa se obtiene del cruce entre animales hembra de la cepa C57BL/6JOlaHsd y machos de la cepa DBA/2OlaHsd. Dicha cepa híbrida, denominada B6D2F1, fue obtenida de la compañía Harlan (ahora llamada Envigo).



Los animales fueron estabulados a una temperatura de  $22\pm 1,3^{\circ}\text{C}$  y 12h de luz/oscuridad. La dieta para roedores (Harlan/Envigo) y el agua fueron suministradas *ab libitum*. Para esta tesis doctoral se analizaron animales de una edad comprendida entre 3-13 meses de edad. Todos los estudios realizados sobre animales han sido evaluados y aprobados por el comité ético de experimentación animal (CEEAA) de la Universidad de Barcelona y se rige por el Real Decreto 53/2013. El sacrificio de todos los animales fue realizado por dislocación cervical.

## 10.2. Transgénesis de embriones

La transgénesis de la construcción  $\alpha\text{-MHC-Pkp2}^{\text{Tr}}\text{-T2a-Ruby}$  fue realizada por el laboratorio de Metabolismo Experimental que lidera la Dra. Marta Casado Pinna en el Instituto de Biomedicina de Valencia y perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC). La transgénesis se realizó sobre embriones de la cepa híbrida B6D2F1/OlaHsd.

La construcción fue extraída del vector pcDNA descrito previamente mediante la digestión con la enzima de restricción *SfiI* a  $50^{\circ}\text{C}$ , y luego con la enzima *BamHI* a  $37^{\circ}\text{C}$  con las disoluciones recomendadas por el fabricante (Promega). El resultado de la digestión fue corrido en un gel de agarosa al 1% y se aisló la banda de mayor peso molecular, correspondiente al inserto.

Se usó la técnica de microinyección pronuclear para transferir el inserto en el ADN de los cigotos[154]. Esta técnica consiste en inyectar el ADN en uno de los pronúcleos de óvulos recién fecundados, antes de que se produzca la unión de los dos

pronúcleos. Para la obtención de los cigotos se cruzaron hembras de 8-9 semanas de edad de la cepa B6D2F1/OlaHsd con machos de la misma cepa. Para aumentar el número de cigotos, las hembras se superovularon con la inyección intraperitoneal de *Pregnant mare`s serum gonadotropin* (PMSG) a 10U/L y a las 46-48h con *human chorionic gonadotropin* (hCG) a 10U/L, tras lo cual se pusieron a cruzar con los machos (una hembra por cruce).

A las 24h tras el cruce se extrajeron los cúmulos de cigotos junto con las células cumulares del ámpula de las hembras, se digirieron con hialuronidasa para deshacer los cúmulos y se inyectó el ADN digerido y purificado. Tras 24h incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda, se seleccionaron los cigotos que habían pasado al estadio de dos células y se reimplantaron en hembras CD1 pseudogestantes (cruzadas con machos CD1 vasectomizados).

Se realizaron 2 tandas, 17 hembras en total. Se reimplantaron 198 embriones inyectados, de los cuales nacieron 58 crías, de las que 10 eran transgénicas. Se escogieron los machos (5) como fundadores de las líneas transgénicas.

### **10.3. Mantenimiento y genotipado de las líneas transgénicas**

Tras el desarrollo de los diferentes fundadores de las líneas transgénicas, se propagaron colonias para cada uno de los 5 fundadores, cruzando estos con ratones hembra de la cepa B6D2F1 (Harlan Laboratories/Envigo). Como resultado, se



obtenía un 50% de animales transgénicos heterocigotos y un 50% de animales silvestres (*wild type*) de cada cruce. De este modo, el transgén se mantenía en la colonia en heterocigosis. Los animales *wild type* (WT) resultantes de los cruces fueron utilizados como controles de sus hermanos transgénicos.

Para la determinación del genotipo de cada animal, se corta 0,5cm de cola y se guarda a -20°C para su posterior procesado. La purificación del ADN genómico y la posterior detección de transgén se realiza con el Kit *KAPA Mouse Genotyping Kit* (KAPA Biosystems; cat: KK7302). Para la extracción del ADN se introduce el fragmento de cola en la mezcla de lisis del kit (2µL de 1U/ µL *KAPA Express Extract Enzyme* y 10µL de 10x *KAPA Express Extract Buffer* en 100µL de agua estéril), se incuba durante 10min a 75°C y posteriormente se detiene la reacción incrementando la temperatura hasta 95°C durante 5min. Tras una breve agitación por volteo, se centrifuga durante 1min a 14.000rpm y se guarda a 4°C hasta su uso.

La detección del transgén se realiza mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de las siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*). Para la amplificación se utilizan los siguientes cebadores: cebador sentido: 5'-TGCCTAGCGAGGCCAGACTGAGACT-3' y cebador antisentido: 5'-TGTCTGCCACGAAGTCGTTTTTC-3'. Los cambios nucleotídicos en la secuencia del transgén permiten la amplificación específica de este y no de la secuencia del gen nativo para *PKP2* (endógeno) (Figura 19A y Apéndices Figura 54). Para la reacción de PCR se utilizan las soluciones y enzimas del *Kit KAPA Mouse Genotyping*, con las cantidades

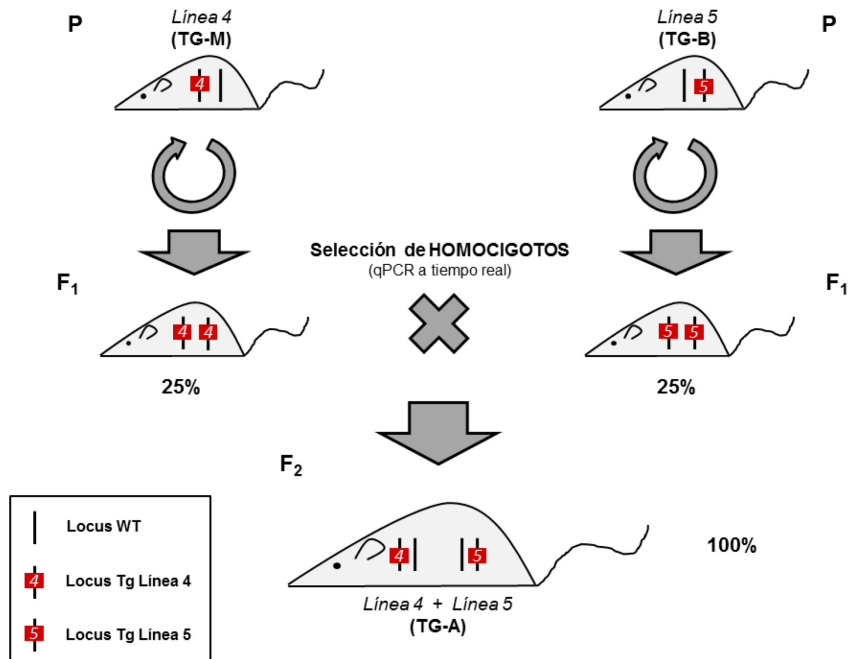
recomendadas por el fabricante. Para cada reacción se añaden: 12,5µL de *2x KAPA2G Fast Genotyping Mix*, 1,25µL de la mezcla de los cebadores sentido y antisentido de una concentración de 10µM, 1,25µL de DMSO, 1µL del sobrenadante resultante de la extracción de ADN y 9µL de agua estéril, hasta obtener un volumen final de 25µL. El protocolo de amplificación del ADN es el siguiente: 95°C 3min → [95°C 3s → 60°C 15s → 72°C 20s] x40 → 96°C 15min. Finalmente, se corren 4µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 1,5%. Las bandas de ADN se revelan con el agente intercalante de ADN *midori green* (NIPPON Genetics) en la reveladora ChemiDoc™ (BioRad). La presencia de una banda de 120 pares de bases determina la presencia de transgén (Figura 19).

#### **10.4. Obtención de animales doble heterocigotos**

Se realizaron cruces entre animales transgénicos de la línea fundadora 4 entre sí y animales de la línea 5 entre sí (Figura 15). Como resultado de dichos cruces, se esperaba obtener animales de tres genotipos diferentes: silvestres (25%), heterocigotos para el transgén (50%) y homocigotos para el transgén (25%) (Figura 15). Para identificar los animales homocigotos para el transgén en este F<sub>1</sub>, se realiza una cuantificación de la cantidad de transgén inserto en el ADN genómico de cada animal. Para ello se utiliza la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR *Real time*). Debido a interferencias en la señal de fluorescencia de los productos del kit *KAPA Mouse Genotyping*, se utiliza un método de extracción de ADN genómico alternativo al descrito previamente.



Se utiliza parte del ADN obtenido de las colas de ratón para la realización de una qPCR *Real time* usando cebadores específicos para PKP2 truncada (Ver secuencias en apartado 12.3). La descripción del método de extracción de ADN y amplificación por qPCR está detallada en el apartado 15.1.2.



**Figura 15.** Diseño para el desarrollo del modelo doble heterocigoto o TG-A. Los rectángulos en rojo representan el transgén.

Una vez identificados los animales homocigotos de cada línea transgénica, fueron cruzados entre ellos (homocigoto Línea 5 x homocigoto Línea 4) para la obtención de una generación F<sub>2</sub> 100% doble heterocigota (Figura 15). Las camadas resultantes de estos cruces fueron genotipadas usando el mismo procedimiento descrito.

Una vez desarrolladas las diferentes líneas, se cuantificó la expresión del inserto en cada una (Figura 25), estableciendo un gradiente de expresión entre ellas. La línea 5 fue nombrada como “línea transgénica de baja expresión (**TG-B**). La línea 4 se denominó “línea transgénica de expresión media” (**TG-M**). Finalmente, la línea doble heterocigota fue nombrada como “línea transgénica de alta expresión” (**TG-A**).

## **11. Protocolos in vivo**

### **11.1. Entrenamiento en cinta andadora**

Se seleccionaron 40 animales transgénicos (Líneas TG-B y TGM) y 20 animales *wild type* de una edad de 3 meses para la realización de este experimento. Se establecieron dos grupos experimentales: grupo “ENTRENADO” y grupo “SEDENTARIO”. Cada grupo consta de 20 animales transgénicos [10 machos y 10 hembras de los grupos TG-B y TG-M (5 animales por grupo y sexo)] y 10 animales *wild type* (5 machos y 5 hembras). Los animales sedentarios se mantenían estabulados sin ningún tipo de ejercicio. Para los animales del grupo entrenamiento se estableció un ejercicio intensivo de carrera en cinta andadora (*Treadmill*, Panlab), similar a otros protocolos descritos previamente[155, 156].

La cinta andadora está compuesta por 5 calles cerradas con unas dimensiones de 50x10cm (largo x ancho) cada una. Al final de la cinta se encuentra una rejilla electrificada que estimula al animal a seguir corriendo (*treadmill* LE8710M, Panlab). Se disponía de dos cintas andadores, por lo que en cada tanda se





entrenaban a 10 ratones. Durante todo el procedimiento la intensidad de corriente de la rejilla se mantuvo entre 0,18-0,40mA. La inclinación de la cinta permaneció a 0° de inclinación durante todo el periodo de entrenamiento. Se estableció un periodo de entrenamiento de 16 semanas consecutivas con un progresivo incremento de la velocidad máxima de carrera desde 30cm/s la primera semana, hasta 45cm/s la última semana (Figura 16).

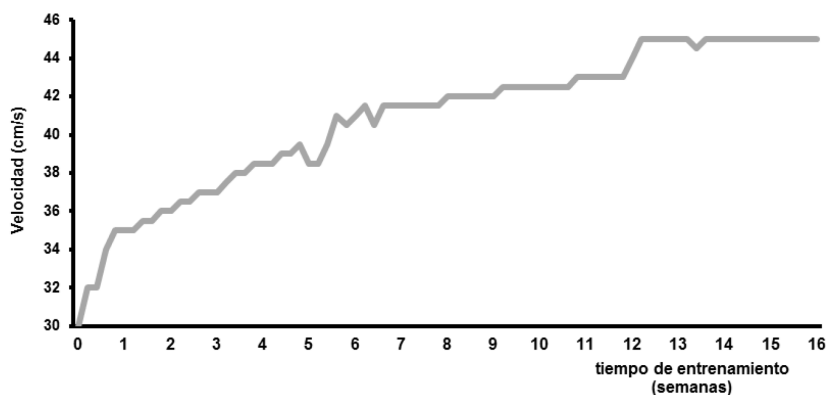


Figura 16. Progresión de la velocidad máxima durante el protocolo de entrenamiento.

Se establecieron dos periodos dentro del protocolo:

- Periodo Adaptativo: Una semana antes del comienzo del experimento, los animales se adaptaron a la carrera en cinta andadora durante 5 sesiones en 5 días consecutivos. Esta adaptación consiste en una carrera de 15min a una velocidad de 15cm/s en la primera sesión, que progresivamente se incrementa en velocidad y tiempo hasta alcanzar una velocidad de 30cm/s durante

1h en la quinta sesión (Figura 16). Los animales que no consiguieron adaptarse (n=3; 2 *wild type* y 1 transgénico) fueron reemplazados por otros durante esta fase. El animal se considera no adaptado cuando, superados 10min de ejercicio, se mantiene más de 20s consecutivos en la rejilla electrificada.

- Periodo de ejercicio intensivo: Tras la primera semana de adaptación, los animales se entrenan 70min diarios. En cada sesión se establece una fase de calentamiento y otra de entrenamiento. La fase de calentamiento consiste en un incremento progresivo de la velocidad durante un periodo de 10min, desde 15cm/s iniciales y hasta la velocidad máxima estipulada para ese día. Alcanzada dicha velocidad máxima comienza la fase de entrenamiento, con una duración de 60min (Figura 16). Durante el entrenamiento, algunos animales eran retirados cuando se observaba fatiga. Como regla general, se considera fatigado cuando el animal se mantiene en la rejilla más de 1min o cuando cae de manera continuada (>20 veces) en un periodo de 5min. El animal era excluido del experimento cuando era retirado por fatiga en más de 5 sesiones de entrenamiento. De este modo fueron excluidos 3 animales (2 *wild type* y 1 transgénico).

Este protocolo ha sido adaptado de otros estudios realizados en ratas que han demostrado afectar a la función y estructura del corazón[157]. Además, diversos estudios de entrenamiento en



ratones fueron utilizados para adaptar los parámetros a nuestro modelo[155, 156, 158].

## **11.2. Estudios ecocardiográficos y electrofisiológicos**

Para todos los estudios *in vivo* los animales se anestesian usando isoflurano al 2,5-3% en O<sub>2</sub> en una cámara anestésica (Harvard Apparatus). Posteriormente, se utiliza una mascarilla para mantener el estado anestésico durante el procedimiento mediante isoflurano al 1,75% vaporizado con O<sub>2</sub>. La temperatura se mantiene entre 37,1-37,4°C durante todo el procedimiento, mediante el uso de una sonda anal y una manta eléctrica con el instrumento Physiosuite (Kent Scientific Corporation).

### *11.2.1. Ecocardiografía*

El estudio ecocardiográfico transtorácico se realiza en todos los grupos sedentarios de 7 y 12 meses de edad, así como en los grupos corredores tras el periodo de entrenamientos. Para los animales corredores, todos los estudios se realizan al menos 6 horas después del entrenamiento. Este estudio fue realizado en colaboración con la médica especialista en cardiología María Sanz, perteneciente al departamento de cardiología deportiva del Hospital Clínic de Barcelona. Parámetros estándares para el diagnóstico de la MCA en humanos son utilizados en este estudio[159].

Los diferentes parámetros ecocardiográficos son internacionalmente conocidos por sus siglas en inglés. Por tanto, para esta tesis se ha establecido el uso de dichas siglas, en

favor de simplificar el entendimiento y homogeneizar el uso de los términos.

Las medidas se toman bajo sedación del animal (1,75% de isoflurano en O<sub>2</sub>) mediante una sonda 10S (11,5 MHz) y en el ecógrafo Vivid Q (GE medical). Se toman imágenes para la visión parasternal eje largo (PLAx, *parasternal long-axis view*), eje corto (PSAx, *parasternal short-axis*) y apical de cuatro cámaras (4C). Para cada visión se toman tres ciclos cardíacos diferentes. Posteriormente las imágenes obtenidas se analizan mediante el software EchoPac (EG, Vingmed, versión 113). Con estas visiones se realizan las siguientes medidas estructurales y funcionales:

*Medidas estructurales.*- Se miden las dimensiones y área del ventrículo derecho en la visión PLAx al final de la fase diastólica (RVDd y RVAd, *right ventricle diastolic dimension/area parasternal long-axis*, respectivamente), usando el modo M a nivel de la válvula aórtica. Por otro lado, se utiliza el modo M en la visión PSAx a nivel de la aorta para las medidas del tracto de salida del ventrículo derecho (RVOT, *right ventricle outflow tract*). Asimismo, la visión PSAx en el modo M a nivel de los músculos papilares sirve para medir las dimensiones del ventrículo izquierdo (LVDd, *left ventricle diastolic diameter*), el grosor del septo interventricular (IVS, *interventricular septum*), el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (PW, *posterior wall thickness*). Además, al final de la sístole se miden las dimensiones del ventrículo izquierdo (LVSD, *left ventricle systolic diameter*). Por otro lado, la masa del ventrículo izquierdo se calcula de manera indirecta mediante la siguiente fórmula:



$$LVmass = 1,04 \cdot [(LVDd + IVS + PW)^3 - LVDd]$$

Donde 1,04 es la densidad del miocardio[160].

*Medidas funcionales.*- La función sistólica del ventrículo derecho se obtiene mediante el desplazamiento sistólico del plano del anillo tricuspídeo (TAPSE, *tricuspid annular plane systolic excursion*). Este parámetro es una medida indirecta de la contractibilidad del ventrículo derecho. Para medir la función del ventrículo izquierdo se utiliza la fracción de acortamiento endocárdica (LVFS, *left ventricle endocardial fractional shortening*) obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$LVFS = \left( LVDd - \frac{LVSd}{LVDd} \right) \cdot 100$$

El efecto Doppler es ampliamente utilizado en ecocardiografía para determinar el flujo sanguíneo en el corazón e, indirectamente, la función cardíaca[43]. La onda pulsada del Doppler se utiliza para medir el flujo venoso trans-mitral y trans-tricúspide en el tracto de salida del ventrículo izquierdo con una visión 4C (*time to peak*, TP). También se obtiene de esta manera el flujo sanguíneo del ventrículo derecho, gracias a su medida del tiempo de eyección a nivel del RVOT hacia la arteria pulmonar (*ejection time*, ET) y la aceleración del miocardio del VD durante su contracción (*Acc= myocardial Acceleration during isovolumic contraction*, Acc). Los parámetros TP, TP/ET y Acc estiman la presión pulmonar, que puede sugerir, de manera indirecta, la función sistólica del VD[43].

### 11.2.2. Electrocardiografía

Los registros de electrocardiograma (EGC) se realizan cuando las constantes de temperatura y anestesia son estables. Se toman 10min de registro de la derivación II mediante la punción subcutánea de los electrodos. Para ello se coloca el electrodo con carga negativa en la pata delantera derecha, el positivo en la pata izquierda trasera y la toma de tierra en la pata trasera derecha. El registro se realiza con el aparato *Powerlab acquisition system 16/30* (ADInstruments, Oxford, UK) y se guarda con el software LabChart 7 para su posterior análisis.

El cálculo de los diferentes parámetros electrocardiográficos se realiza sobre una región de 2-3min del registro. Dentro de este se establecen promedios, utilizando 200 latidos consecutivos. Tras el ajuste de los límites para cada intervalo (onda P, intervalo PR, QRS y QT), se calculan los valores obtenidos para cada promedio. El análisis fue realizado mediante el software LabChart 7 (ADInstruments).

Para los intervalos QT en ratones, los valores se corrigen mediante el intervalo RR usando la siguiente fórmula[161]:

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{\left(\frac{RR}{100}\right)}}$$

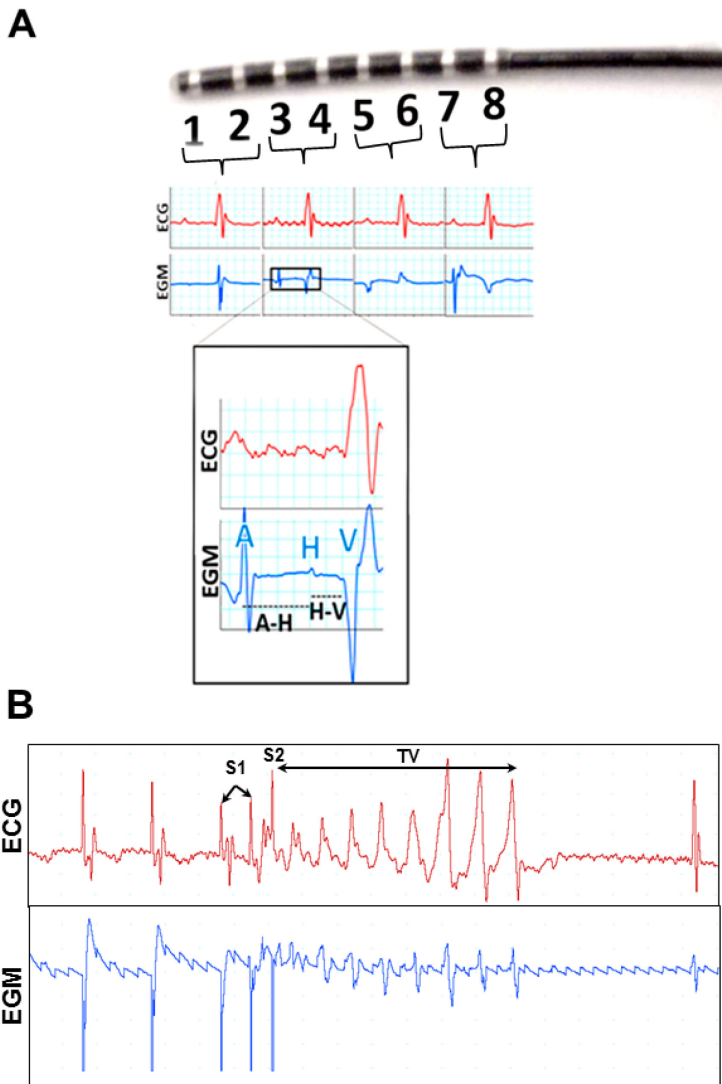


### 11.2.3. Estudios electrofisiológicos

Todos los estudios electrofisiológicos se realizaron en colaboración con el Dr. Eduard Guasch de la unidad de arritmias del Hospital Clínic de Barcelona, con protocolos similares a los ya descritos previamente[157].

Tras la estabilización de los niveles de anestesia y temperatura en el animal, se realiza una pequeña incisión (~0,5cm) en la parte derecha del cuello y se aísla la vena yugular interna del tejido circundante. Tras ligar la vena para evitar el desangrado y realizar un pequeño corte en ella, se introduce cuidadosamente un catéter de estimulación octopolar (Scisense; Ontario, Canada) hasta el ventrículo derecho. La correcta localización del catéter se determina mediante el registro intracavitario captado por el propio catéter (EGC). La estimulación y/o detección se puede realizar mediante cuatro posiciones diferentes: desde la zona proximal (dipolo 1-2) hasta la distal (dipolo 7-8), lo que permite detectar la posición para cada una de las medidas (Figura 17A).

Después de 10-15min de estabilización, los electrocardiogramas intracavitario y de superficie (Derivación II) son registrados simultáneamente mediante el instrumento *Powerlab acquisition system 16/30* (ADInstruments, Oxford, UK). El típico registro electrofisiológico obtenido para ambas visiones se muestra en la Figura 17A. Todos los datos fueron grabados a 10kHz de frecuencia y analizados *a posteriori*.



**Figura 17. Análisis electrofisiológico mediante catéter intracavitario. A)** Arriba se muestra un catéter octopolar y los 8 anillos para la detección/estimulación. En medio se representan cuatro ejemplos de registro electrocardiográfico de superficie (ECG; en rojo) e intracavitario (EGM; en azul) mediante la detección de los cuatro dipolos del catéter. Abajo se amplía el registro del dipolo 3-4, donde se muestra la señal del atrio (A), la del His (H) y la del ventrículo (V). Se muestran los intervalos A-H y H-V. **B)** Ejemplo de taquicardia ventricular (TV) tras la estimulación en ráfaga del catéter (S1) y el estímulo final pro-arritmico (S2).





La marca característica del His en el electrocardiograma intracavitario se detecta habitualmente en los dipolos 3-4. Los intervalos de tiempo entre la señal del atrio y el His (denominado intervalo A-H) y del His hasta el ventrículo (denominado intervalo H-V) se calculan según la Figura 17A. Las medidas de 5 latidos consecutivos se promedian para cada animal.

La medición del periodo refractario y la inducción de arritmias se realizan mediante la estimulación del dipolo más distal del catéter (1-2), controlado por un electro-estimulador (AD Instruments, Oxford, UK). Para determinar el periodo refractario del ventrículo se realizan una secuencia de 9 estímulos de igual frecuencia ( $S1=100\text{ms}$ ), seguido de un último estímulo ( $S2$ ). Para cada secuencia,  $S2$  va progresivamente reduciendo su intervalo de tiempo en  $1\text{ms}$  respecto al último  $S1$ , hasta la pérdida de la señal de despolarización del ventrículo. El periodo refractario se define como el intervalo de tiempo  $S2$  más corto capaz de inducir la contracción del ventrículo. El promedio de 3 medidas se calculan por cada animal.

El protocolo de inducibilidad de arritmias se realiza mediante la aplicación de secuencias compuestas de 9 estímulos ( $S1=100\text{ms}$  y  $80\text{ms}$ ) y un último estímulo ( $S2$ ) siguiendo dos estrategias diferentes: i) usando un intervalo de 4 veces el periodo refractario para cada animal; ii) aplicando una intensidad de corriente de  $400\text{mA}$  al pulsado (Figura 17B). Tras estos protocolos se aplican ráfagas de 25 estímulos  $S1$  de intervalos de  $60\text{ms}$  y, progresivamente, reduciéndose en  $2,5\text{ms}$  para cada ráfaga, hasta alcanzar los  $40\text{ms}$ . Una taquicardia ventricular (TV) se define como  $>3$  latidos ventriculares arrítmicos consecutivos

tras la última espícula de estímulo (Figura 17B). Para concluir que un animal es inducible deben acontecer, al menos, tres episodios de TV en un mismo protocolo de inducción o cuatro episodios de TV durante todo el estudio electrofisiológico.

## **12. Histología**

### **12.1. Tinciones histoquímicas**

#### *12.1.1. Parafina*

Tras la eutanasia, los corazones se aíslan y fijan en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) en PBS pH=7,4 durante toda la noche en agitación. Posteriormente, los corazones se lavan en dos pasos de 20min con agua destilada y se deshidratan mediante una gradación creciente de alcoholes etílicos (Et30° 15min → Et50° 15min → Et70° 30min x4 → Et90° 15min x2 → Et96° 15min x2 → Et100° 15min x3). Para la inclusión en parafina, los corazones se sumergen en xileno (20min x2) y luego se incuban en parafina líquida (60°C) durante 2 horas y con 4 cambios de parafina. Finalmente, se monta el bloque de parafina con una orientación transversal o longitudinal del corazón.

Se realizan secciones seriadas de 10µm de grosor con un micrótopo RM2235 (Leica). Se incuban unos minutos en un baño de agua destilada a 37°C para estirar el tejido, se recogen con portaobjetos SUPERFROST PLUS (Thermo Scientific) y se dejan secar en una estufa a 37°C durante toda la noche.



Para la realización de las tinciones histológicas, las secciones se desparafinan y rehidratan con el siguiente protocolo: xileno 10min x3 → Et100° 5min x2 → Et96° 5min → Et90° 5min → Et70° 5min → Et50° 5min → H<sub>2</sub>O destilada 5min. Se escogen las tinciones hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson para la observación general de las diferentes estructuras del tejido. También se realiza la tinción picrosirio para destacar las fibras de colágeno dentro del tejido[162]. Tras la tinción, las secciones se deshidratan en pasos crecientes de alcoholes (Et70° 2min → Et96° 10s → Et100° 20s) y se sumergen durante al menos 10min en xileno hasta su montaje con cubreobjetos en la solución DPX (Merck). Los protocolos de preparación de colorantes y tiempos de tinción se muestran en el Apéndice 33.

### *12.1.2. Criostato*

Primero, 0,1mL de heparina sódica (5000U) se inyectan a los animales vía intraperitoneal. Transcurridos 5min, los animales se sacrifican, los corazones se perfunden con PBS durante 5min y luego con PFA al 0,5% en PBS pH=7,4 durante otros 5min. Posteriormente, los corazones se extraen y post-fijan en PFA al 1% en PBS pH=7,4 en agitación suave durante toda la noche a 4°C. Tras el proceso de fijación, los corazones se lavan con agua destilada en dos pasos de 30min en agitación para luego ser inmersos en sendas soluciones de sacarosa, una al 10% (p/v) durante 30min y luego otra al 20% (p/v) durante toda la noche a 4°C. Este proceso iguala la osmolaridad del tejido a la solución de inclusión, lo que permite una criopreservación más homogénea del tejido. Finalmente, las muestras se incluyen en O.C.T. (Tissue-Tek<sup>®</sup>) y se criopreservan en isopropanol enfriado

mediante nitrógeno líquido. Las muestras se conservan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Se realizan secciones de  $7\mu\text{m}$  de grosor en un criostato CM3050 S (Leica), se recogen con portaobjetos SUPERFROST PLUS (Thermo Fisher Scientific), se secan a temperatura ambiente durante 1min y se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Posteriormente, se realiza la tinción histoquímica *Oil Red*, que permite destacar los lípidos presentes en la muestra. Las secciones criopreservadas son adecuadas para este tipo de tinciones, puesto que permiten la conservación de los lípidos en el tejido. La preparación del colorante y el protocolo de tinción se detallan en el Apéndice 33. Tras la tinción, los portaobjetos se montan con un medio de montaje acuoso, formado por una mezcla de Glicerina:PBS en proporción 1:1.

Todas las imágenes de tinciones histoquímicas se toman mediante un microscopio Eclipse 50i (Nikon) con una cámara DS2-Mv y se procesan por el software NIS-Elements BR3.0 software (Nikon).

## **12.2. Inmunofluorescencia**

### *12.2.1. De tejido*

Todas las tinciones de inmunofluorescencia se realizan sobre secciones criopreservadas (su obtención y procesado ha sido descrito previamente). En el caso de que se realice un desenmascaramiento del epítipo, las secciones se sumergen en tampón citrato 1% pH=6 (Apéndice 34) y se hierven durante 15min en microondas. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente



durante >15min, las secciones se lavan 3 veces en PBS para equilibrar de nuevo su pH.

Los cortes se incuban entonces con una solución de bloqueo [5% FBS y 0,5% (p/v) Triton-X-100 en PBS] durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después del bloqueo, las secciones se incuban toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en solución de bloqueo (Ver Apéndice 36). Tras su incubación, se realizan 3 lavados consecutivos de PBS en agitación durante 3min cada uno y se incuba con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-ratón o anti-conejo) conjugados con los fluorocromos Cy2 o Cy3 (Amersham PA43002-43002; PA43004-42004, respectivamente) durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Entonces las secciones se lavan 3 veces en PBS durante 3min en agitación. En el caso de que se trate de una inmunofluorescencia doble, las secciones se incuban con los anticuerpos primarios anti-DES o anti-PKP2 (Ver Tabla 11 Apéndice 36) durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan 3 veces con PBS durante 3min en agitación y las secciones se incuban con los anticuerpo secundarios correspondientes anti-ratón conjugado a Cy2 (para PKP2) o con alexa fluor 647 anti-cabra (para DES) (Invitrogen; cat: A-21447) 1h a temperatura ambiente. Luego, se incuban con 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI, Sigma-Aldrich; cat: 32670) a una concentración de 5µg/mL durante 10min. Finalmente, tras 4 lavados en PBS durante 3min cada uno, los cortes se montan con el medio de montaje de base acuosa *Fluoromount* (Sigma-Aldrich). Para el visionado y la toma

de fotos de las muestra se usa un microscopio confocal (Nikon A1R).

### 12.2.2. Fluorescencia en células

La detección de la proteína Ruby se realiza mediante fluorescencia de la muestra, sin necesidad del uso de un anticuerpo. Las células se siembran en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos estériles y previamente tratados con la mezcla de *coating* compuesta por gelatina 0,02% y fibronectina 5µg/mL en PBS. Tras la incubación de las células transducidas durante 24h, estas se tratan con DOX (+/-) a una concentración final de 2µg/mL. Las células se incuban durante toda la noche a 37°C, 100% de humedad y CO<sub>2</sub> al 5% para luego retirar el medio de cultivo y lavar las células 3 veces con PBS. Las células se fijan con PFA al 2% en PBS en oscuridad y a 4°C durante 15min. Posteriormente se vuelven a lavar 3 veces con PBS, se incuban con DAPI (Sigma-Aldrich) a 5µg/mL durante 5min y se vuelven a lavar con PBS. Finalmente, las células se montan en un porta objetos mediante el medio de montaje *Fluoromount* (Sigma-Aldrich) y se visualiza en un microscopio Eclipse 50i (Nikon) mediante fluorescencia con un filtro TRTC (para visualizar Ruby) y un filtro 405nm (para visualizar DAPI).

### 12.3. Microscopía electrónica de transmisión

Se inyecta 0,1mL de heparina sódica (5.000U) por vía intraperitoneal 5min antes de la eutanasia. Tras esta, los animales se perfunden a través del ápex del ventrículo izquierdo con PBS a temperatura ambiente durante 5min. Tras la eliminación de la sangre, el animal se fija por perfusión con una



mezcla de Paraformaldehido (PFA) al 2% (Sigma-Aldrich) y Glutaraldehido (GLUT) al 2,5% (Microscopy Science) en Cacodilato sódico 0,1M a pH=7,4 durante 5min. Después, los corazones se diseccionan en la misma solución de fijación, para obtener muestras con un volumen de 1-1,5mm<sup>3</sup>, que se post-fijan durante 4 horas a 4°C en agitación con la mezcla de PFA/GLUT ya descrita. Tras varios lavados en agua destilada, las muestras son entregadas al Servicio de microscopía electrónica de la Universidad de Girona.

Las muestras se post-fijan con tetraóxido de osmio al 1% tamponado con cacodilato sódico 0,1M y pH=7,4 a 4°C durante un periodo de 2-4h, se deshidratan con acetona y se incluyen en resina Epoxy[163]. Las secciones ultrafinas de 60nm se obtienen con un ultramicrotomo MT-XL (RMC). Luego se contrastan con una solución acuosa de acetato de uranilo durante 30min en oscuridad y posteriormente con citrato de plomo durante 10min, lo que permite contrastar la muestra[164]. Finalmente, las observaciones se realizan con un microscopio electrónico de transmisión EM 910 (Zeiss).

### **13. Técnicas Moleculares**

Para las muestras de tejido, los animales fueron inyectados con 0,1mL de heparina sódica intraperitoneal 5min antes de ser sacrificados. Los corazones se perfunden durante 5min con PBS para, seguidamente, congelar el tejido en nitrógeno líquido. Las muestras se conservan a -80°C hasta su uso.

### 13.1. qPCR a tiempo real

#### 13.1.1. Expresión de transcritos

Para la extracción del ARN total de tejido cardíaco se utiliza el kit *RNAeasy mini kit* (Qiagen, cat: 74104), siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Se pesan 30mg del tejido previamente disgregado y se añaden 600µL del tampón de lisis *RLT* con un 10% del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol.

Tras la homogenización de la mezcla por pipeteo, se añaden 600µL de Etanol 70°, se mezcla por volteo y se añade a una columna *RNAeasy spin column*. Luego se centrifuga 1min a 13.000g para favorecer el paso de la mezcla por la columna. De esta manera los ácidos nucleicos quedan retenidos en el filtro. Más tarde, la columna se limpia con 700µL de la solución *RW1*, centrifugando de nuevo 1min a 13.000g. Luego se elimina el ADN genómico de la columna mediante la incubación de DNAasa tipo I durante 15min según el procedimiento descrito en el kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, cat: 79254). Tras dicho tratamiento se lava dos veces la columna con la solución *RW1* como se ha descrito previamente, se añaden 500µL del tampón *RPE* y se centrifuga a 13.000g durante 1min. Tras repetir este paso, el ARN total se eluye añadiendo 30µL de agua libre de ARNasas y centrifugando 2min a 13.000g. La cuantificación de ARN se realiza mediante absorbancia a 260nm y su pureza midiendo el ratio  $A_{260}/A_{280}$ , en el instrumento NanoDrop® (Thermo Scientific). Los valores cercanos a 2 se consideran óptimos en este caso.





Para la retro-transcripción del ARN a cDNA se usa el kit *Quantitect Reverse Transcription* (Qiagen, cat: 205311). Para ello se añaden 2 $\mu$ L de *gDNA Wipeout 7x*, 500ng de ARN total, y agua libre de RNasa hasta alcanzar un volumen total de 14 $\mu$ L por reacción. Esta mezcla se incuba a 42°C durante 2min, tras el cual se mantiene en hielo hasta el siguiente paso. Para cada reacción de retro-transcripción se realiza una mezcla con los siguientes componentes: 1 $\mu$ L de *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 4 $\mu$ L de *Quantiscript RT Buffer* y 1 $\mu$ L de *RT Primer Mix*. Posteriormente, los 6 $\mu$ L de la mezcla anterior se añaden a los 14 $\mu$ L de muestra de ARN, y todo ello se incuba a 42°C durante 15min para la síntesis del cDNA. Finalmente, la muestra se incuba a 95°C durante 3min para inhibir la enzima transcriptasa reversa y el resultado de la retro-transcripción se conserva a -20°C hasta su uso.

Para la realización de las qPCR *real time* se siguen las recomendaciones del producto *KAPA SYBR FAST qPCR* (KAPA Biosystems; cat: KK4602). Para cada reacción se mezclan: 7,5 $\mu$ L de *SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)*, 3 $\mu$ L de una dilución 1:10 del cDNA obtenido en el paso anterior, 0,3 $\mu$ L de una solución de los correspondientes cebadores sentido y antisentido 10mM y agua miliQ (Millipore) hasta alcanzar un volumen final de 15 $\mu$ L. Para cada gen y muestra se hacen triplicados. Previamente a la adición de los reactivos, se hacen dos mezclas o mixes diferentes: cDNA en agua miliQ y, por otro lado, *SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)* junto con los cebadores antes de la mezcla final en el pocillo. Se usaron cebadores específicos para la detección del transgén *Pkp2*

truncado (sentido: 5'-TGCCTAGCGAGGCCAGACTGAGACT-3' y antisentido: 5'-TGTCTGCCCACGAAGTCGTTTTTC-3'), *Pkp2* endógena (sentido: 5'-TGCCTAGCGAGGCCAGACTGA-3'; antisentido: 5'-TGTCTGCCCACGAAGTCGTTT-3') y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) (sentido: 3'-TTGATGGCAACAATCTCCAC-5'; antisentido: 3'-CGTCCCGTAGACAAAATGGT-5'). *Gapdh* se utilizó como normalizador de la expresión o del inglés *housekeeping*.

Para la reacción de amplificación y detección se utiliza el siguiente protocolo: 95°C 2min → [95°C 3s → 60°C 20s] x40 → 40°C 30s. La adquisición de fluorescencia se recoge al final del paso a 60°C para cada ciclo. La reacción de PCR y la adquisición de fluorescencia se realiza en el aparato *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf). Las medias de los Ct de las 3 réplicas obtenidas se analizan por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 13.1.2. Identificación de animales homocigotos

Tras el corte de 0,5cm de cola, esta fue disgregada mediante la incubación con 500µL de una solución de lisis, compuesta por proteinasa K a una concentración de 100µg/mL (Roche; cat: 03 115 887 001), diluida en el tampón Tris-HCl 100mM pH=8,5, EDTA 5mM a pH=8, SDS al 2% y NaCl 200mM durante toda la noche a 55°C. Tras la disgregación del tejido, los tubos se agitan por volteo durante 5min y se centrifugan 5min a 13.000rpm y temperatura ambiente. El sobrenadante se añade por decantación sobre 500µL de fenol pH=8. Los tubos se agitan enérgicamente durante 10min y se centrifugan a 13.000rpm durante 5min a temperatura ambiente. Se recogen ~400µL de



sobrenadante con cuidado de no aspirar la interfase, se añaden sobre 400 $\mu$ L de isopropanol y se agita por volteo durante 5min. Se centrifugan de nuevo durante 5min a 13.000rpm y temperatura ambiente, para luego retirar el sobrenadante. Después se añaden 500 $\mu$ L de Etanol 70°, se agitan por volteo durante 5min, se centrifugan durante 5min a 13.000rpm y se aspira su sobrenadante. Este proceso de lavado del pellet se realiza 3 veces y en todo momento a temperatura ambiente. Tras el tercer lavado se aspira el sobrenadante y los tubos se dejan secar durante 2min. Finalmente, el ADN se resuspende en 200 $\mu$ L de tampón TE y los tubos se incuban durante 10-15min a 55°C o toda la noche a 4°C. Se centrifugan a 13.000rpm durante 1min y se conservan a 4°C hasta su uso.

Una vez realizada la extracción y purificación, se realiza una cuantificación del ADN mediante fluorescencia en el instrumento Qubiq (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Para la realización de la qPCR a tiempo real se utiliza el mismo protocolo con algunas modificaciones mediante el producto *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)* (KAPA Biosystems; cat: KK4602). Para cada reacción se mezclan: 7,5 $\mu$ L de *SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)*, 10ng del ADN extraído, 0,3 $\mu$ L de una solución de los correspondientes cebadores sentido y antisentido a 10mM y agua miliQ (Millipore) hasta un volumen final de 15 $\mu$ L. Se utilizan los cebadores específicos para la amplificación de PKP2 truncada. De cada una de las PCR se realizan 3 réplicas. El protocolo de amplificación del ADN fue: 95°C 2min → [95°C 3s → 60°C 20s] x40 → 40°C 30s. La reacción de PCR a tiempo real se realiza en el aparato *Mastercycler ep realplex*

(Eppendorf). Las medias de los Ct de las 3 réplicas obtenidas se utilizan para comparar con los Ct de otros animales previamente genotipados.

## **13.2. Western blot**

### *13.2.1. Células*

Las distintas líneas HL-1 se siembran en placas de 6 pocillos y se tratan con o sin DOX a 2µg/mL durante al menos 48h. Cuando las células alcanzan un 100% de confluencia se lisan con 250µL de una solución compuesta por M-PER (Thermo Scientific, cat: 78501) e inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Indianapolis, Indiana). Tras 5min en agitación en la placa, la superficie de cada pocillo se rasca y se recoge el lisado, para luego incubarla en hielo durante 15min. Luego se centrifuga a 16.000g a 4°C durante 15min y se recoge el sobrenadante. Para la cuantificación de proteínas se usa el kit *Pierce™ BCA protein assay kit* (ThermoFisher Scientific) según el apartado 37 de los apéndices. Se utiliza el lector de placas *Microplate Reader Benchmark Plus* (BIO-RAD) para la medir la absorbancia.

Para la electroforesis de proteínas se utilizan geles SDS-PAGE con un 10% de acrilamida. La composición del gel y las soluciones se describen en el Apéndice 36. Se mezclan 30µg de proteínas con el tampón de carga (Apéndice 36) y se calienta a 70°C durante 10min. Luego, las proteínas se cargan en el gel y se corre durante 30min a 45V y luego a 100-120V durante 90min. Tras la separación de las proteínas por tamaño, el gel se



lava en la solución de transferencia (ver Apéndice 36) durante 3min en agitación. Se utiliza una membrana de PVDF para realizar la transferencia de proteínas por el método “tipo sándwich”. La membrana se incuba con metanol durante 5min para su activación y luego con la solución de la transferencia otros 5min. Tras ello se monta la transferencia usando una esponja y un filtro de papel Whatman por cada lado del sándwich y en el centro se coloca el gel en contacto con la membrana de PVDF. Tras añadir el tampón de transferencia hasta cubrir por completo el sándwich, las proteínas se transfirieren a un voltaje de 90V durante 2-4 horas a temperatura ambiente, o bien, a 35V durante toda la noche a 4°C.

La membrana se lava en 0,1% (p/v) de Tween20<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) diluido en PBS pH=7,4 durante 3min y se bloquea en leche desnatada al 5% en dicho tampón durante 60min en agitación y a temperatura ambiente. Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas, la membrana se incuba durante toda la noche a 4°C y agitación con los anticuerpos anti- $\alpha$ 1 sodio/potasio ATPasa o anti-T2a diluidos en bloqueo a las concentraciones descritas en el Apéndice 35. Después se realizan 3 lavados con Tween20<sup>®</sup> (p/v) 0,1% en PBS y agitación durante 10min cada uno. Luego se incuba con el anticuerpo correspondiente anti-ratón o anti-conejo conjugado con la enzima peroxisada (HRP del inglés *Horseradish Peroxidase*; ThermoFisher Scientific) a una dilución 1:5.000 durante 1h a temperatura ambiente y agitación. Se vuelve a lavar la membrana 2 veces con Tween20<sup>®</sup> 0,1% (p/v) en PBS y una última con PBS sin el detergente. Por último se incuba con el

revelador *ECLPierce* (ThermoFisher Scientific) durante 3min y se revela la membrana con papel fotográfico en cámara oscura.

### 13.2.2. De tejido

Se pesan 30mg de tejido y se añade 1mL de solución de lisis M-PER (Thermo Scientific, cat:78501) con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Indianapolis, Indiana). Tras una homogenización de la solución mediante un triturador de tejidos manual o *dauncer*, el tubo se incuba a 4°C durante 15min y se centrifuga a 16.000g a 4°C durante 15min. La concentración de proteínas se cuantifica entonces usando el kit *Pierce™ BCA protein assay kit* (ThermoFisher Scientific) como se ha descrito previamente para las células.

Para realizar la electroforesis de proteínas se usan geles SDS-PAGE con una concentración diferente de acrilamida (Apéndice 36). En el caso de DSP, Na<sub>v</sub>1.5 y α-MHC se usó una concentración del 7% mientras que para DES, PKP2 endógena, β-CAT, PG, GAPDH, DSC2, CX43 y T2a se utilizaron geles al 12%. Además, se cargaron diferentes cantidades de proteína en cada caso: 10μg para GAPDH, DES, CX43, α-MHC y T2a; 30μg para detectar PKP2 endógena, β-CAT, PG y DSC2; y 60μg para DSP y Na<sub>v</sub>1.5. Tras la mezcla con el tampón de carga (ver Apéndice 36) se calienta a 70°C durante 10min. La electroforesis y la posterior transferencia se realizan bajo las mismas condiciones descritas para el *western blot* en células.

Después de realizar la transferencia, la membrana se lava en 0,1% (p/v) de Tween20® (Sigma-Aldrich) diluido en PBS pH=7,4 durante 3min y se bloquea en leche desnatada al 5% en dicho



tampón durante 60min en agitación y a temperatura ambiente. Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas, la membrana se incuba durante toda la noche a 4°C y agitación con los anticuerpos primarios descritos en el Apéndice 35. Después se realizan 3 lavados con Tween20<sup>®</sup> (p/v) 0,1% en PBS y agitación durante 10min cada uno. Luego se incuba con el anticuerpo correspondiente anti-ratón o anti-conejo conjugado con la enzima peroxisada (HRP del inglés *Horseradish Peroxidase*; Thermo Scientific) a una dilución 1:5.000 durante 1h a temperatura ambiente y agitación. Se vuelve a lavar la membrana 2 veces con Tween20<sup>®</sup> 0,1% (p/v) en PBS y una última con PBS sin el detergente. Por último, se incuba con el revelador *ECL Pierce* (ThermoFisher Scientific) durante 3min y se revela la membrana con papel fotográfico en cámara oscura.

### **13.3. Semi-cuantificación de las bandas**

Para la semi-cuantificación del contenido de cada proteína en el tejido se realiza un ajuste por densitometría mediante el software Image J 1.48o (NIH, Bethesda, USA). El procesado de cada banda del gel en el software muestra un gráfico donde se representa el pico de densitometría correspondiente a la banda de interés. Tras medir el área de dicho pico se obtienen los valores brutos para cada proteína y animal. Se realiza una medición del control de carga GAPDH para cada muestra, el cual permite normalizar los valores de densitometría de cada proteína para cada caso. Siempre dentro de cada membrana, los datos se promedian con el resto de muestras de cada grupo (WT, TG-M o TG-A) y se comparan con los valores del grupo WT. Finalmente, los valores obtenidos para cada gel se

promedian con los obtenidos para otros geles. Dos membranas se utilizaron para la semi-cuantificación de cada una de las proteínas analizadas.

### **13.4. Separación de las fracciones proteicas cardíacas**

Para la extracción y separación de las fracciones proteicas nucleares, citosólicas y de membrana se siguen las instrucciones del kit *Compartmental protein extraction* (Millipore, cat: 2145). Cada corazón, procedente de las cepas control *wild type* o de cada una de las líneas transgénicas, se disgrega en 600 $\mu$ L de una solución compuesta por HEPES pH=7,9, MgCl<sub>2</sub>, KCl, EDTA, sacarosa, ortovanadato sódico y una mezcla de inhibidores de proteasas a 4°C. Tras la completa homogenización del tejido en un *dauncer*, la mezcla se incuba durante 20min a 4°C y agitación suave. Luego se centrifuga a 18.000g y 4°C durante 20min y más tarde el sobrenadante se extrae y se conserva a -80°C hasta su uso. En este sobrenadante se encuentra la fracción de proteínas citosólicas. En el pellet se encuentran las fracciones de proteínas nucleares y de membrana.

Para purificar estas fracciones y eliminar el resto de proteínas citosólicas de la muestra, se añaden 1,2mL de tampón compuesto por HEPES pH=7,9, MgCl<sub>2</sub>, KCl, EDTA, sacarosa, ortovanadato sódico y una mezcla de inhibidores de proteasas y se agita suavemente durante 5min a 4°C. Luego se centrifuga a 18.000g y 4°C durante 20min y se descarta el sobrenadante. Tras este paso de purificación se añaden 300 $\mu$ L de un tampón





compuesto por HEPES (pH 7,9),  $MgCl_2$ , NaCl, EDTA, glicerol, ortovanadato sódico y una mezcla de inhibidores de proteasas y se agita suavemente a 4°C durante 20min. Después se centrifuga a 18.000g a 4°C durante 20min y se recoge el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas nucleares.

Al pellet restante se le añaden 300µL de tampón HEPES (pH 7,9),  $MgCl_2$ , KCl, EDTA, sacarosa, glicerol, desoxicolato sódico, NP-40, ortovanadato sódico y una mezcla de inhibidores de proteasas, se resuspende el pellet y se agita suavemente a 4°C durante 20min. Tras centrifugar a 18.000g a 4°C durante 20min, se recoge el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas de membrana.

Para realizar el *western blot* de estas fracciones se sigue el mismo procedimiento que para los extractos totales de proteína.

#### **14. Análisis estadísticos**

Todos los datos se muestran como Media±EEM (Error estándar de la media o en inglés *SEM*). El EEM se calcula de la siguiente forma:

$$EEM = DE/\sqrt{n}$$

Donde *DE* es la desviación estándar y *n* el número de datos para cada media.

Se realizan pruebas de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y el gráfico Q-Q. En el caso de que los datos sigan una distribución normal de los datos se realizan los siguientes estadísticos: la comparación entre dos grupos se realiza

mediante el estadístico *t*-Student desapareado. El test de ANOVA de un factor se utiliza para la comparación entre más de dos grupos (por ej. WT, TG-B, TG-M y TG-A), mientras que el test de ANOVA de dos factores se usa para la comparación de dos condiciones (Edad/Genotipo o Entrenamiento/Genotipo). En ambos casos se utiliza el test de Bonferroni para la comparación por pares. Cuando se observó interacción entre las variables tras el análisis ANOVA de dos factores, se realizaron comparaciones múltiples mediante el test de Bonferroni.

En el caso de que las variables no sigan una distribución normal, se utiliza el método no paramétrico de Kruskal-Wallis y posterior *post hoc* de Dunnet para la comparación por pares.

Para las variables categóricas (inducibilidad de arritmias), se realiza una comparación de la tendencia entre los grupos. El estadístico de Cochran's & Mantel-Haenszel de asociación lineal por lineal fue utilizado para determinar una tendencia entre la recurrencia de arritmias y el aumento de transgén en las líneas animales.

Todos los datos fueron inicialmente procesados mediante el software Microsoft Excel<sup>®</sup> 2010 (Microsoft Office). Los estadísticos fueron realizados mediante los softwares GraphPad Prism v5.03 (GraphPad Software, Inc.) y SPSS v20.0 (IBM, Inc., Chicago III). Todos los gráficos fueron realizados en el software GraphPad Prism v5.03.





## **IV. Resultados**

---





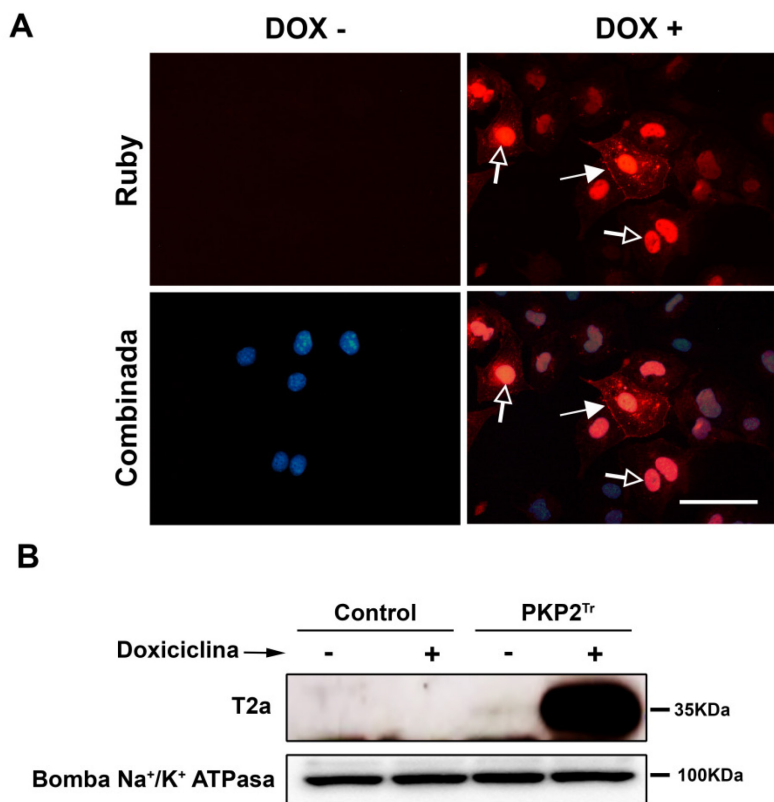
## **16. Comprobación del modelo celular y animal**

### **16.1. Expresión y detección de PKP2 truncada en el modelo celular**

El primer análisis sobre la construcción diseñada se realizó en células HL-1, introduciendo el inserto de manera estable en las células. Tras la selección de los clones resistentes a puromicina, se activó la expresión del transgén mediante la adición del antibiótico doxiciclina (DOX) al medio y se analizó su expresión (Figura 18).

En ausencia de DOX, el promotor Tet-ON se encuentra reprimido, lo que resultó en la ausencia de fluorescencia de la proteína Ruby en las células. Por el contrario, al añadir DOX al medio se detectó fluorescencia en las células, demostrando así la eficiencia en la regulación del promotor (Figura 18A). Ruby se concentraba en el núcleo de las células, y con una señal menos intensa, en el límite celular, asociada a la membrana citoplasmática (flecha, Figura 18A).

Para la detección de PKP2 truncada mediante su etiqueta T2a, se realizó un *western blot* de las líneas control (sin inserto) y transducidas con la construcción (Figura 18B). La expresión del transgén se limitaba al grupo tratado con DOX, donde se observó una banda intensa. Por otro lado, el grupo no tratado con DOX mostró una banda muy débil, comprobando así que la represión del promotor Tet-ON en este modelo es muy fuerte pero no total (Figura 18B).



**Figura 18. Expresión de la construcción PKP2<sup>Tr</sup>-T2a-Ruby en células HL-1. A)** Imágenes de fluorescencia para la detección de la proteína Ruby en células infectadas con la construcción y cultivadas en medio con y sin doxiciclina. Abajo se muestra la superposición con DAPI para la co-localización de los núcleos con Ruby. Las flechas indican la acumulación de Ruby en la membrana plasmática. Las flechas huecas indican la acumulación nuclear de PKP2 truncada. **B)** Expresión de la proteína PKP2 truncada (PKP2<sup>Tr</sup>) en cultivo celular. DOX - = ausencia de doxiciclina en el cultivo. DOX + = presencia de doxiciclina en cultivo. Barra= 20µm.

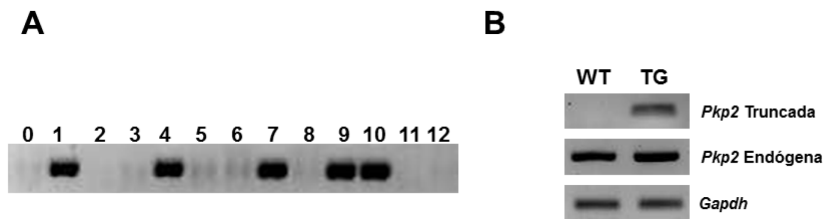
## 16.2. Identificación de animales transgénicos

Para la detección de los animales transgénicos se genotipó una secuencia del inserto de *Pkp2* truncada a partir del ADN aislado de cola de ratón. En la Figura 19 se observa un ejemplo del





resultado de estos genotipados. La presencia de una banda de 120pb determinaba que el espécimen era transgénico, mientras que su ausencia indicaba que se trataba de un animal silvestre. En este ejemplo, los animales 0, 2, 3, 5, 6, 8, 11 y 12 eran silvestres o *wild type* (WT) mientras que los animales 1, 4, 7, 9 y 10 eran transgénicos (TG) (Figura 19A). Aproximadamente la mitad de los animales analizados correspondían a ratones WT, mientras que la otra mitad correspondía a animales TG.



**Figura 19. Comprobación del transgén en el modelo animal.** A) Genotipado de animales mediante la detección por PCR de la presencia del inserto en el ADN de cola de ratón. Banda: 120pb. B) Análisis de la expresión de transcrito para *Pkp2* truncada en corazón. Obsérvese la especificidad de los cebadores la detección de *Pkp2* truncada.

El análisis de la expresión del transcrito de *Pkp2* truncada se realizó sobre ARN total obtenido de tejido cardíaco. Como resultado de la RT-PCR, se observó la ausencia de transcrito en los animales WT y su presencia en animales TG (Figura 19B). Como controles de la especificidad de los cebadores y la correcta extracción y amplificación del ARN, se usaron cebadores específicos para *Pkp2* endógena (secuencia nativa, presente en todos los animales) y *Gapdh*. Los resultados se correspondían con los genotipados obtenidos mediante PCR

convencional a partir del ADN procedente de la cola ( $n > 20$  por grupo).

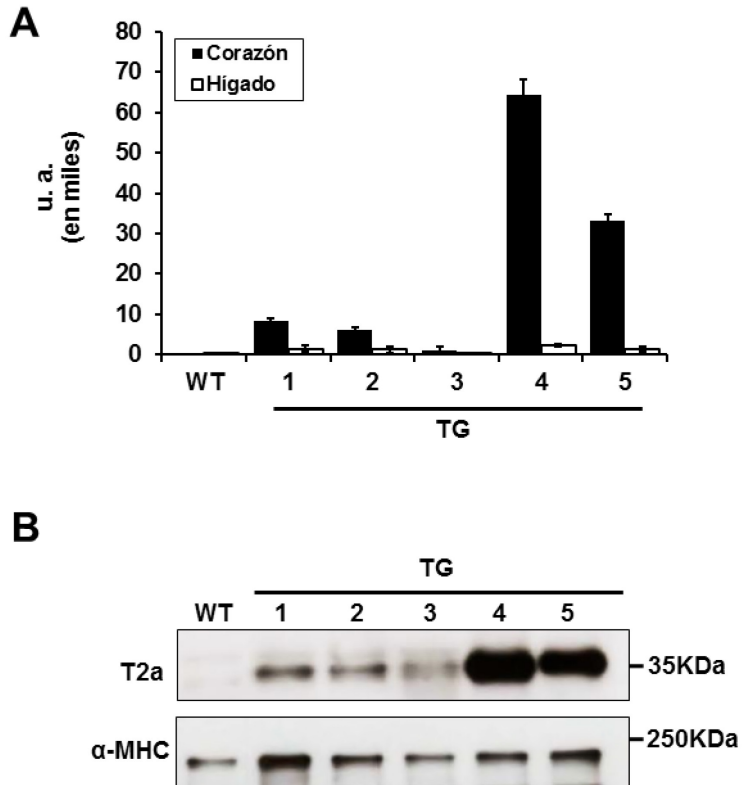
### **16.3. Cuantificación del transcrito**

La cuantificación se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real sobre el cADN obtenido tras la retro-transcripción. Además de tejido cardíaco, se utilizó tejido hepático para conocer la especificidad de la expresión del transcrito en cada línea.

La cuantificación mostró una alta variabilidad entre las diferentes líneas transgénicas (Figura 20A). En tejido cardíaco, la línea transgénica 3 mostraba el menor contenido relativo de transcrito [ $1.165 \pm 720,3$  unidades arbitrarias (u.a.)], mientras que las líneas 1 y 2 mostraban niveles similares entre ellas y mayores a la línea 3 ( $8.349 \pm 626$  u.a. y  $6.165 \pm 518,3$  u.a., respectivamente). Por el contrario, las líneas 4 y 5 expresaban una cantidad de transcrito muy superior al resto de líneas ( $64.300 \pm 4.015$  u.a. y  $33.300 \pm 1.426$  u.a., respectivamente). El análisis de la expresión en tejido hepático mostró niveles de expresión bajos para todas las líneas (Línea 1:  $1.476 \pm 799,4$  u.a.; Línea 2:  $1.279 \pm 738$  u.a.; Línea 3:  $475 \pm 5,25$  u.a.; Línea 4:  $2.341 \pm 212$  u.a.; Línea 5:  $1.300 \pm 587$  u.a.). Sin embargo, se encontró una alta variabilidad en la proporción de transcrito entre hígado/corazón en cada línea. Para las líneas 3, 2 y 1 se obtuvieron porcentajes altos de transcrito en hígado en comparación con los obtenidos en corazón (40,7%, 20,74% y 17,67% de la expresión en hígado comparada con la de corazón, respectivamente). Por el contrario, las líneas 4 y 5 mostraron una mayor especificidad de



tejido, con unos ratios muy bajos de expresión en hígado cuando se compararon con la de corazón (3,64% y 3,9%, respectivamente). Para este análisis se usó tejido de 3 animales por línea.



**Figura 20. Estudio del nivel de expresión de PKP2 truncada en las diferentes líneas transgénicas. A)** Resultado de la cantidad de transcrito en corazón (barras negras) e hígado (barras blancas) para cada línea. La expresión fue normalizada mediante el contenido del transcrito del gen *Gapdh* para cada tejido. Datos relativizados con el control WT. u.a.= unidades arbitrarias. **B)** Expresión de la proteína PKP2 truncada (mediante la etiqueta T2a) en las distintas líneas transgénicas.

#### 16.4. Detección de la proteína transgénica

Finalmente, se realizó un análisis de la expresión de proteína transgénica en las diferentes líneas. De este modo, también se contrastarían los resultados obtenidos en la qPCR a tiempo real para cada línea transgénica. De forma análoga a dichos resultados, se observó que la señal de proteína transgénica era muy diferente para cada línea (Figura 20B), mostrando un patrón de expresión similar entre ellas. Las líneas 4 y 5 mostraban una alta expresión de proteína, mientras que la expresión era baja para las líneas 1, 2 y 3 (Figura 20B).

A partir de estos resultados se concluyó que tanto los niveles de expresión como su especificidad de tejido eran óptimos para las líneas 4 y 5. Por tanto, se descartaron las líneas 1, 2 y 3 del estudio. Desde este momento todos los estudios se realizaron usando especímenes de las líneas transgénicas 4 y 5.

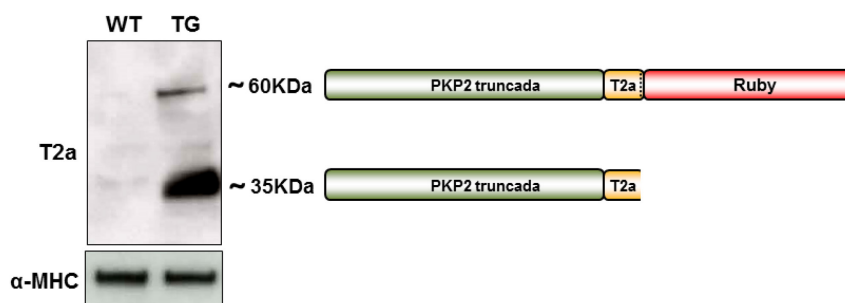


Figura 21. Eficiencia del auto-procesamiento del péptido T2a en corazones de animales transgénicos (TG).

Por otro lado, se analizaron los niveles de proteína auto-procesada y no auto-procesada en el tejido. Como se muestra en la Figura 21, se detectó una señal intensa en las muestras de



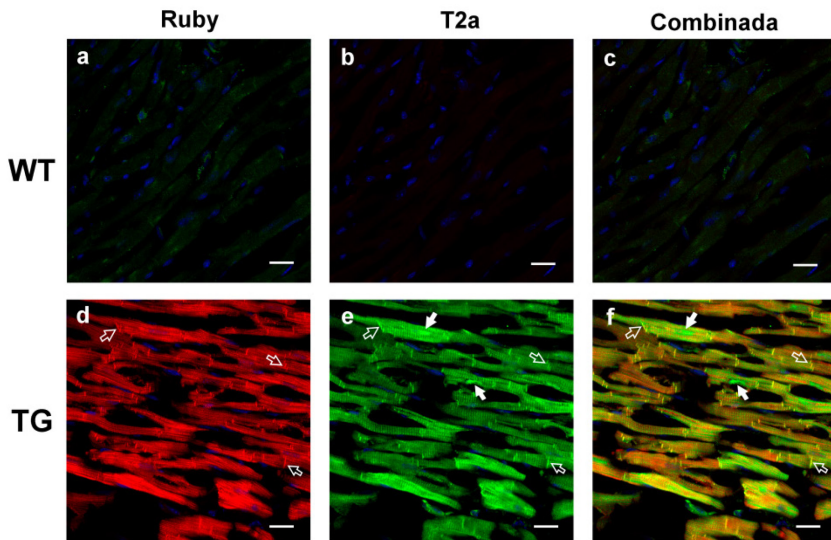
corazones de animales transgénicos, correspondiente a un peso molecular de 35kDa. Este es el tamaño de proteína esperado tras el auto-procesamiento del péptido T2a. También se observó una banda de intensidad débil con un peso molecular entorno a 60KDa. En este caso, el tamaño coincide con el peso molecular estimado para la construcción sin procesar (incluyendo a la proteína Ruby de fusión). En los animales WT no se observó ninguna de ambas bandas (Figura 21).

### **16.5. Localización de la proteína**

Además de la detección de los niveles de proteína, se realizó el estudio de su localización y distribución dentro del tejido. Para los animales WT se observó la auto-fluorescencia natural del tejido de manera muy tenue (Figura 22a-c). Sin embargo, con las mismas condiciones microscópicas, el miocardio de animales transgénicos mostraba una alta señal de fluorescencia (Figura 22d-f). La fluorescencia emitida por la proteína Ruby era apreciable por todo el citoplasma de los cardiomiocitos y, con mayor intensidad, en los discos intercalares (flechas huecas en Figura 22d).

La detección de la proteína PKP2 truncada se realizó mediante la inmuno-detección del péptido T2a, la cual se encuentra fusionada a dicha proteína. En la Figura 22e se observa que la señal se hace patente en los cardiomiocitos. La proteína se localiza en el citoplasma de los cardiomiocitos y, con mayor intensidad, acumulado en los discos intercalares (flechas huecas en Figura 22d-f). La superposición de los canales para la detección de Ruby y T2a muestra una co-localización de ambas

proteínas (en amarillo intenso en Figura 22f). Sin embargo, se observa una acumulación importante de PKP2 truncada en el núcleo de algunos cardiomiocitos, que no se observa cuando destacamos Ruby en el tejido (flechas en Figura 22f). Todos los animales TG analizados mostraban una localización de Ruby y PKP2 truncada similar a la descrita (n>5). Tampoco se observaron diferencias apreciables entre las líneas 4 y 5 en estos aspectos. Por último, la señal era similar en VD, VI y SIV.



**Figura 22. Localización de la proteína transgénica en tejido.** En rojo se muestra la fluorescencia de la proteína Ruby. En verde se observa la tinción por inmunofluorescencia del péptido T2a. Los núcleos se tiñen en azul (DAPI). Obsérvese la diferencia de fluorescencia entre TG y WT para ambos los canales. Las flechas señalan acumulaciones de proteína PKP2 truncada en el interior de algunos núcleos. Las flechas huecas destacan la acumulación de Ruby y PKP2 truncada en los discos intercalares. Barra=50µm.



## 16.6. Comprobación del modelo doble transgénico

Para desarrollar una línea transgénica que exprese mayor cantidad de PKP2 truncada se cruzaron ratones de la línea 4 entre sí y de la línea 5 entre sí (Figura 15). Como resultado, en la línea  $F_1$  se obtuvieron animales sin transgén (WT), transgénicos heterocigotos y transgénicos homocigotos (Figura 15). El análisis por qPCR a tiempo real mostró diferentes umbrales para los ciclos de amplificación del ADN en cada animal (**Ct** del inglés *cycle threshold*). En la Figura 23 se muestra un ejemplo del resultado obtenido tras la amplificación del ADN en 18 animales de la generación  $F_1$  (Figura 15). Junto a los especímenes de genotipo desconocido, se introdujeron muestras de animales parentales genotipados previamente mediante PCR convencional (flechas en Figura 23).

Los animales WT presentaron valores de Ct elevados (ciclo 35-36) mientras que animales TG mostraron valores muy inferiores (Ct ~20). Para cada línea, los animales transgénicos identificados (aquellos con valores de Ct <30) mostraban dos Ct distintos, diferenciados por ~1 ciclo. Los de Ct más alto correspondían a los transgénicos heterocigotos, mientras que los Ct más bajos correspondían a los homocigotos (Figura 23). Cuando se compararon las líneas 4 y 5 entre sí, se observaron Ct más altos en la línea 5, indicando un menor número de copias del inserto en esta línea (Figura 23). Estos resultados están en concordancia con los niveles de proteína obtenidos para la línea 5 y 4 (Figura 20).

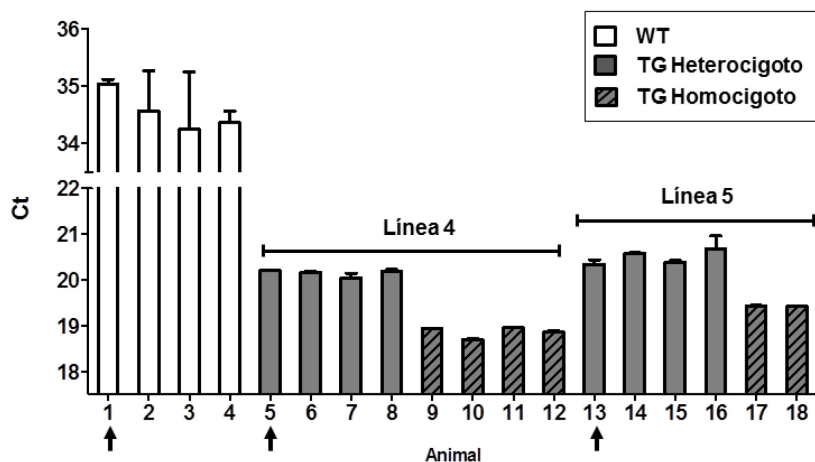
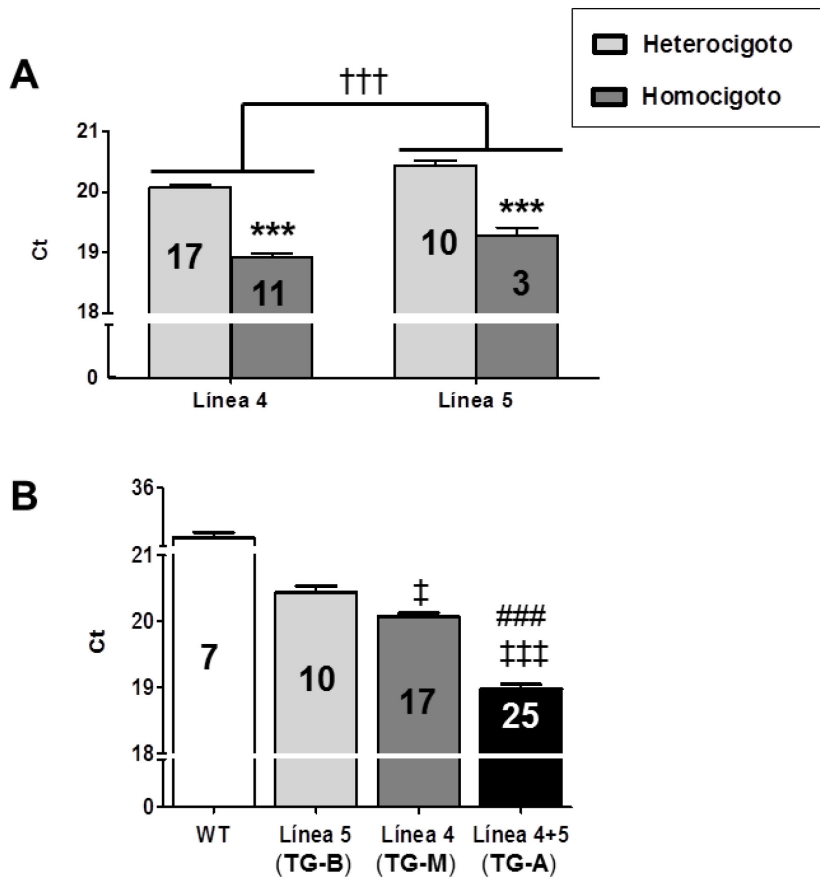


Figura 23. Ejemplo del resultado obtenido tras una *real time* qPCR para la identificación de animales transgénicos heterocigotos y homocigotos mediante el contenido de ADN. Las flechas indican los controles usados para cada línea y genotipados previamente mediante PCR convencional. Ct= Ciclos de PCR necesarios para incrementar la fluorescencia de la muestra por encima del umbral de detección.

Para comprobar la fiabilidad del método de identificación de homocigotos para cada línea, se realizaron promedios de los distintos grupos (Figura 24A). Se observaron valores de Ct significativamente inferiores en los grupos homocigotos comparados con los heterocigotos de cada línea (Línea 4:  $20,07 \pm 0,05$  vs  $18,93 \pm 0,06$ ,  $p < 0,001$ ; línea 5:  $20,44 \pm 0,09$  vs  $19,28 \pm 0,13$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente). Estas diferencias eran próximas a 1 ciclo, lo que indica una doble dosis en los animales homocigotos (Figura 24A). Además, el Ct de los animales de la línea 4 eran significativamente menores comparados con la línea 5 ( $p < 0,001$ ). De esta manera se confirmó la especificidad de la técnica utilizada para la identificación de los animales homocigotos.





**Figura 24. Promedios de los Ct para cada genotipo y línea. A)** Promedio del Ct para los grupos transgénicos obtenidos en la generación F<sub>1</sub>. Obsérvense las diferencias significativas entre todos los grupos. \*\*\*=p<0,001 comparado con el grupo heterocigoto para cada grupo; †††=p<0,001 comparando las líneas 4 y 5. Se usó el estadístico ANOVA de dos factores para la comparación entre las líneas 4 y 5. El post-test de Bonferroni se usó para la comparación entre grupos. **B)** Valores promedios del Ct para cada una de las líneas heterocigotas (Líneas 4 y 5) y doble heterocigota (Línea 4+5). ‡=p<0,05, †††=p<0,001 comparado con la Línea 5; ###=p<0,001 comparado con la Línea 4. Se usó el estadístico ANOVA de un factor y posterior post-test de Bonferroni para la comparación entre grupos. Dentro de cada barra se indica el número de animales analizados para cada grupo.

Se realizaron análisis a los 49 animales obtenidos en la generación  $F_1$ , de los cuales 7 eran WT (14,28%), 27 eran TG heterocigotos (55,1%) y 20 TG homocigotos (40,8%). Esto suponía la obtención de un porcentaje similar a lo esperado para animales TG heterocigotos (~50%), una inferior proporción de animales WT a lo esperado (~25%) y una mayor proporción de animales TG homocigotos de lo esperado (~25%).

Los ratones TG homocigotos resultantes del cruce ( $F_1$ ) fueron cruzados entre sí para obtener ratones heterocigotos para ambos *loci* ( $F_2$ ) (Figura 15). Tras el análisis del contenido de transgén, todos los animales de la generación  $F_2$  (Línea 4+5; n=25) presentaban valores de Ct menores que los animales de las líneas 4 y 5 (Ct=18,97±0,2; p<0,001, comparado con ambas líneas) (Figura 24B). Además, mediante genotipado convencional por PCR se determinó que el 100% de los ratones obtenidos en esta generación eran transgénicos (n=71).

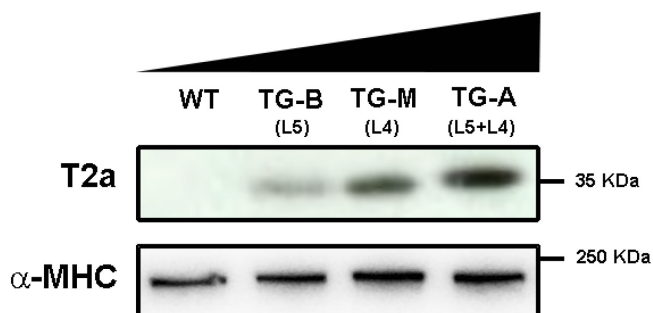


Figura 25. Expresión de proteína transgénica en corazones de las distintas líneas desarrolladas. Obsérvese la gradación en la intensidad de señal para cada línea.



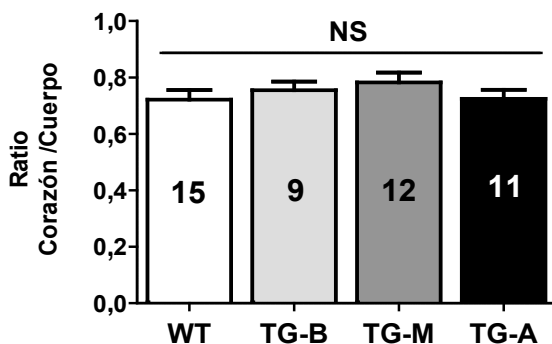
Finalmente, la cantidad de transgén en las tres líneas transgénicas fue confirmada mediante *western blot* (Figura 25). Como resultado, se obtuvo una gradación de proteína transgénica en cada grupo. Se estableció la línea 5 como línea transgénica de expresión baja (**TG-B**), la línea 4 de expresión media (**TG-M**) y al resultado del cruce entre las líneas 5 y 4, de expresión alta (**TG-A**) (Figura 25).

## **17. Anatomía e histología del corazón**

### **17.1. Animales sedentarios**

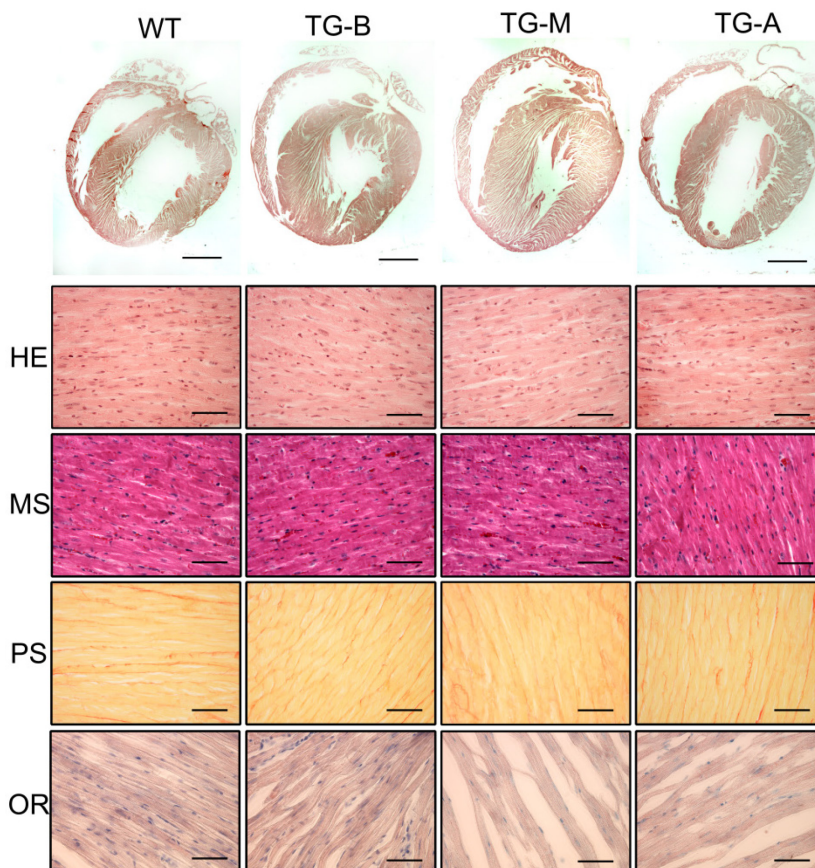
Inicialmente, se analizó el peso relativo del corazón en cada línea mediante el ratio Peso Corazón/Peso Cuerpo en animales de 7 meses de edad (Figura 26). El estudio no mostró diferencias significativas entre las líneas (WT=0,721±0,034; TG-B=0,755±0,031; TG-M=0,782±0,031; TG-A=0,724±0,032; p=0,523), así como ninguna tendencia con el aumento del contenido de transgén (Figura 26).

Para el análisis de la anatomía e histología del corazón se escogieron animales de una edad de 10 meses (38-42 semanas de edad). Número de animales: WT=16, TG-B=15, TG-M=8 y TG-A=11.



**Figura 26. Resultado del análisis del ratio Peso Corazón/Peso Cuerpo en animales de 7 meses de edad.** Los valores se calcularon mediante la siguiente fórmula: (mg de corazón/g de cuerpo)·1000. NS=diferencias no significativas. Los valores de las barras indican el número de animales por grupo. Se realizó un ANOVA de un factor para la comparación entre grupos.

A nivel anatómico, el tamaño y forma de los ventrículos, las orejuelas auriculares y las dimensiones del corazón eran normales para todos los grupos (Figura 27). El análisis microscópico se realizó sobre cortes seriados y teñidos con diferentes colorantes específicos. Las muestras teñidas con los colorantes hematoxilina-eosina (HE) y tricómico de Masson (MS) mostraron una morfología normal del tejido. Tampoco se observaron zonas enriquecidas en matriz extracelular o infiltraciones celulares de algún tipo (MS y HE en Figura 27). La tinción de Picrosirio (PS) no destacaba una mayor presencia de fibras de colágeno, ni tampoco un remplazo del tejido cardíaco por tejido fibroso. Finalmente la tinción con Oil-O-red (OR) no mostró acumulaciones de lípidos en el interior del miocardio (PS y OR en Figura 27).



**Figura 27. Análisis histológico de corazones de animales transgénicos sedentarios.** Arriba se observa un corte longitudinal macroscópico del corazón. Abajo se muestra el resultado de las diferentes tinciones histoquímicas realizadas. No se observan diferencias. **HE:** hematoxilina-eosina; **MS:** Tricrómico de Masson; **PS:** Picrosirio (tinción de colágeno, destacado en rojo); **OR:** Oil-O-Red (tinción de grasas, destacado en rojo). Barra en fotos macroscópicas: 2mm. Barra en microfotografías: 50 $\mu$ m.

## 17.2. Efecto del entrenamiento

Los animales entrenados y sus controles sedentarios fueron examinados a una edad aproximada de 7 meses (24-30 semanas de edad). Como cabía esperar, el peso de los ratones

entrenados (n=36) fue creciendo de manera más moderada que la de los sedentarios (n=28) durante el ejercicio (Figura 28). En la última semana se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas (Sedentarios:  $35,86 \pm 1,37g$ ; Entrenados:  $32,04 \pm 1,13g$ ,  $p=0,037$ ). Sin embargo, cuando se compararon los pesos de animales WT, TG-B y TG-M para los grupos sedentario y entrenado al final del experimento, no se observaron dichas diferencias (Sedentarios: WT:  $36,01 \pm 1,43g$ , TG-B:  $31,97 \pm 2,3g$ ; TG-M:  $32,66 \pm 2,3g$  y Corredores: WT:  $33,06 \pm 2,83g$ , TG-B:  $31,53 \pm 1,25g$ ; TG-M:  $30,97 \pm 1,82g$ ; ANOVA de dos factores;  $p=0,301$ ).

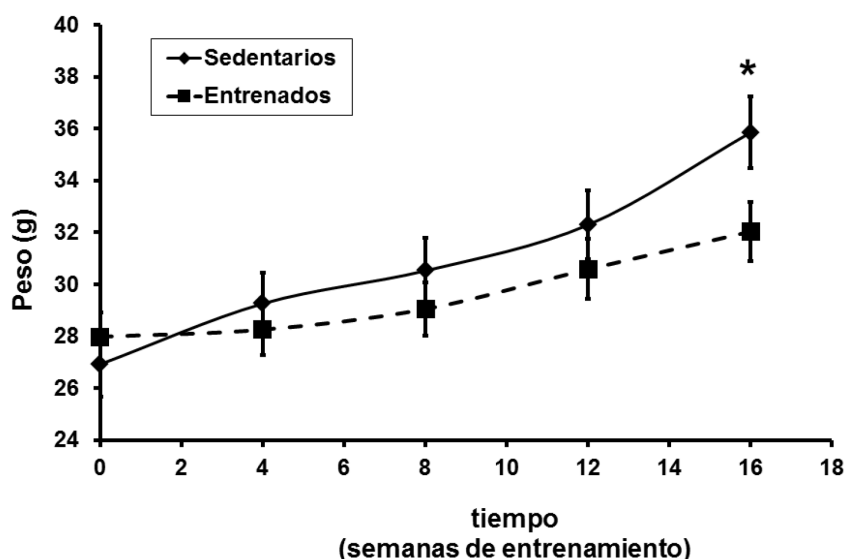
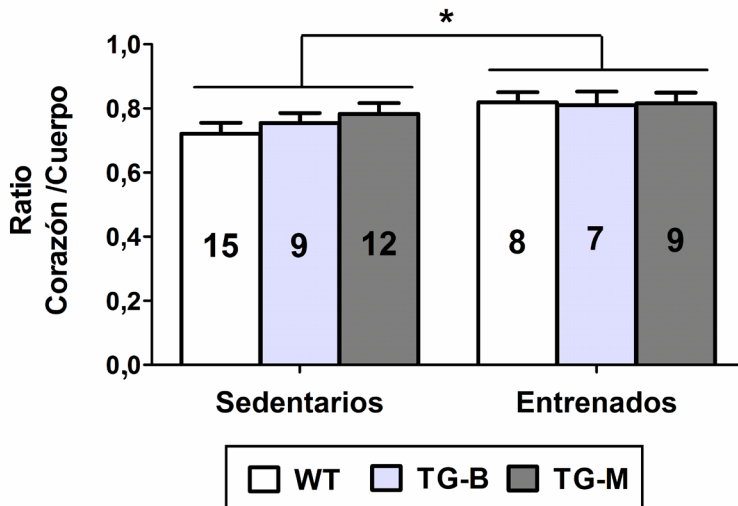


Figura 28. Evolución del peso de animales sedentarios y entrenados durante el periodo de ejercicio intensivo. \*=  $p < 0,05$ . Comparativa realizada mediante el estadístico *t* de Student.

En la Figura 29 se muestra el resultado del ratio peso del corazón/peso del cuerpo. Mediante este parámetro se demostró

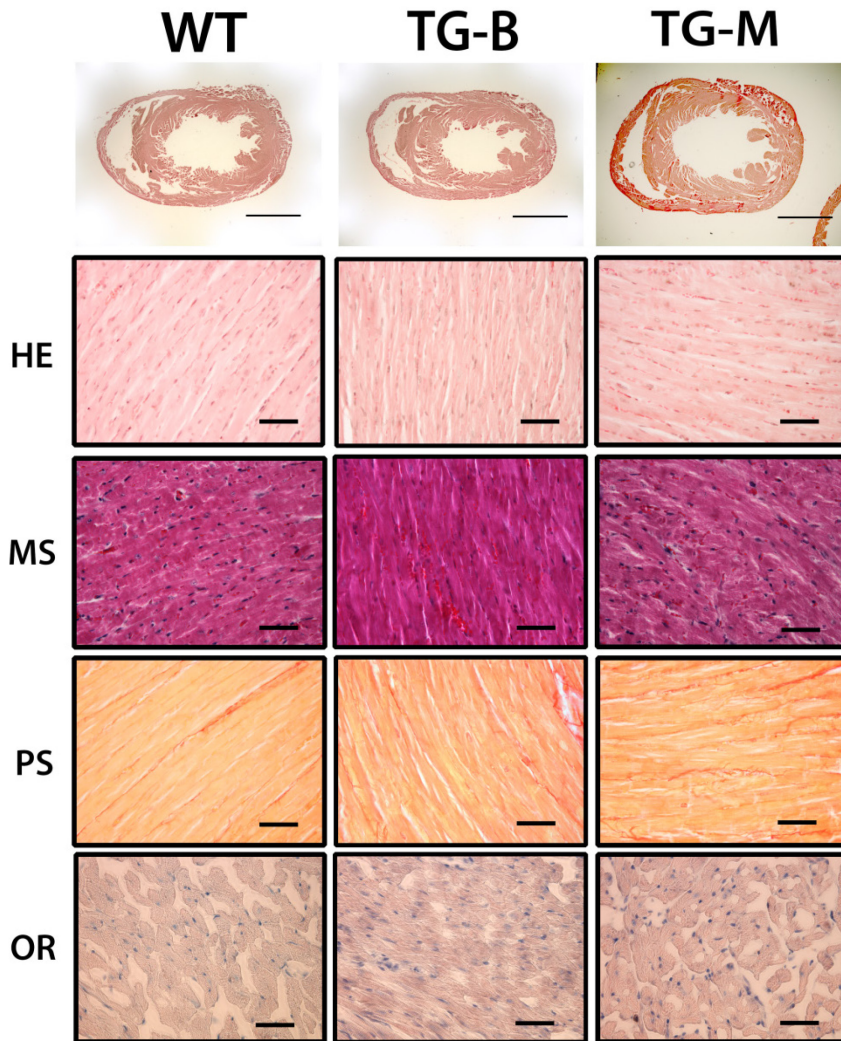


la hipertrofia en los corazones de animales corredores comparado con los sedentarios ( $p=0,021$ ). No se encontraron diferencias entre animales entrenados de diferente genotipo.



**Figura 29. Medida de hipertrofia cardíaca en animales entrenados.** Los valores se calcularon mediante la siguiente fórmula: (mg de corazón/g de cuerpo)·1000. Los valores de las barras indican el número de animales por grupo.  $*=p<0,05$ ; Se realizó ANOVA de dos factores para la comparación entre grupos.

La exploración macroscópica mostró un aspecto normal de los corazones para todos grupos [sedentarios: WT ( $n=15$ ), TG-B ( $n=9$ ), TG-M ( $n=12$ ); corredores: WT ( $n=8$ ); TG-B ( $n=7$ ); TG-M ( $n=9$ )] (Figura 30). Posteriormente, algunos especímenes del grupo corredor para cada genotipo fueron examinados por histología [WT ( $n=9$ ), TG-B ( $n=4$ ), TG-M ( $n=7$ )]. La histomorfología general del tejido en animales corredores era normal (HE y MS en Figura 30). Del mismo modo, el análisis de la presencia de fibrosis y lípidos mostraba un aspecto similar entre los grupos (PS y OR en Figura 30).



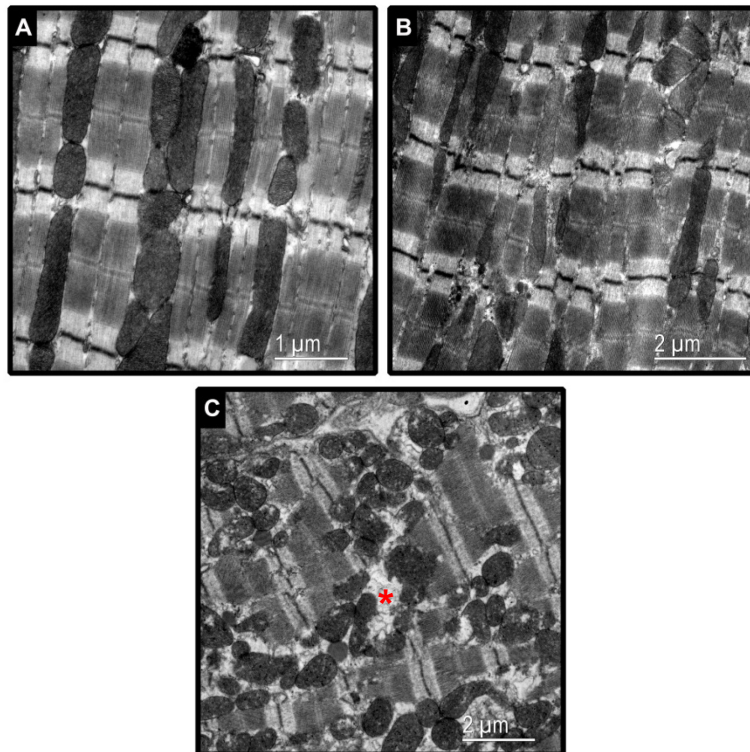
**Figura 30. Análisis histológico de corazones de animales entrenados.** Arriba se observa un corte transversal del corazón para cada grupo. Abajo se muestra el resultado de las diferentes tinciones histoquímicas realizadas. No se observan diferencias. **HE:** hematoxilina-eosina; **MS:** Tricrómico de Masson; **PS:** Picrosirio (tinción de colágeno, destacado en rojo); **OR:** Oil-O-Red (tinción de grasas, destacado en rojo). Barra en fotos macroscópicas: 2mm. Barra en microfotografías: 50 $\mu$ m.





### 17.3. Análisis ultra-estructural del tejido cardíaco

Para este estudio se analizaron animales de los grupos TG-M y TG-A ancianos (12 meses de edad) y se compararon con animales WT de la misma edad (n=3 por grupo).



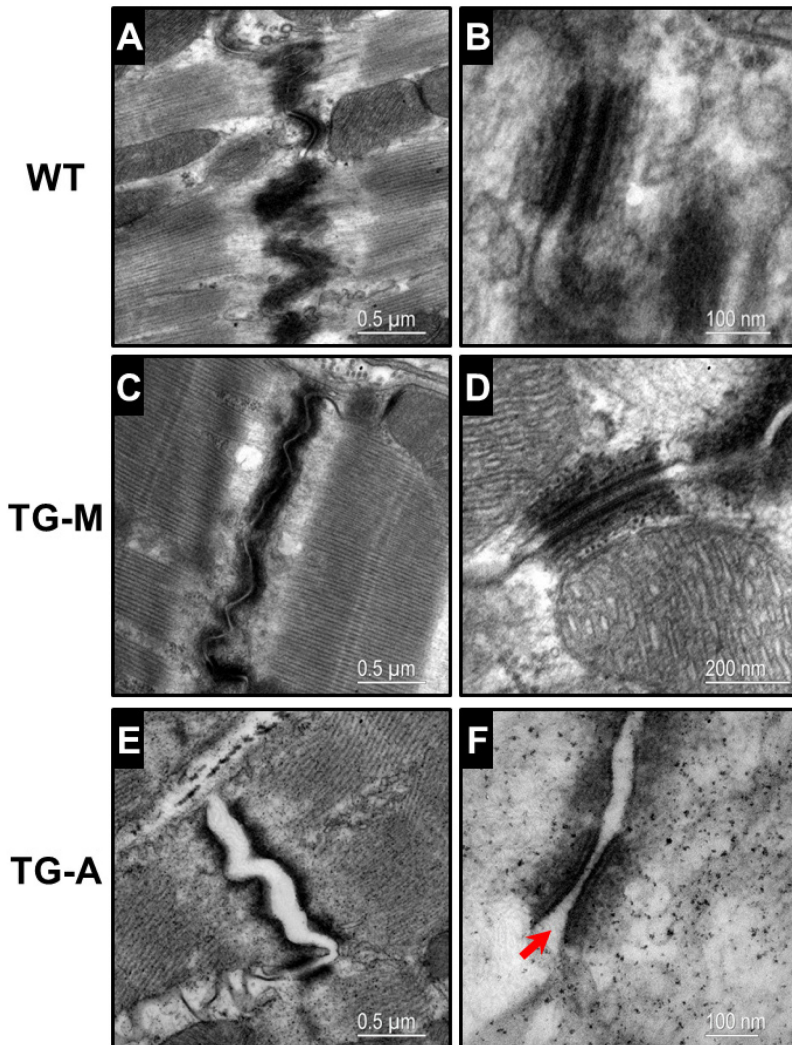
**Figura 31. Microscopía electrónica de transmisión mostrando la organización de los orgánulos en el interior de los cardiomiocitos.** Citoplasma de cardiomiocitos perteneciente al grupo WT (A), al grupo TG-M (B) y al grupo TG-A (C). El bandeo corresponde a diferentes zonas de las estructuras sarcoméricas. Las estructuras electrodensas redondeadas corresponden a mitocondrias. Se observan zonas poco electrodensas asociadas a las acumulaciones de mitocondrias (asterisco).

La organización intracelular de los cardiomiocitos WT presentaba mitocondrias distribuidas en hilera y paralelas a

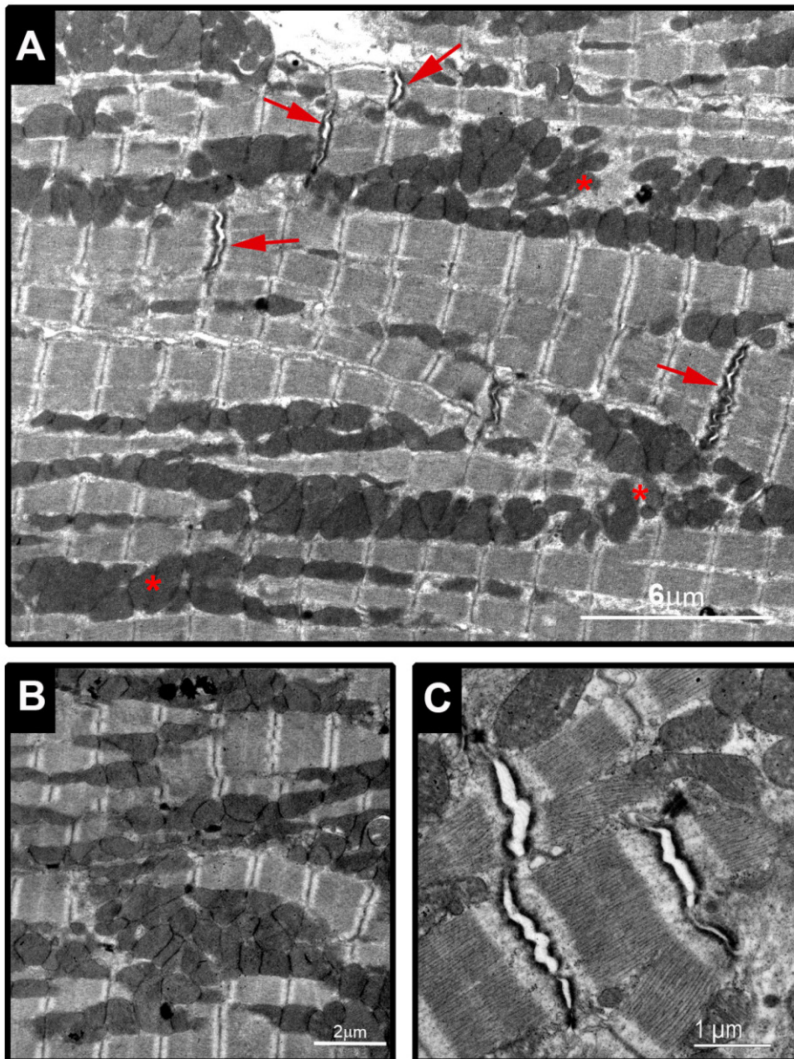
estructuras sarcoméricas encadenadas (Figura 31A). Esta organización era similar en los animales de la línea TG-M analizados (Figura 31B). Sin embargo, en el grupo TG-A se observaba una desorganización intracelular, con grandes acúmulos de mitocondrias y zonas poco electrodensas asociadas a estas regiones (asterisco en Figura 31). Los sarcómeros encadenados muestran disrupciones provocadas por estas concentraciones de orgánulos, aunque no se evidenciaron pérdidas en la integridad de dichas estructuras (Figura 31).

El análisis detallado de los discos intercalares de los animales TG-M, mostró una densidad electrónica y una estructura similar a la de animales WT (Figura 32A y C). Por otro lado, muchos de los discos intercalares analizados en el grupo TG-A mostraban rupturas (Figura 32E), sugiriendo una pérdida de adhesión de los discos.

En los animales control WT se podían identificar las distintas capas que componen el desmosoma (Figura 32B). La misma densidad electrónica y número de capas eran visibles en animales del grupo TG-M (Figura 32D). Aunque en el grupo TG-M no se evidenció una reducción en el número de estructuras desmosomales, fue difícil encontrar dichas estructuras en animales del grupo TG-A. Los desmosomas hallados en este grupo mostraban una densidad electrónica menor, donde era difícil reconocer las diferentes capas (Figura 32F). Además, el contacto entre ambas caras de la estructura era también reducido, con roturas en algunas zonas (flecha en Figura 32F).



**Figura 32. Estructuras de adhesión celular en los cardiomiocitos. (A, C y E)** Discos intercalares de los cardiomiocitos. Se observan zonas electrodensas asociadas a la membrana citoplasmática e invaginaciones de la misma a lo largo de la estructura. La separación de ambas caras del disco intercalar era evidente en el grupo TG-A. **(B, D y F)** Desmosomas para cada grupo. Diferentes capas se identifican en los desmosomas de los grupos WT y TG-M, mientras dichas capas son difícilmente identificables en el grupo TG-A. La flecha indica la separación de parte del desmosoma.



**Figura 33. Características ultra-estructurales del tejido cardíaco en animales TG-A.**  
A) Estructura general del tejido, mostrando la acumulación de mitocondrias y otros orgánulos (Asteriscos), y las múltiples roturas de los discos intercalares (Flechas). B) Ampliación de los acúmulos de mitocondrias. C) Zoom de varios discos intercalares separados.

En la Figura 33 se muestra un resumen de resultados encontrados en el grupo TG-A. Se observó una desorganización



de los orgánulos, con acumulaciones de mitocondrias en el citoplasma (Figura 33A y B). Además se observaron rupturas de los discos intercalares, las cuales eran muy frecuentes en el tejido (Figura 33A y C).

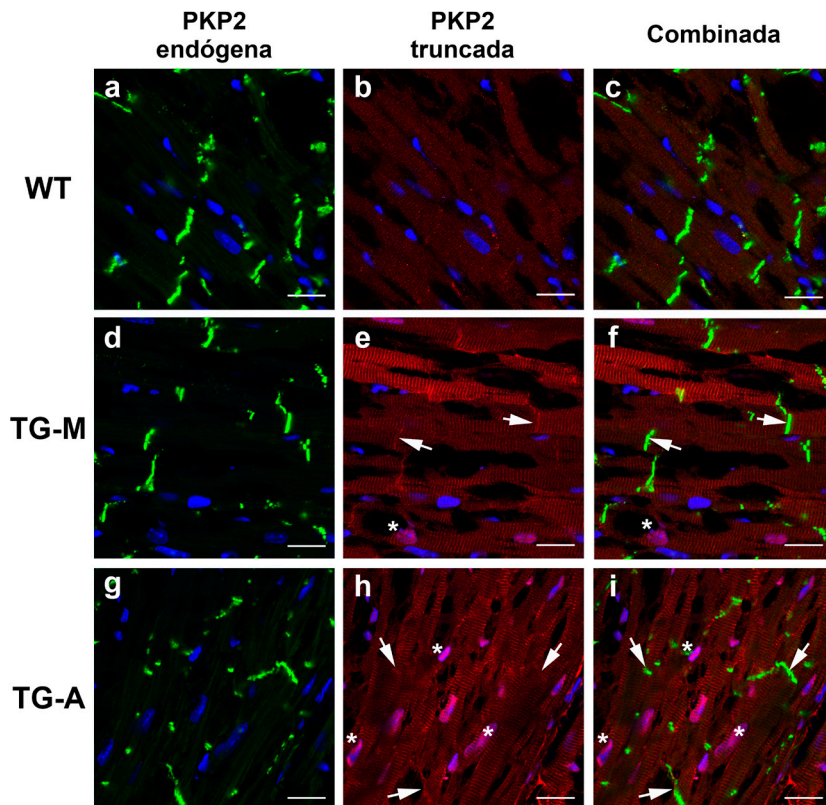
### **18. Distribución de PKP2 truncada vs endógena**

Como ha sido ampliamente sugerido, la presencia de proteínas mutadas puede ejercer un efecto dominante-negativo sobre el alelo nativo[88, 165]. Por tanto, en este apartado se quiso determinar la influencia de PKP2 truncada sobre la localización y distribución de PKP2 endógena (proteína nativa) dentro del tejido cardíaco. Para ello se realizó una inmunofluorescencia doble de ambas versiones de la proteína. Se utilizaron animales TG-M (n=3) y TG-A (n=4) adultos (7 meses) y se compararon con animales WT de la misma edad (n=3).

PKP2 endógena mostraba una señal intensa en el disco intercalar, mientras que se observaba una señal más débil en la superficie lateral de los cardiomiocitos (Figura 34a). Esta distribución de PKP2 endógena era similar en las tres líneas analizadas y en VD, VI y SIV (Figura 34a, d, g).

En el caso de PKP2 truncada, la intensidad de la señal aumenta desde las muestras WT, donde se aprecia la auto-fluorescencia del tejido cardíaco, hasta el animal TG-A, donde la señal se hace más patente (Figura 34b, e, h). La señal de PKP2 truncada se observa de manera difusa en el citoplasma de los cardiomiocitos de las líneas transgénicas. Por otro lado, se detectó una acumulación de esta proteína en el disco intercalar

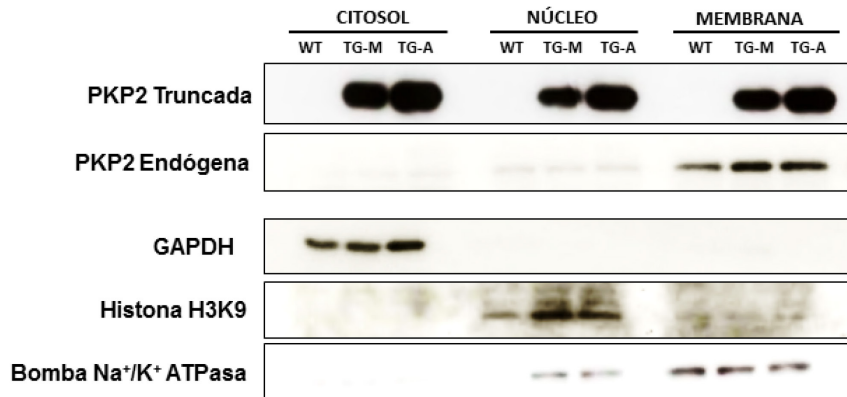
(Flechas) y también en el núcleo de los cardiomiocitos (Asteriscos; Figura 34e-f, h-i). Mientras que la señal en los núcleos de los TG-M era apreciable solo en algunos cardiomiocitos, para ratones TG-A la señal se observaba en todos los núcleos de este tipo celular (Figura 34e, d).



**Figura 34. Localización comparada de proteínas PKP2 en cardiomiocitos.** Tinción por inmunofluorescencia para la detección de PKP2 endógena (verde) y PKP2 truncada (rojo). Se utilizaron anticuerpos específicos contra la región C´terminal de la proteína, en el caso de PKP2 endógena, y contra la proteína de fusión T2a, para el reconocimiento de PKP2 truncada. Barra: 20µm.



Comparando ambos canales, se aprecia la co-localización de ambas proteínas en los discos intercalares (Fechas; Figura 34), mientras que la señal nuclear y citoplasmática es exclusiva de PKP2 truncada (Figura 34h-i).



**Figura 35. Fraccionamiento de proteínas.** Se muestra la distribución de PKP2 truncada y endógena en las diferentes fracciones sub-celulares. Se usaron controles de carga para la fracción citosólica (GADPH), nuclear (histona H3K9) y de membrana (bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa).

Para corroborar esta distribución de PKP2 endógena y truncada en el tejido, se realizaron aislamientos de proteínas citosólicas, nucleares y de membrana (Figura 35). Como resultado, se observó que PKP2 endógena se acumula en la fracción de membrana (Figura 35). Asimismo, las fracciones nucleares y citosólicas presentaban poca o nula presencia de PKP2 endógena (Figura 35). No se observaron diferencias entre las diferentes líneas transgénicas.

En cuanto a la distribución de PKP2 truncada, esta se acumula en las tres fracciones proteicas, aunque es especialmente

abundante en la fracción citosólica (Figura 35). Además, tal y como se esperaba, se observa una mayor cantidad de PKP2 truncada en las fracciones procedentes de la línea TG-A (Figura 35).

### **19. Estudio de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -cat**

Los resultados histológicos obtenidos demuestran que no existe remplazo de tejido fibro-adiposo en las diferentes líneas transgénicas. Ello sugiere que no existe un alteración de la vía Wnt/ $\beta$ -cat en el modelo. Además, la presencia de PKP2 truncada nuclear podría indicar una modulación de esta ruta en el tejido, como ya ha sido sugerido previamente[100]. Para testar estas hipótesis, se realizó un ensayo luciferasa sobre el modelo celular, herramienta que ha sido utilizada previamente para este tipo celular[107].

Los ensayos Luciferasa/*Renilla* mostraron una actividad normal para la línea control tratada con DOX. Tanto el grupo tratado con DOX como el no tratado, mostraron una actividad similar a los controles (Figura 36), lo que demuestra que la actividad de la vía Wnt/ $\beta$ -cat no está alterada en este modelo.



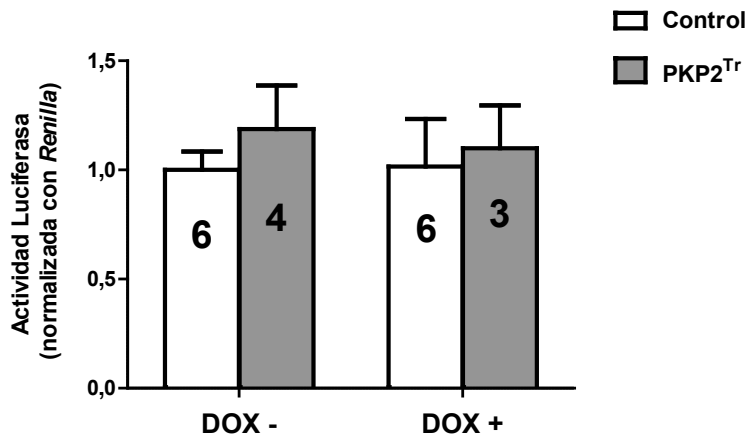


Figura 36. Niveles de activación de la vía Wnt/ $\beta$ -cat en células HL1 infectadas con el transgén para PKP2<sup>Tr</sup>. Los valores dentro de las barras indican el número de réplicas para cada grupo. No se observaron diferencias significativas.

## 20. Cambios estructurales y funcionales en animales transgénicos

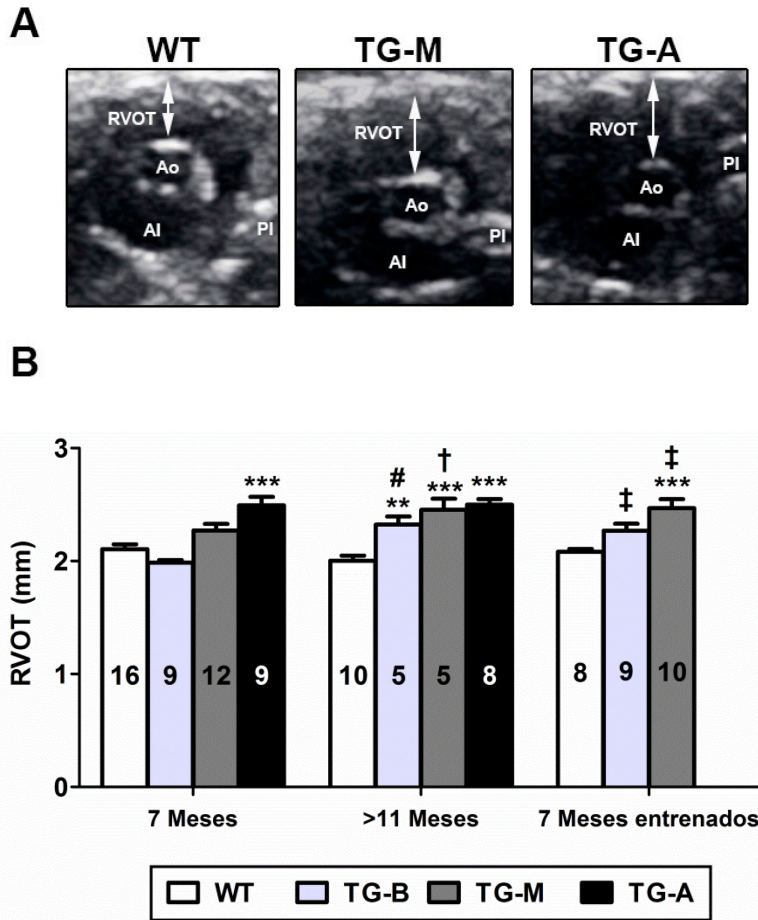
A pesar de no encontrar un remodelado del tejido cardíaco, sí se identificaron anomalías ultra-estructurales en el modelo, tales como separaciones de los discos intercalares o reducción de desmosomas. Esto puede repercutir en la estructura y función cardíaca, lo que justificó un análisis ecocardiográfico de los animales. Además, como uno de los objetivos fundamentales de esta tesis, se analizaron 3 grupos experimentales diferentes: animales sedentarios de 7 meses (26-30 semanas), animales ancianos >11 meses (50-56 semanas de edad) y animales corredores de 7 meses de edad. A continuación se analizan los resultados obtenidos para el VD y VI. Los datos se detallan en las Tablas 3 y 6.

### **20.1. Cambios en el ventrículo derecho**

El parámetro RVOT describe el grado de dilatación del VD a la altura de su tracto de salida, el cual es un criterio muy importante en el diagnóstico de la MCA (Tabla 1). En el grupo de 7 meses sedentario se observó un aumento del diámetro del RVOT en relación al contenido de PKP2 truncada en el tejido (Figura 37A). Dichas diferencias solo eran significativas en animales TG-A (Figura 37B).

Los animales ancianos (>11 meses) mostraban un RVOT mayor en los grupos TG-B y TG-M comparado con el grupo WT (Figura 37B). Además, estos grupos presentaban un diámetro del RVOT mayor que sus respectivos grupos de 7 meses, lo que indica la progresiva dilatación del VD con la edad. Por contra, los animales TG-A ancianos mostraron un diámetro similar a su respectivo grupo de 7 meses (Figura 37B; Tabla 3).

Los grupos transgénicos de 7 meses entrenados mostraban un mayor diámetro del RVOT que el grupo WT, aunque tales diferencias solo se acumulaban en la línea TG-M (Figura 37B). Además, ambas líneas transgénicas sufrieron un aumento del RVOT comparado con sus respectivos grupos sedentarios de la misma edad (Figura 37B; Tabla 4).



**Figura 37. Dilatación del VD a nivel del RVOT. A)** Imágenes representativas de una visión paraesternal eje corto a la altura de la raíz aórtica en animales adultos (7 meses sedentarios). RVOT: tracto de salida del ventrículo derecho; Ao: Aorta; AI: aurícula izquierda; PI: salida de la arteria pulmonar. **B)** Medidas del RVOT para cada grupo del estudio. \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$  comparado con animales WT para cada grupo. †= $p < 0,05$ ; ‡= $p < 0,01$ ; #= $p < 0,001$  comparado con su respectivo grupo de 7 meses de edad sedentario. Valores en las barras: número de animales por grupo.

Los resultados y cálculos estadísticos para el resto de parámetros ecocardiográficos del VD se resumen en la Tabla 3 (7 y >11 meses sedentarios) y Tabla 4 (7 meses entrenados). En

concordancia con los datos graficados para el RVOT, el RVDd y RVAd revelaron un incremento en las dimensiones del VD para los grupos transgénicos de 7 meses sedentarios. Además, el aumento de diámetro y área del VD era aún mayor en animales ancianos (>11 meses) para los diferentes grupos transgénicos (Tabla 3).

Para los grupos corredores se observó también un aumento de las dimensiones del VD en animales transgénicos (Tabla 4). Estas dimensiones eran mayores comparadas con las obtenidas para los mismos grupos sedentarios (Por ejemplo, RVAd en animales TG-M entrenados vs sedentarios:  $5,001 \pm 0,203$  vs  $4,23 \pm 0,1$ ;  $p=0,002$ , respectivamente; Tabla 4). Ello demuestra el efecto de la edad y el ejercicio en la dilatación del VD en este modelo.

Por otro lado, la dilatación de VD se reflejó en una peor función del ventrículo. Tanto la contratibilidad, medida a través del TAPSE, como el flujo, a través de los parámetros Acc, TP y TP/ET, muestran una peor función cardíaca en los grupos sedentarios. Además, este efecto era mayor en los grupos de >11 meses que en los de 7 meses para algunos de estos parámetros (Tabla 3). En cuanto a los grupos corredores, la dilatación no se reflejó en una peor contractibilidad del VD (TAPSE), mientras que el ejercicio sí alteraba su función (Tabla 4), efecto ampliamente descrito en estudios clínicos[166, 167] y animales[157, 158].



	7 meses				>11 meses				ANOVA dos factores	
	WT	TG-B	TG-M	TG-A	WT	TG-B	TG-M	TG-A	p valor (Edad)	p valor (Genotipo)
<b>Nº Animales</b> (♂/♀)	16 (10/6)	9 (4/5)	12 (6/6)	9 (4/5)	10 (3/7)	5 (2/3)	5 (1/4)	8 (4/4)	---	---
<b>RVOT (mm)</b>	2,11±0,04	1,99±0,02	2,27±0,06	2,49±0,07 <sup>‡</sup>	2±0,04	2,32±0,07 <sup>†</sup>	2,45±0,1 <sup>‡</sup>	2,5±0,05 <sup>‡</sup>	INT	INT
<b>RVDd (mm)</b>	1,51±0,04	1,46±0,04	1,49±0,42	1,69±0,03 <sup>†</sup>	1,29±0,03	1,57±0,04 <sup>†</sup>	1,5±0,07*	1,7±0,05 <sup>‡</sup>	INT	INT
<b>RVAd (mm<sup>2</sup>)</b>	3,85±0,15	4,19±0,2 <sup>†</sup>	4,23±0,1*	5,03±0,14 <sup>‡</sup>	4,17±0,2	5,29±0,16 <sup>†</sup>	5,19±0,32*	5,74±0,22 <sup>‡</sup>	<0,001	<0,001
<b>TAPSE (mm)</b>	1,06±0,01	1,03±0,02	0,98±0,03	0,86±0,01 <sup>‡</sup>	1,06±0,01	0,87±0,07 <sup>‡</sup>	0,94±0,02*	0,78±0,03 <sup>‡</sup>	INT	INT
<b>Acc (mm/s<sup>2</sup>)</b>	55,48±2,92	48,19±4,95	45,85±2,39	31,72±1,21 <sup>†</sup>	50,17±4,16	36,08±2,96	42,9±9,43	38,8±2,08 <sup>†</sup>	0,496	0,008
<b>TP (ms)</b>	15±0,77	16,33±0,62	15,44±0,44	18,33±0,55 <sup>†</sup>	15,62±0,86	16,2±0,49	16,8±0,58	16,87±0,61 <sup>†</sup>	0,850	0,011
<b>TP/ET</b>	0,26±0,01	0,28±0,01	0,28±0,01	0,34±0,01 <sup>‡</sup>	0,27±0,01	0,29±0,01	0,29±0,01	0,31±0,01 <sup>‡</sup>	0,603	0,002

**Tabla 2. Resumen de las medidas ecocardiográficas para el VD de los grupos sedentarios de 7 y 12 meses de edad.** El resultado del análisis de la varianza para los factores “Edad” y “Genotipo” se muestran a la derecha. El test de Bonferroni fue usado para la comparación por pares de los grupos para cada edad. \*= $p < 0,05$ ; <sup>†</sup>= $p < 0,01$ ; <sup>‡</sup>= $p < 0,001$  comparado con el grupo WT para cada edad. INT=Interacción de los factores. RVOT= *RV outflow tract*; RVDd= *RV end-diastolic Diameter parasternal axis*; RVAd= *RV end-diastolic Area parasternal axis*; TAPSE= *Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*; Acc= *myocardial Acceleration during isovolumic contraction*; TP= *Time to Peak*; ET= *Ejection Time*.

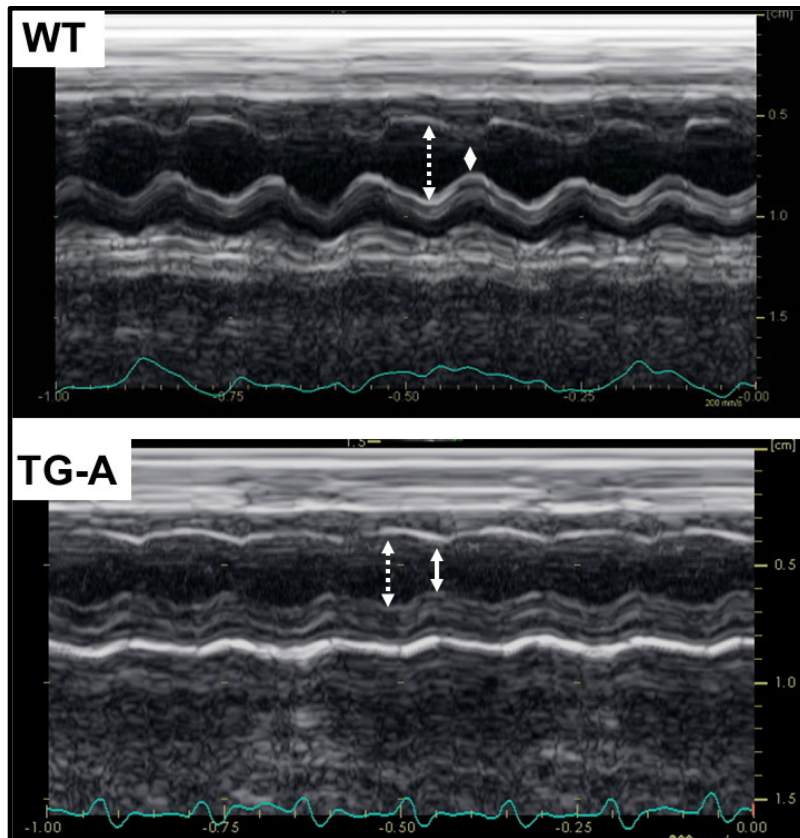
	7 meses Entrenados			ANOVA dos factores	
	WT	TG-B	TG-M	p (Entrenamiento)	p (Genotipo)
<b>Animales</b> (♂/♀)	8 (4/4)	9 (4/5)	10 (5/5)	---	---
<b>RVOT (mm)</b>	2,08±0,02	2,27±0,06	2,47±0,08 <sup>‡</sup>	INT	INT
<b>RVDd (mm)</b>	1,48±0,04	1,61±0,04	1,7±0,05 <sup>†</sup>	INT	INT
<b>RVAd (mm<sup>2</sup>)</b>	3,98±0,16	5,29±0,31 <sup>†</sup>	5±0,2 <sup>†</sup>	0,001	0,001
<b>TAPSE (mm)</b>	1,01±0,01	0,97±0,07	1,02±0,02	0,458	0,639
<b>Acc (mm/s<sup>2</sup>)</b>	38,24±5,77	39,54±3,45	41,46±1,76	0,029	0,972
<b>TP (ms)</b>	17,6±0,93	18±0,53	17,57±0,61	0,001	0,469
<b>TP/ET</b>	0,29±0,01	0,3±0,01	0,31±0,01	0,032	0,707

**Tabla 3. Resumen de las medidas ecocardiográficas del VD para los grupos entrenados.** Los análisis comparativos se realizaron usando los grupos sedentarios WT, TG-B y TG-M de 7 meses presentes en la Tabla 3. El resultado del análisis de la varianza para los factores “Entrenamiento” y “Genotipo” se muestran a la derecha. El test de Bonferroni fue usado para la comparación por pares entre los grupos de cada genotipo entrenados. <sup>†</sup>=p<0,01; <sup>‡</sup>=p<0,001 comparado con el grupo WT para cada edad. INT=Interacción de los factores. RVOT= *RV outflow tract*; RVDd= *RV end-diastolic Diameter parasternal axis*; RVAd= *RV end-diastolic Area parasternal axis*; TAPSE= *Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*; Acc= *myocardial Acceleration during isovolumic contraction*; TP= *Time to Peak*; ET= *Ejection Time*.



## 20.2. Cambios en el ventrículo izquierdo

En contraposición a los resultados obtenidos para el VD, el VI no se encontraba afectado en la misma medida para los diferentes grupos (Tablas 5 y 6).



**Figura 38.** Imágenes ecocardiográficas en modo M mostrando diferentes ciclos de sístole-diástole del VI. La flecha con línea continua indica el final de la sístole. La flecha con línea discontinua indica el final de la diástole.

En los grupos sedentarios se observaron diferencias en el diámetro al final de la sístole del VI (LVDs;  $p=0,039$ ; Tabla 5). En concordancia con esto, se observó una menor fracción de

acortamiento del VI (LVFS), diferencia que solo se acumulaba en el grupo TG-A (Tabla 5). En la Figura 38 se muestra una imagen ecocardiográfica en modo M para una visión del eje corto, donde se observa una peor contracción del VI. No se observaron diferencias debidas al envejecimiento en los animales.

Por otro lado, las dimensiones del VI también se veían afectadas por el ejercicio, mientras que no se observaron diferencias en su función o en el grosor de sus paredes (Tabla 6).





	7 meses				>11 meses				ANOVA dos factores	
	WT	TG-B	TG-M	TG-A	WT	TG-B	TG-M	TG-A	p valor (Edad)	p valor (Genotipo)
<b>Nº Animales</b> (♂/♀)	16 (10/6)	9 (4/5)	12 (6/6)	9 (4/5)	10 (3/7)	5 (2/3)	5 (1/4)	8 (4/4)	---	---
<b>IVS (mm)</b>	0,69±0,01	0,65±0,02	0,73±0,01	0,68±0,01	0,63±0,02	0,66±0,02	0,67±0,03	0,71±0,01	0,839	0,610
<b>PW (mm)</b>	0,7±0,01	0,66±0,022	0,74±0,01	0,68±0,01	0,65±0,02	0,68±0,02	0,65±0,03	0,72±0,01	0,813	0,754
<b>LVDd (mm)</b>	4,03±0,05	3,84±0,09	3,984±0,07	4,09±0,09	4,03±0,09	4,12±0,11	4,15±0,12	4,34±0,08	0,061	0,408
<b>LVDs (mm)</b>	2,8±0,09	2,629±0,14	2,77±0,08	3,16±0,12	2,84±0,11	3,05±0,14	2,95±0,12	3,22±0,91	0,054	0,039
<b>LVFS (%)</b>	30,7±1,93	31,73±2,44	30,66±1,27	22,88±2,5*	29,73±1,84	26,23±1,67	29,03±1,92	25,96±0,95*	0,407	0,019
<b>LVmass (mg)</b>	98,05±3,22	83,62±4,85	103,36±4,31	98,21±4,14	89,21±6,37	97,11±7,46	95,31±5,83	115,93±6,21 <sup>†</sup>	INT	INT

**Tabla 4. Resumen de las medidas ecocardiográficas para el VI en los grupos sedentarios de 7 y 12 meses de edad.** \*= $p < 0,05$ ; <sup>†</sup>= $p < 0,01$  comparado con el grupo WT para cada edad. El resultado del análisis de la varianza para los factores “Edad” y “Genotipo” se muestran a la derecha. El test de Bonferroni fue usado para la comparación por pares de los grupos genotipo para cada edad. INT=Interacción de los factores. IVST=*Interventricular Septum Thickness*; PWT= *LV Posterior Wall Thickness*; LVDd= *LV end-diastolic Diameter*; LVDs= *LV end-systolic Diameter*; LVFS= *LV Fraction Shortening*.

	7 meses Entrenados			ANOVA dos factores	
	WT	TG-B	TG-M	p valor (Entrenamiento)	p valor (Genotipo)
<b>Animales</b> (♂/♀)	8 (4/4)	9 (4/5)	10 (5/5)	---	---
<b>IVS (mm)</b>	0,66±0,02	0,64±0,02	0,76±0,01	0,542	0,170
<b>PW (mm)</b>	0,67±0,03	0,66±0,02	0,76±0,01	0,570	0,293
<b>LVDd (mm)</b>	4,04±0,1	4,12±0,09	4,07±0,04	0,041	0,764
<b>LVDs (mm)</b>	2,9±0,19	3,04±0,08	2,91±0,06	0,034	0,697
<b>LVFS (%)</b>	28,36±3,29	26,32±1,28	28,33±1,44	0,053	0,966
<b>LVmass (mg)</b>	93,58±6,46	93,74±6,55	111,7±2,74	0,233	0,001

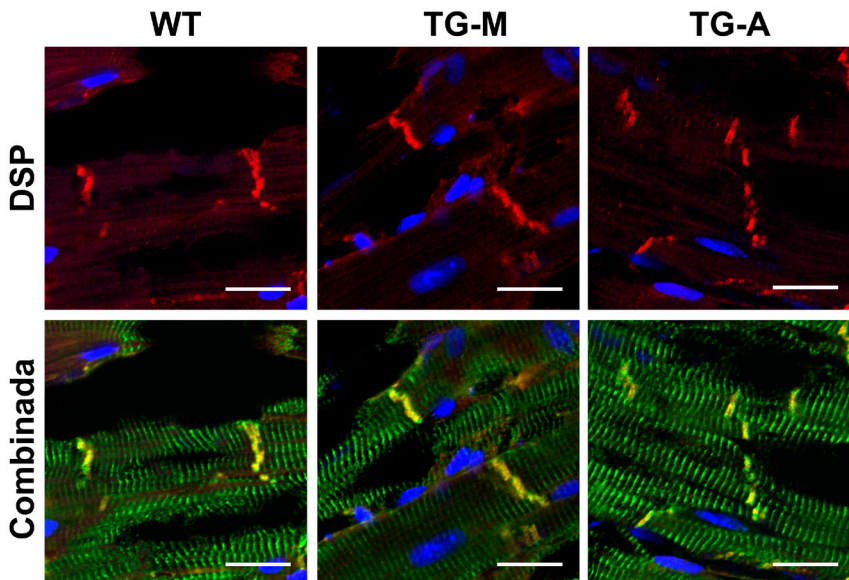
**Tabla 5. Resumen de las medidas ecocardiográficas del VI para los grupos entrenados.** Los análisis comparativos se realizaron usando los grupos sedentarios WT, TG-B y TG-M de 7 meses presentes en la Tabla 5. El resultado del análisis de la varianza para los factores “Entrenamiento” y “Genotipo” se muestran a la derecha. El test de Bonferroni fue usado para la comparación por pares de los grupos genotipo para cada edad. INT=Interacción de los factores. IVS=Interventricular Septum Thickness; PW= LV Posterior Wall Thickness; LVDd= LV end-diastolic Diameter; LVDs= LV end-systolic Diameter; LVFS= LV Fraction Shortening.



## 21. Evaluación de proteínas de adhesión celular

Las anomalías ultra-estructurales y ecocardiográficas encontradas en el modelo pueden estar desencadenadas por defectos en las proteínas de adhesión, presentes en los discos intercalares. En este apartado se estudia la localización y el contenido de diferentes proteínas de adhesión celular presentes aquí. Se utilizaron animales WT, TG-M y TG-A para su análisis (n=4 por grupo).

### 21.1. Localización



**Figura 39.** Localización de la proteína DSP (rojo) y DES (verde) en cardiomiocitos. Los núcleos se destacan con DAPI (azul). Barra: 20 $\mu$ m.

La proteína desmosomal DSP se localizaba en los extremos de los cardiomiocitos. Esta proteína coincidía en su localización con el filamento intermedio Desmina (DES) dentro de los discos

intercalares. Dicha distribución de DSP era similar para todas las líneas estudiadas (Figura 39). Asimismo, la intensidad de su señal no era diferente entre los animales TG-M o TG-A respecto al control WT.

Por otro lado, la localización de la proteína PG también se restringía a los discos intercalares de los cardiomiocitos en las líneas transgénicas. Además, tampoco se encontraron diferencias en la intensidad de la señal entre los grupos (Figura 40).

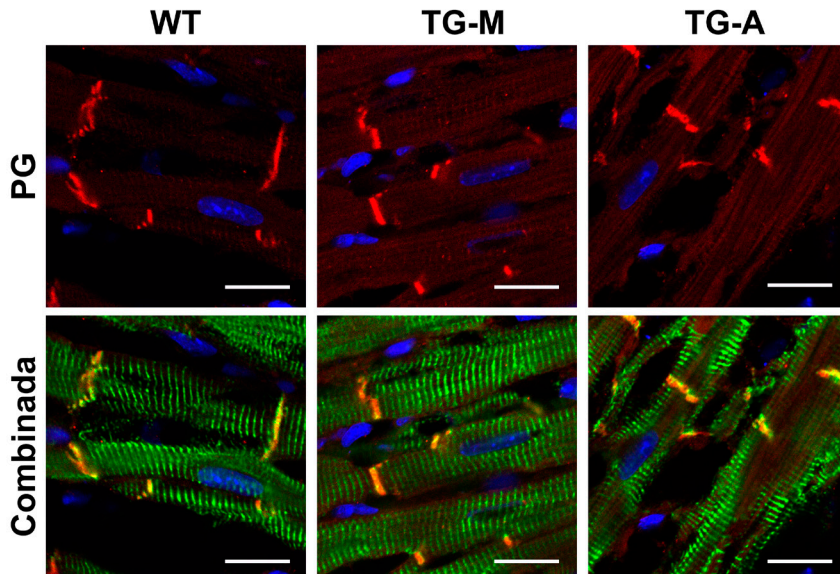
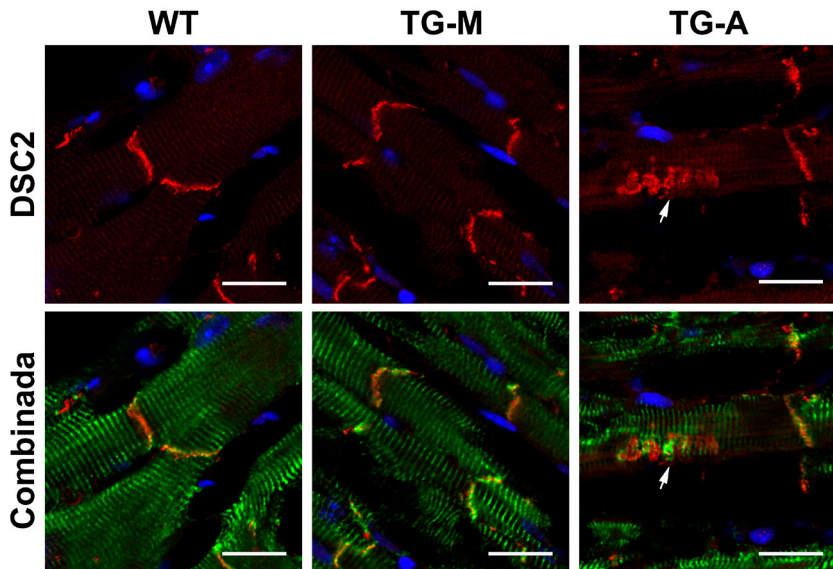


Figura 40. Localización de la proteína PG (rojo) y DES (verde) en cardiomiocitos. Los núcleos se destacan con DAPI (azul). Barra: 20 $\mu$ m.

En contraposición a los resultados obtenidos para las proteínas DSP y PG, la distribución de DSC2 era diferente entre los grupos (Figura 41). Mientras que la señal de DSC2 en los cardiomiocitos de animales TG-M no mostraba ninguna



alteración, en el grupo TG-A se observaban acumulaciones de proteína en el citoplasma de los cardiomiocitos (Figura 41). Estos acúmulos se distribuyen por todo el citoplasma celular, con diferente dimensión entre ellos. Muchos cardiomiocitos no presentaban estos depósitos, mientras que otros presentaban decenas de dichos acúmulos, algunos de gran tamaño (flecha en Figura 41). Estos depósitos se observaban en cardiomiocitos del VI, VD y SIV. Finalmente, la señal de DSC2 presente en los discos intercalares parecía no verse afectada en ninguna línea.



**Figura 41. Localización de la proteína DSC2 (rojo) y DES (verde) en cardiomiocitos.** La flecha señala un gran depósito de señal DSC2 en el citoplasma de la célula. Los núcleos se destacan con DAPI (azul). Barra: 20 $\mu$ m.

Por último, se analizó la distribución e intensidad de señal de  $\beta$ -CAT en el tejido (Figura 42). La proteína se concentraba en los discos intercalares en animales WT. Sin embargo, en animales transgénicos de ambas líneas se observó una reducción de la

señal en esta región (Comparar flechas en Figura 42). Esta menor señal en los discos intercalares se hacía más evidente en la línea TG-A. Además, en esta línea se apreciaba un aumento de la señal citoplasmática de la proteína (asterisco en Figura 42), que sugería una distribución anormal de  $\beta$ -CAT en esta fracción celular.

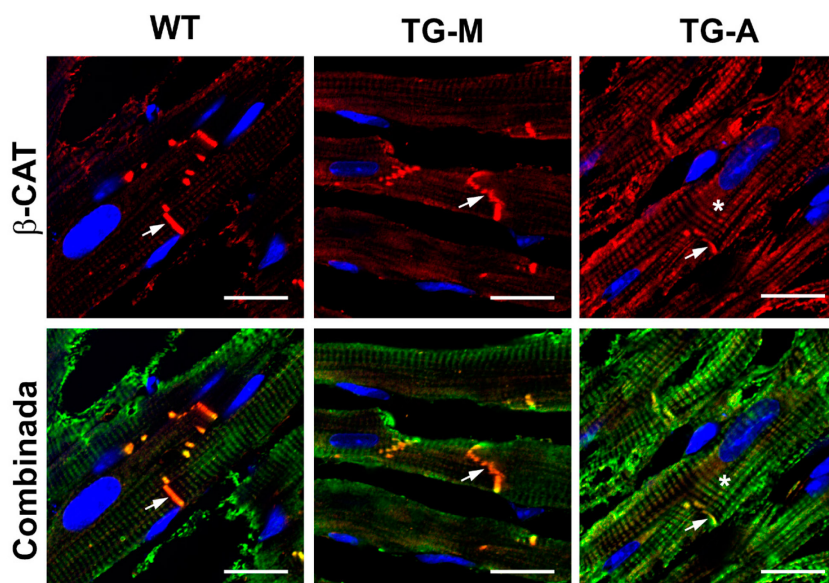


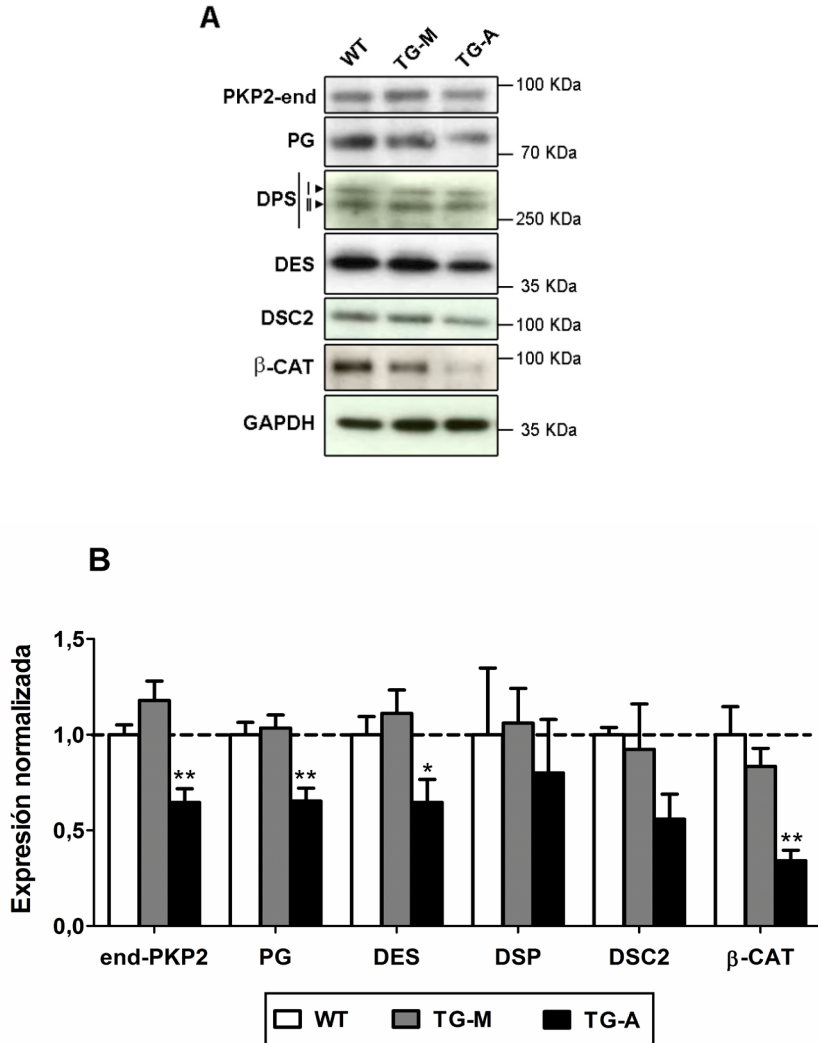
Figura 42. Localización de la proteína  $\beta$ -CAT (rojo) y DES (verde) en cardiomiocitos. Las flechas indican la localización de  $\beta$ -CAT en los discos intercalares. Los asteriscos indican la señal citoplasmática de  $\beta$ -CAT. Los núcleos se destacan con DAPI (azul). Barra: 20 $\mu$ m.

## 21.2. Contenido

El contenido relativo de cada una de las proteínas fue determinada mediante la técnica de *western blot* (Figura 43A). Posteriormente se realizaron análisis semi-cuantitativos de cada



proteína mediante densitometría (Figura 43B). Se utilizó la señal de GAPDH para normalizar los valores en cada caso.



**Figura 43. Contenido de proteínas de adhesión celular en el corazón. A)** Imagen representativa del resultado por *western blot* para cada proteína. A la derecha se muestra el peso molecular en cada *blot*. Para la proteína DSP se muestran las isoformas I (arriba) y II (abajo). **B)** Análisis semi-cuantitativo de la cantidad de proteína para cada línea. Los valores de cada animal fueron normalizados con la señal de

GAPDH.\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$  comparado con el control WT. Se utilizó el estadístico ANOVA de un factor y posteriormente el post-test de Bonferroni para la comparación por pares. En caso de no seguir la normalidad, se usó el estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis y post-test de Dunnett.

De forma general, se observó una reducción en el contenido de todas las proteínas analizadas para el grupo TG-A (Figura 43B). Esta tendencia no era significativa para las proteínas DSP ( $p=0,504$ ) y DSC2 ( $p=0,064$ ). Sin embargo, las diferencias entre los grupos eran significativas para PKP2-end ( $p=0,001$ ), PG ( $p < 0,001$ ), DES ( $p=0,03$ ) y  $\beta$ -CAT ( $p=0,002$ ). Todas las diferencias observadas se acumulaban en el grupo TG-A (asteriscos en Figura 43B).

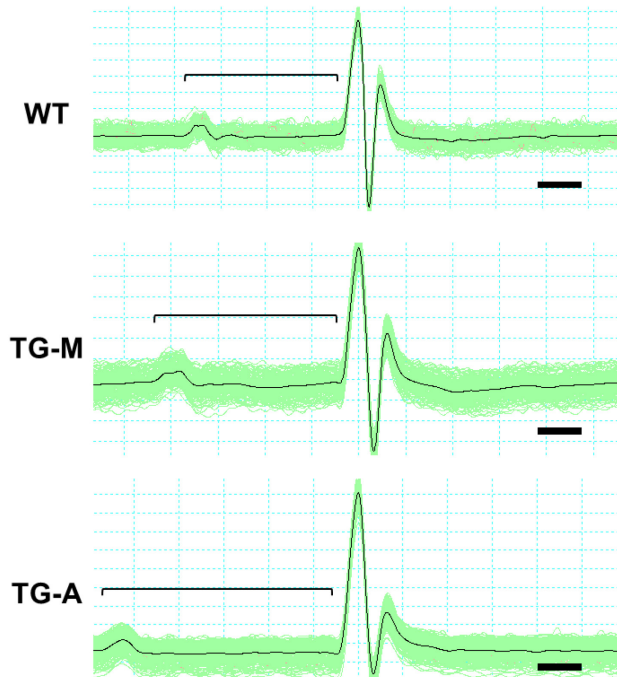
## **22. Anomalías electrofisiológicas del corazón**

### **22.1. Electrocardiograma**

Como primera aproximación sobre la caracterización electrofisiológica del modelo, se analizó el ECG, el cual se usa como uno de los criterios utilizados en el diagnóstico de la MCA (Tabla 1). Además, se estudió la influencia de la edad y el ejercicio en los grupos TG-B, TG-M y TG-A (Figuras 44 y 45; Tablas 7 y 8).

En la Figura 44 se muestran 3 ejemplos representativos de ECG para animales WT, TG-M y TG-A de 7 meses de edad. En ellos se observa que la duración del intervalo PR se prolonga en función del contenido de PKP2 truncada para cada línea transgénica (Figura 44).

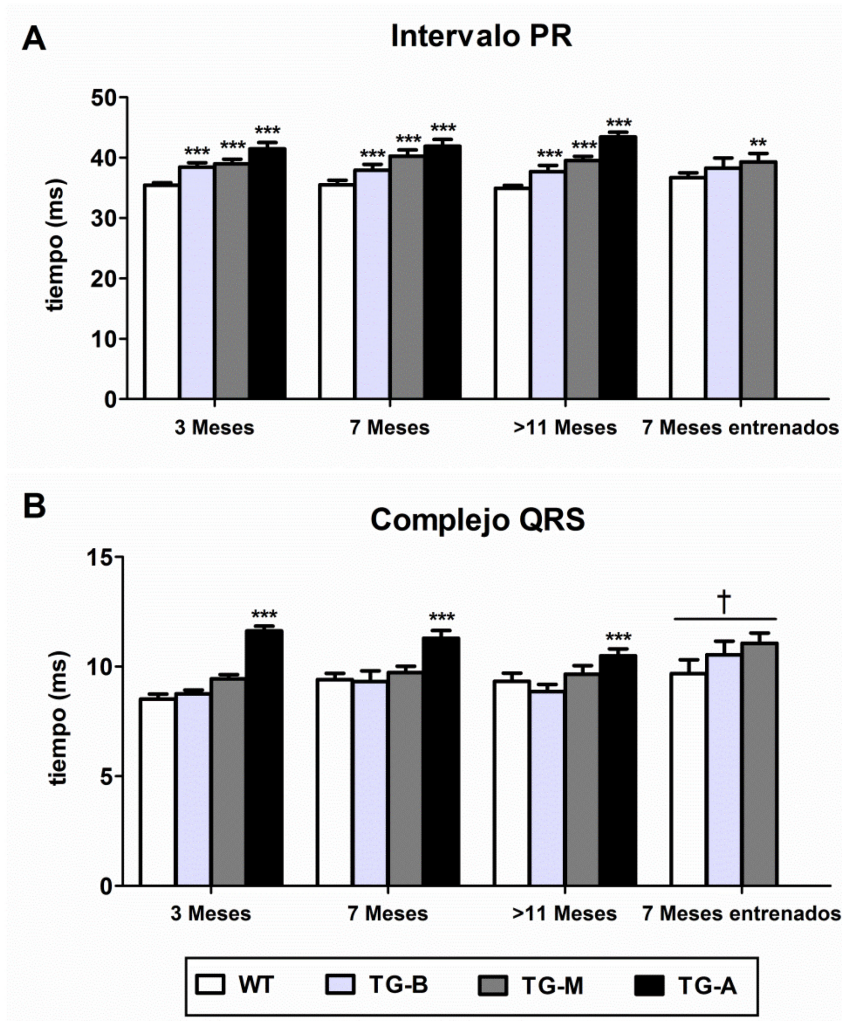




**Figura 44. ECG representativos para distintos grupos a una edad de 7 meses.** Las líneas verdes representan cada latido cardíaco y en negro se muestra el promedio de todas ellas (~200 latidos). La llave muestra el intervalo PR para cada genotipo. Barra gruesa= 10ms.

El análisis de los promedios para cada grupo demostró que las diferencias en la duración del intervalo PR eran significativas ( $p < 0,001$ ; Tabla 7 y Figura 45A), indicando que este parámetro es dependiente del contenido de PKP2 truncada. Además, este efecto se repetía para todas las edades (Figura 45A). Sin embargo, mientras que el genotipo alteraba claramente la duración de este parámetro, la edad no producía ningún efecto ( $p = 0,585$ ; Figura 45A; Tabla 7). Por el contrario, en el grupo de animales corredores no se encontraron diferencias debidas al

genotipo o el ejercicio para este parámetro (Figura 45A; Tabla 8).



**Figura 45. Evolución del ECG en las líneas transgénicas en función de la edad y el genotipo.** A) Duración del intervalo PR para cada línea transgénica y grupo. B) Duración del complejo QRS para cada línea transgénica y grupo. \*\*\*=p<0,001 comparado con el grupo WT para cada grupo. †=p<0,05 comparado con el grupo sedentario de 7 meses WT, TG-B y TG-M. Para más detalle ver Tablas 7 y 8.



Por otra parte, se observó una prolongación del complejo QRS en el grupo TG-A para todas las edades (Figura 45B). Además, ninguna diferencia se observó debido a la edad ( $p=0,218$ ; Tabla 7). Por contra, los animales corredores de 7 meses mostraron una prolongación del complejo QRS debida al ejercicio ( $p=0,015$ ; Figura 45B), pero no al genotipo ( $p=0,168$ ; Tabla 8).

De manera similar a los resultados obtenidos para el intervalo PR, la duración de la onda P era dependiente del genotipo ( $p<0,001$ ), pero no de la edad ( $p=0,274$ ; Tabla 7). Ninguna diferencia se encontró cuando los grupos corredores fueron comparados entre ellos (Tabla 8). Finalmente, tampoco se observaron diferencias para la frecuencia cardíaca o el intervalo RR en los grupos de edad o ejercicio de cualquier genotipo (Tablas 7 y 8). Sin embargo, el intervalo QT corregido (QTc) estaba prolongado en animales de 3 meses de edad del grupo TG-A comparado con los controles WT ( $p<0,001$ ; Tabla 7).

Resultados

	Genotipo	Animales (♂/♀)	Frecuencia (Latidos/min)	Intervalo RR (ms)	Onda P (ms)	Intervalo PR (ms)	Complejo QRS (ms)	Intervalo QTc (ms)
<b>3 Meses</b>	WT	26 (14/12)	465,3±8,7	130,1±2,5	6,7±0,2	35,4±0,4	8,5±0,2	21,8±0,3
	TG-B	18 (7/11)	480,7±10,9	125,9±2,7	8±0,2†	38,4±0,7‡	8,8±0,2	22,5±0,3
	TG-M	21 (11/10)	483,5±7,9	124,8±2	7,7±0,3‡	39±0,76‡	9,4±0,2	23,6±0,5
	TG-A	17 (8/9)	440,7±14,2	138,4±4,3	8,9±0,3‡	41,4±1,1‡	11,6±0,2‡	28,4±1,3‡
<b>7 Meses</b>	WT	17 (11/6)	473,6±14,1	128,4±3,9	7,7±0,4	35,3±0,7	9,5±0,3	25±1,2
	TG-B	9 (3/6)	439,1±16,6	138,1±4,8	8±0,5†	37,9±1‡	9,3±0,5	26,2±2,6
	TG-M	11 (5/6)	470,6±13,7	128,5±3,3	8,3±0,2‡	40,2±1,1‡	9,7±0,3	26±0,9
	TG-A	17 (8/9)	486,7±13,6	124,9±3,7	8,6±0,3‡	41,9±1,1‡	11,3±0,3‡	26,8±1
<b>&gt;11 Meses</b>	WT	26 (13/13)	462,2±9,1	131,1±2,6	7,6±0,2	34,9±0,4	9,3±0,4	23,6±0,8
	TG-B	9 (3/6)	425±13,2	142,2±4,2	8,4±0,3†	37,7±1‡	8,9±0,3	23,3±1
	TG-M	11 (1/10)	448,1±7,6	134,3±2,3	9,3±0,5‡	39,5±0,7‡	9,6±0,4	26,3±1,2
	TG-A	11 (5/6)	437,4±14,5	138,7±4,8	8,6±0,5‡	43,4±0,8‡	10,5±0,3‡	24,9±1,6
<b>ANOVA 2- factores (Edad)</b>	p valor (Edad)	NA	INT	INT	0,011	0,825	0,203	INT
	p valor (Genotipo)	NA	INT	INT	<0,001	<0,001	<0,001	INT

**Tabla 6. Resumen de resultados de los parámetros del ECG para cada genotipo a diferentes edades.** \*= $p<0,05$ ; †= $p<0,01$ ; ‡= $p<0,001$ , comparado con WT para cada grupo. INT=interacción entre las variables. Se realizó ANOVA de dos factores y un post análisis con el test de Bonferroni para las comparaciones múltiples. El test de Bonferroni también fue utilizado para la comparación por pares en caso de interacción de las variables.



	Genotipo	Animales (♂/♀)	Frecuencia (ms)	Intervalo RR (ms)	Onda P (ms)	Intervalo PR (ms)	Complejo QRS (ms)	Intervalo QTc (ms)
<b>7 Meses Ejercicio</b>	WT	8 (4/4)	433,5±14,2	139,4±4,5	7,9±0,2	36,7±0,8	9,7±0,6	22,9±1,2
	TG-B	7 (4/3)	438,4±26,5	139,7±7,8	8,4±0,7	38,3±1,6	10,5±0,6	27,3±3,2
	TG-M	11 (5/6)	446,6±17,3	136,1±5	8,5±0,3	39,3±1,4	11,1±0,5	26,4±2
<b>ANOVA 2- factores (Ejercicio)</b>	p valor (Ejercicio)	NA	0,131	0,097	0,454	0,779	0,015	0,912
	p valor (Genotipo)	NA	0,523	0,406	0,302	0,003	0,168	0,264

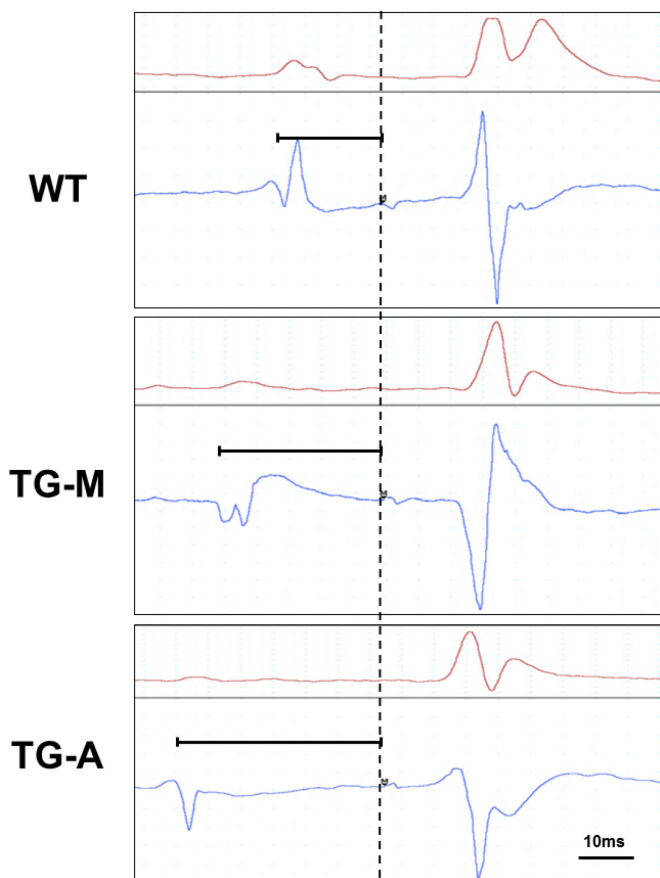
**Tabla 7. Resumen de resultados obtenidos del ECG en cada genotipo para animales sometidos a ejercicio.** †=p<0,01, comparado con WT para cada grupo. Para la comparación se utilizaron los grupos WT, TG-B y TG-M sedentarios de 7 meses de edad. Se realizó ANOVA de dos factores y post análisis con el test de Bonferroni para las comparaciones múltiples.

## 22.2. Electrofisiología e inducibilidad de arritmias

Con el objetivo de profundizar en los defectos encontrados en el ECG, se realizaron estudios electrofisiológicos invasivos mediante catéter intracavitario. Por un lado, se analizaron los registros de electrograma intracavitario y las medidas del periodo refractario del ventrículo, y por otro se realizó un estudio de inducibilidad de arritmias en el modelo. Los estudios se realizaron sobre todas las líneas genéticas de 7 meses de edad, sedentarias y corredoras.

### 22.2.1. *Propiedades eléctricas intracavitarias*

El registro del electrograma intracavitario (EGM) y el ECG de superficie para cada línea sedentaria permitieron detectar la señal del His y los intervalos Atrio-His (A-H) y His-Ventrículo (H-V) (Figura 46). Se observó una prolongación del intervalo A-H (Atrio-His) asociada al contenido de transgén en cada línea (línea horizontal en Figura 46). Esta diferencia era significativa para los grupos TG-M y TG-A, mientras que el ejercicio no afectaba a este parámetro (Tabla 9). Además, se observaron diferencias en la duración del intervalo H-V (His-Ventrículo) debidas al genotipo ( $p=0,044$ ), pero no al ejercicio (Tabla 9).



**Figura 46.** Registros dobles de ECG de superficie (Rojo) y electrograma intracavitario (EGM; azul) para diferentes líneas. La línea vertical discontinua indica el inicio de la señal del His. Las líneas horizontales señalan el intervalo A-H para cada línea. Barra=10ms.

Finalmente, mediante estímulos eléctricos, se estableció el periodo refractario efectivo del ventrículo (PREV) en cada grupo. Este era significativamente mayor en el grupo TG-A comparado con el control WT. No se observaron diferencias en las líneas transgénicas sometidas a ejercicio (Tabla 9).

	Sedentarios				Entrenados			p valor (Genotipo)	p valor (Ejercicio)
	WT (n=13)	TG-B (n=7)	TG-M (n=13)	TG-A (n=23)	WT (n=8)	TG-B (n=6)	TG-M (n=9)		
<b>Intervalo A-H (ms)</b>	22,6±0,8	24,8±2,4	25,5±1,3*	27±1,2‡	20,7±0,8	25,9±1,7	22,9±0,7*	0,006	0,570
<b>Intervalo H-V (ms)</b>	10,9±0,6	12,6±0,6	13,3±1,1	10±0,4	11,1±0,5	11,6±0,9	11,8±1,1	0,044	0,459
<b>PREV (ms)</b>	40,2±1,1	40,2±1,1	41,3±1,4	42±0,8*	37,4±1,5	45,2±1,7	40,5±1,2	INT	INT
<b>TV inducida</b>	4/13 (13%)	4/7 (57%)	7/13 (54%)	17/23 (74%)	4/8 (50%)	3/6 (50%)	5/9 (56%)	p=0,01 (para tendencia en grupo sedentarios)	

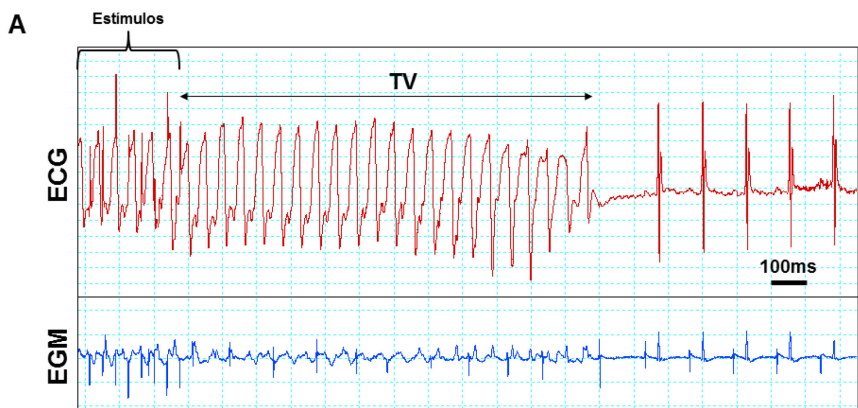
**Tabla 8. Resumen de resultados obtenidos para el estudio electrofisiológico intracavitario.** \*= $p < 0,05$ ; ‡= $p < 0,001$  comparado con el grupo WT para cada grupo. El resultado del análisis de la varianza para los factores “Genotipo” y “Ejercicio” de las variables continuas se muestran a la derecha. Para las variables continuas, se realizaron ANOVA de dos factores y luego un análisis mediante el test de Bonferroni para la comparación por pares de los grupos. Para las variables discretas (TV inducida) se utilizó el estadístico Cochran’s & Mantel-Haenszel de asociación lineal por lineal para establecer la tendencia entre los grupos. A-H: intervalo inicio del Atrio-inicio del His; H-V: intervalo inicio del His-inicio de la onda Q del complejo QRS del ECG de superficie; PREV: periodo refractario efectivo del ventrículo. TV: taquicardia ventricular. INT: Interacción de las variables.

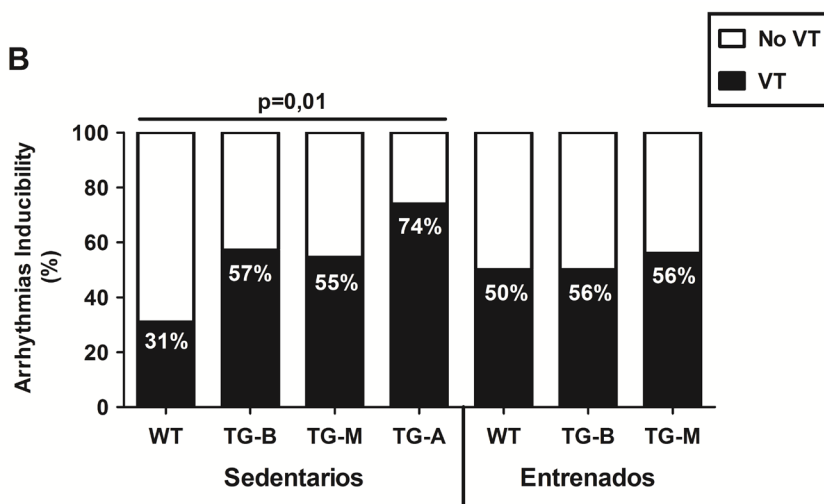




### 22.2.2. Inducción de arritmias

El estudio de inducibilidad de arritmias mostró una mayor proporción de animales con taquicardias ventriculares (TV) en los grupos transgénicos sedentarios comparados con el grupo WT (Tabla 9; Figura 47). Además, se observó una tendencia entre los grupos, donde a mayor cantidad de transgén, mayor proporción de animales eran inducidos ( $p=0,01$ ; Figura 47B). Sin embargo, los grupos transgénicos entrenados mostraron una similar proporción de animales inducidos que sus respectivos grupos sedentarios. No obstante, el grupo WT entrenado desarrolló una mayor proporción de animales inducidos comparado con su grupo homólogo sedentario, aunque estas diferencias no eran significativas ( $p=0,378$ ; Figura 47). Ningún animal murió durante el procedimiento debido a las TV.





**Figura 47. Inducibilidad de Arritmias en los grupos sedentarios y entrenados. A)** Representación del registro superficial (ECG) e intracavitario (EGM) de una taquicardia ventricular (TV) tras una ráfaga de estímulos inducida mediante catéter intracavitario. La flecha indica la duración de la TV. La llave indica los estímulos generados por el catéter antes de iniciarse la TV. **B)** Inducibilidad para cada línea transgénica y grupo. El estadístico de Cochran's & Mantel-Haenszel de asociación lineal por lineal fue utilizado para la determinar la tendencia entre los grupos.

## 23. Alteración de proteínas implicadas en el PA

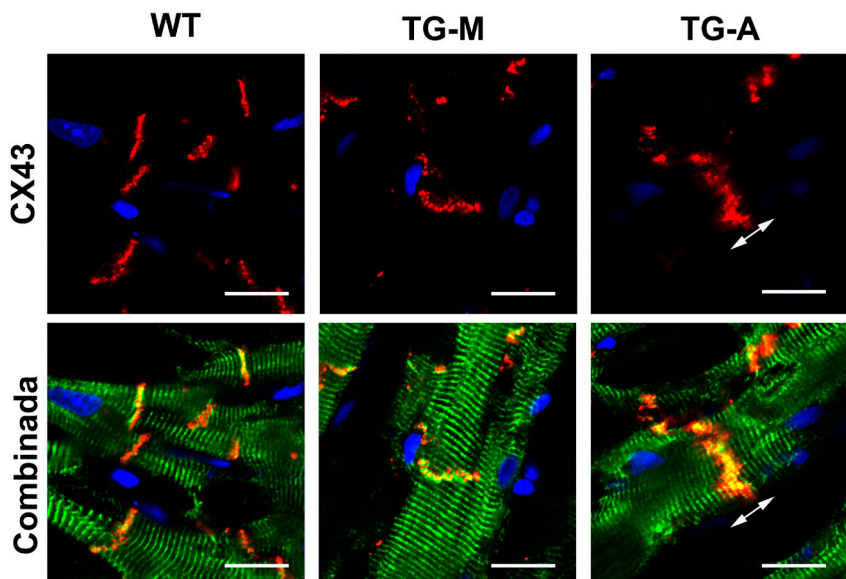
### **cardíaco: CX43 y canal $Na_v1.5$**

Las anomalías en la localización y el contenido de los canales CX43 y  $Na_v1.5$  han sido ampliamente asociadas a los enfermos de MCA[134, 135]. Además, los defectos eléctricos encontrados en este modelo justifican la búsqueda de los causantes de este fenotipo en ratón. Por ello, se ha analizado la localización y el contenido de estas proteínas en los modelos TG-M y TG-A ( $n > 3$  por grupo).



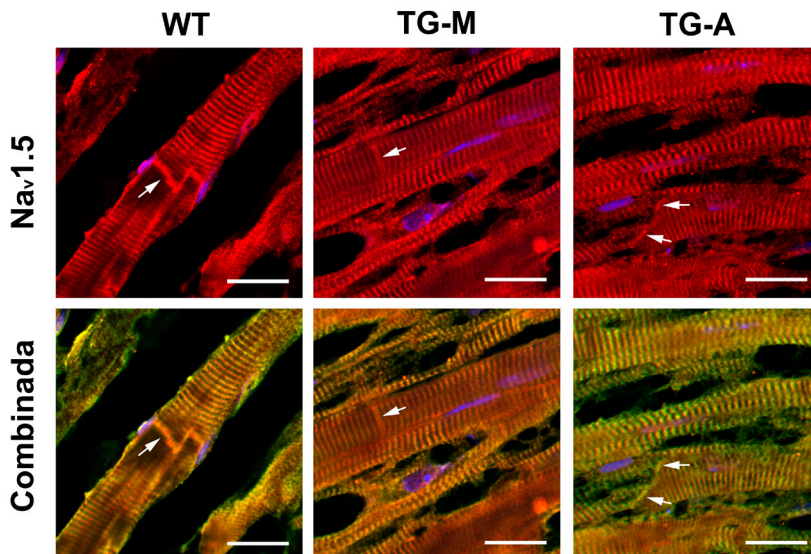
### 23.1. Localización

La proteína CX43 fue detectada con una alta intensidad en los discos intercalares de los cardiomiocitos de animales WT (Figura 48). Del mismo modo, la localización e intensidad de señal de esta proteína en cardiomiocitos de TG-M era muy similar a la encontrada en animales controles. Por el contrario, en animales TG-A se observaba un remodelado de la proteína, donde la señal en los discos intercalares era más difusa, aunque su intensidad no parecía alterada (Flecha en Figura 48). Por otro lado, no se observó una distribución diferencial en otras regiones subcelulares. Este fenotipo era similar en todas las regiones cardíacas analizadas (VD, VI y SIV).



**Figura 48. Localización de la proteína CX43 (rojo) y DES (verde) en cardiomiocitos.** La flecha de dos puntas indica la dispersión de la señal en los cardiomiocitos del grupo TG-A. Los núcleos se destacan con DAPI (azul). Barra: 20 $\mu$ m.

Por otra parte, el canal de sodio cardíaco ( $Na_v1.5$ ) se localizaba en el interior del cardiomiocito con una distribución en bandeado, asociado a los túbulos T, y en concordancia con la distribución descrita previamente[168, 169].  $Na_v1.5$  co-localizaba con la señal de la proteína DES dentro de la célula (Figura 49). Para esta localización, los animales TG-M y TG-A mostraban una distribución e intensidad de señal similar a los animales WT. Por otra parte,  $Na_v1.5$  era también detectada en los discos intercalares de animales WT con gran intensidad. Esta señal era más tenue en cardiomiocitos de animales TG-M (Flechas en Figura 49). Finalmente, este fenotipo era aún más severo en animales TG-A, donde la señal en los discos intercalares era muy reducida.



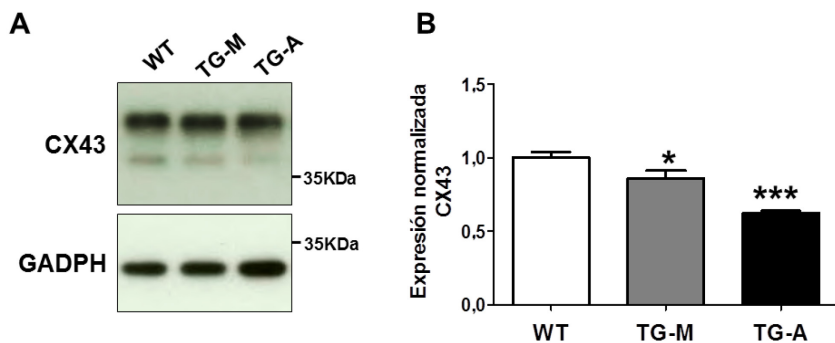
**Figura 49. Localización de la proteína Nav1.5 (rojo) y DES (verde) en cardiomiocitos.** Las flechas indican la señal en los discos intercalares de los cardiomiocitos. Los núcleos se destacan con DAPI (azul). Barra: 20 $\mu$ m.



## 23.2. Contenido

En muchos casos, el remodelado de proteínas está asociado a una alteración de su cantidad en el tejido. Por ello, analizamos el contenido de CX43 y  $\text{Na}_v1.5$  en el tejido mediante la semi-cuantificación por *western blot* (WT: n=6; TG-M: n=4; TG-A: n=6).

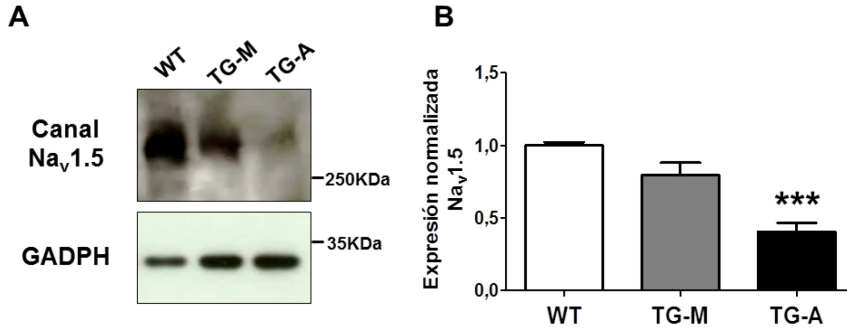
Para CX43, las bandas mostraron un patrón similar para las tres líneas analizadas (Figura 50A). Sin embargo, el análisis semi-cuantitativo de las bandas mostró una reducción del contenido de esta proteína en el grupo TG-M ( $p=0,036$ ), mientras que esta era aún mayor en ratones TG-A ( $p<0,001$ ).



**Figura 50. Contenido total de CX43 en corazones de ratones transgénicos. A)** Resultado de *western blot* para la detección de CX43 en cada línea. **B)** Niveles de CX43 normalizados con la señal GAPDH para cada grupo. \*= $p<0,05$ ; \*\*\*= $p<0,001$ . Se utilizó el estadístico ANOVA de un factor y posterior post-test de Bonferroni para la comparación por pares.

Por otro lado, el canal de sodio  $\text{Na}_v1.5$  mostró una reducción evidente de la intensidad de las bandas para los grupos TG-M y TG-A (Figura 51A). Esta observación se reflejó en una reducción

no significativa en el grupo TG-M ( $p=0,093$ ) y una reducción muy significativa en el grupo TG-A ( $\sim 60\%$ ;  $p<0,001$ ) (Figura 51B).



**Figura 51. Contenido total de Na<sub>v</sub>1.5 en corazones de ratones transgénicos. A)** Resultado del *western blot* para la detección de Na<sub>v</sub>1.5 en cada línea. **B)** Niveles de Na<sub>v</sub>1.5 normalizados con la señal GAPDH para cada grupo. \*\*\*= $p<0,001$ . Se utilizó el estadístico ANOVA de un factor y posterior post-test de Bonferroni para la comparación por pares.







## **V. Discusión**

---





La etiología de la MCA ha sido desconocida hasta hace relativamente poco tiempo. No fue hasta el año 1994 cuando Rampazzo *et al.*, demostraron por primera vez la asociación de la enfermedad a una mutación genética[48]. Desde entonces, muchos han sido los genes asociados a la enfermedad, destacando aquellos codificantes para proteínas desmosomales[56]. Ello ha permitido incluir el estudio genético de los pacientes dentro de los criterios diagnósticos utilizados en la práctica clínica[42] (Tabla 1). Sin embargo, la variedad de mutaciones, su penetrancia incompleta y su diferente evolución en los pacientes, impide determinar la patogenicidad de cada una de las mutaciones. Este hecho imposibilita que la genética sea utilizada como herramienta predictiva del desarrollo y evolución de la MCA en los pacientes, lo que permitiría un tratamiento de manera más personalizada.

Además del factor genético, el ambiente tiene también un papel esencial en el desarrollo y progresión de la patología, lo que hace aún más compleja la enfermedad. Es sabido que el ejercicio es un factor de riesgo muy importante de la enfermedad[30]. Además, por su carácter degenerativo, la edad también supone otro factor a tener en cuenta en su evolución (Figura 3). Todo ello hace de la MCA una enfermedad multifactorial y, por tanto, de difícil evaluación desde el ámbito clínico[21]. En consecuencia, un análisis pormenorizado de las diferentes características (genéticas y ambientales) desde la investigación básica, es necesario para esclarecer la etiología y evolución de la patología.

Con ese objetivo, este trabajo trata de estudiar en profundidad la aparición y evolución de la enfermedad en un modelo animal. Además, parece apropiado el uso de una proteína PKP2 truncada para el desarrollo del modelo, la mutación más importante entre los pacientes[36] (Figura 6). Más aún cuando son escasos los modelos animales desarrollados para el estudio de este gen (Tabla 2). Por otro lado, se ha querido determinar cómo influyen diferentes situaciones en el modelo: i) aumentando el contenido de PKP2 truncada, ii) durante el envejecimiento y iii) tras el entrenamiento intensivo en cinta andadora. Como resultado, se han identificado una serie de anomalías estructurales, electrofisiológicas y moleculares en el modelo (Tabla 10).

## **25. Principales resultados**

Como primera conclusión del modelo, se observó que la presencia de PKP2 truncada no inducía el remplazo de tejido cardíaco por tejido fibro-adiposo (Tabla 10). Sin embargo, esto no evitó la aparición de otros síntomas, lo que indica que el remplazo no es el único factor desencadenante de la enfermedad, en concordancia con otros modelos para MCA[126]. Por otra parte, ello ha permitido estudiar la evolución de la patología en el modelo sin la interferencia del tejido fibro-adiposo.

Parece obvio que la presencia de PKP2 truncada era requisito indispensable para el desarrollo de la MCA. No obstante, en esta tesis se ha demostrado que su cantidad en el tejido también



determina claramente la aparición y severidad del fenotipo, mediante un mecanismo de dosis-respuesta (Tabla 10). Además, probablemente tal efecto venga determinado por la proporción de PKP2 nativa vs PKP2 truncada. Esto sugiere un efecto dominante negativo de PKP2 mutada en el tejido, como algunos autores ya han sugerido [170].

Sorprendentemente, y a pesar de la ausencia de fenotipo histológico, se han identificado defectos ultra-estructurales graves en el modelo (Figuras 31 y 33). La rotura de discos intercalares y el des-ensamblaje de los desmosomas demuestra el efecto negativo de PKP2 truncada aquí. Todo ello promovido por una menor adhesión entre los cardiomiocitos[115]. No obstante, ello no parece ser suficiente para inducir la apoptosis en el tejido, en contraposición con los datos ofrecidos por otros estudios[88].

Los defectos ultra-estructurales parecen reflejarse en un ventrículo más dilatado y disfuncional (Tabla 10). Este efecto es claramente dependiente del contenido de PKP2 truncada, lo cual ha sido demostrado por primera vez en este estudio. El ejercicio intensivo se ha sugerido también como un factor desencadenante de la dilatación del VD en pacientes de MCA[171]. En concordancia con estos datos, nuestro modelo muestra una dilatación del VD dependiente del ejercicio intensivo y el envejecimiento. Todo ello indica que los factores ambientales son capaces de desencadenar la enfermedad en presencia de un substrato genético.

Los defectos electrofisiológicos también parecen depender del contenido de PKP2 truncada en el tejido. La prolongación del intervalo PR y A-H, así como la inducibilidad de arritmias, muestran una tendencia clara: una mayor dosis de transgén provoca un fenotipo más evidente. Sin embargo, los defectos electrofisiológicos no aparecen siempre asociados a las anomalías estructurales (Tabla 10). Ni el ejercicio, ni el envejecimiento parecen afectar a las propiedades eléctricas del modelo, lo que choca frontalmente con estudios clínicos y experimentales, que sugieren que la actividad física acelera la ACM[157, 172]. En cualquier caso, nuestros datos sugieren que existe una independencia entre las anomalías estructurales y electrofisiológicas en el modelo.

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares que desencadenan tales síntomas en el modelo, se analizaron algunas los factores moleculares más relevantes en la patogénesis de la MCA. En primer lugar, la presencia de PKP2 truncada en el núcleo nos hizo plantearnos si ello estaba relacionado con la ausencia de tejido fibro-adiposo. Aunque existe abundante bibliografía que demuestra la modulación de la vía Wnt/ $\beta$ -cat por PKP2 nuclear[99, 173-175], el estudio en células mostró una actividad normal de esta vía de señalización (Figura 36).

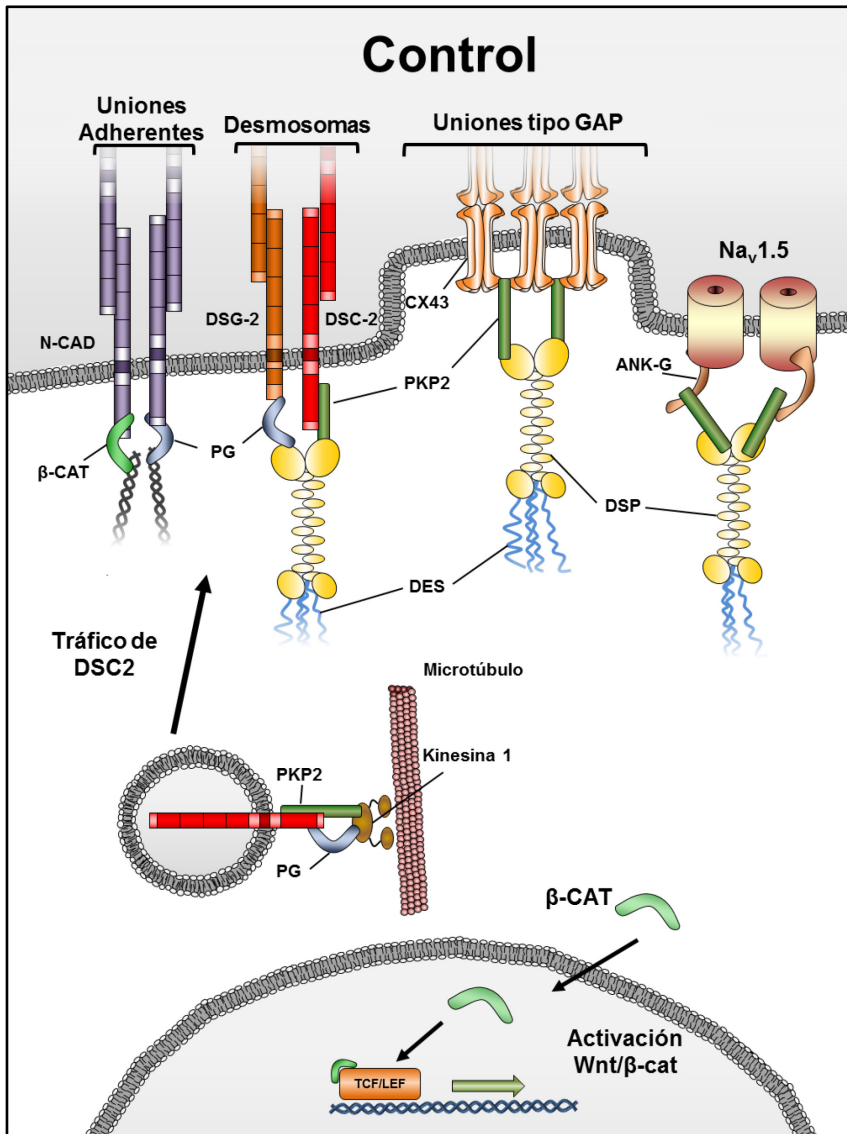


Condición	Reemplazo		Estructura			Electrofisiología			Molecular	
		MET	ECO (VD)	ECO (VI)	PR	QRS	Arritmias	Adhesión	Canales	
Contenido de transgén	TG-B	No	-	No	No	Sí (↑)	No	Sí (↑)	-	-
	TG-M	No	No	No	No	Sí (↑↑)	No	Sí (↑)	No	Sí (↑↓)
	TG-A	No	Sí (↑↑↑)	Sí (↑↑↑)	Sí (↑)	Sí (↑↑↑)	Sí (↑↑↑)	Sí (↑↑↑)	Sí (↑↑↑)	Sí (↑↑↑)
Envejecimiento	No	-	Sí (↑↑)	No	No	No	No	-	-	
Ejercicio	No	-	Sí (↑↑)	No	No	No*	No <sup>†</sup>	-	-	

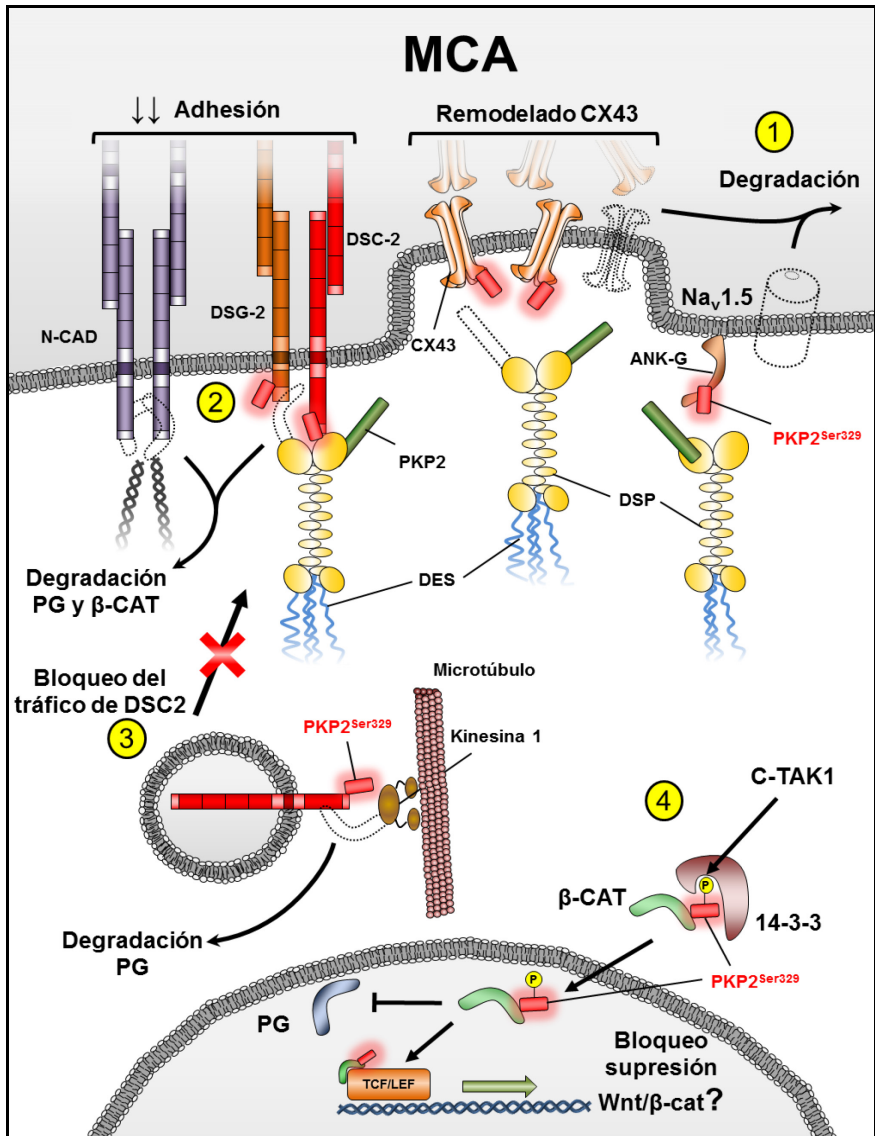
**Tabla 9. Resumen de resultados obtenidos para todos los grupos animales.** Las flechas indican el grado de severidad de cada anomalía. ↑↓ Muy baja; ↑= baja; ↑↑=media; ↑↑↑=alta. MET=microscopía electrónica de transmisión; ECO=ecocardiografía; PR=intervalo PR del ECG; QRS= complejo QRS del ECG;

\*= El ejercicio no afecta específicamente a las líneas transgénicas.

<sup>†</sup>= La inducibilidad solo aumenta en el grupo WT. No existe efecto del ejercicio en los grupos transgénicos.







**Figura 52. Propuesta sobre el mecanismo de acción de PKP2 truncada Ser329X en el modelo animal.** ① La presencia de PKP2 truncada redistribuye la localización de  $Na_v1.5$  y CX43, lo que impide el correcto acoplamiento de las uniones tipo Gap y promueve la degradación de las proteínas. ② La degradación de PG y  $\beta$ -CAT en el *Area composita* reduce la adhesión entre cardiomiocitos, produciendo roturas de los discos intercalares e induciendo dilatación ventricular. ③ PKP2 participa en el tráfico de DSC2 hacia la membrana[176]. PKP2 truncada en este modelo podría bloquear el tráfico de

DSC2, lo que la acumula en el citoplasma (Figura 41) y puede contribuir a la reducción de la adhesión de las uniones. ④ La translocación nuclear de PKP2 truncada está mediada por la fosforilación del su residuo S82 por parte de la kinasa C-TAK1[173]. Esto promueve su internalización mediante 14-3-3. Gracias a su interacción con  $\beta$ -CAT, la proteína PKP2 truncada podría translocarla al núcleo, compitiendo más eficazmente contra PG por su unión a los factores TCF/LEF.

Por otro lado, se observó una correlación entre las anomalías estructurales y ciertas proteínas de adhesión (Figuras 41-43). El remodelado de DSC2 y  $\beta$ -CAT, así como la reducción del contenido en PKP2-end, PG, DES y  $\beta$ -CAT, sugieren una menor adhesión entre las células[115, 176], lo que podría estar detrás de la dilatación en los ventrículos. Por último, los defectos electrofisiológicos estaban relacionados con anomalías en algunos canales (Figuras 48-51). El remodelado y reducción de CX43 y  $\text{Na}_v1.5$  ha sido previamente asociado a desordenes eléctricos[116, 140], lo que podría justificar los defectos electrofisiológicos encontrados en el modelo (Tabla 10). Todo ello nos ha permitido especular sobre los posibles mecanismos que subyacen a la enfermedad en el modelo. Esto nos ha llevado, finalmente, a diseñar una propuesta sobre tales mecanismos, los cuales se muestran en la Figura 52.

En definitiva, este estudio trata de esclarecer cómo afectan diferentes factores (genéticos y ambientales) en un modelo de ratón para PKP2 truncada. Además, se han analizado los substratos moleculares que subyacen a los síntomas en el modelo, tratando de vislumbrar la etiología de la enfermedad. Todos estos estudios tienen como objetivo último el de aportar información esencial al ámbito clínico y farmacológico, que permita un mayor conocimiento de la enfermedad así como el



descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. En los siguientes apartados se discuten, de manera pormenorizada, cada uno de los resultados y propuestas presentadas en esta sección.

## ***26. Ausencia de tejido fibro-adiposo en el modelo***

Una de las primeras afirmaciones obtenidas en este trabajo ha sido la ausencia de tejido fibro-adiposo en el modelo. Por un lado, los estudios moleculares en células HL-1 revelaron una actividad normal de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -cat en presencia de PKP2 truncada (Figura 36). Por otro, ninguno de los grupos transgénicos presentaba tejido fibro-adiposo en el corazón (Figura 27). Finalmente, esto llevó al desarrollo de un grupo animal de entrenamiento intensivo que acelerara el proceso degenerativo del corazón. Sin embargo, y a pesar de los defectos estructurales encontrados en este grupo, el ejercicio no inducía ningún tipo de remplazo en el tejido (Figura 30). En los siguientes apartados se debate sobre las posibles causas de esta ausencia de tejido fibro-adiposo en el modelo.

### **26.1. Expresividad variable del fenotipo**

De manera general, nuestro modelo presenta un fenotipo poco severo, con una esperanza de vida normal y algunas características patológicas que se pueden exacerbar en situaciones extremas. Asimismo, otros modelos animales desarrollan una sintomatología leve, los cuales tampoco muestran remplazo de tejido fibro-adiposo[126, 133, 142]. Sin embargo, existen modelos que presentan un fenotipo severo, con muerte prematura y desarrollo temprano de algún tipo de

reemplazo[105, 107]. Por tanto, parece existir una relación entre la presencia de reemplazo del tejido y la severidad de las anomalías cardíacas. Todo ello nos hizo plantearnos si la ausencia de tejido fibro-adiposo se debía a una baja expresividad del fenotipo en nuestro modelo. Además especulamos si la baja severidad de algunas líneas en nuestro modelo podía deberse a la ausencia de tejido fibro-adiposo.

En este sentido, es difícil discernir la relación entre las anomalías fisiológicas y la formación del tejido fibro-adiposo. En la práctica clínica, la detección de tejido fibro-adiposo ocurre en fases avanzadas de la patología, o incluso post-mortem[21]. La resonancia magnética nuclear o la biopsia cardíaca son métodos poco sensibles para la identificación de pequeños focos, lo cual podría impedir su detección temprana. Por otro lado, estudios experimentales indican que las primeras anomalías se desarrollan antes de la aparición del reemplazo del tejido[132, 177]. No obstante, los defectos cardíacos más severos en la MCA aparecen siempre asociados a cambios histológicos.

Sea como fuere, algunos grupos animales de este estudio estaban sometidos a grandes exigencias cardíacas, mostrando defectos importantes en ausencia de tejido fibro-adiposo. Por ejemplo, en el grupo TG-A se observaron anomalías ultraestructurales graves, dilatación y disfunción del VD y VI, así como un incremento sustancial de la inducibilidad de arritmias (Tabla 10). Por contra, otros modelos han mostrado similares anomalías en presencia de reemplazo del tejido[88, 105], lo que sugiere que estas anomalías no dependen del reemplazo del



tejido. Mecanismos independientes a estos defectos estructurales y electrofisiológicos parecen ser los únicos desencadenantes de la formación de tejido fibro-adiposo[137].

## **26.2. Efectos en la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -cat**

Para la formación del tejido fibro-adiposo es fundamental la translocación al núcleo de PG y la consiguiente supresión de la vía Wnt/ $\beta$ -cat[107, 137] (Figura 13). Aunque el des-ensamblaje del desmosoma y el remodelado de sus proteínas parece ser el mecanismo fundamental para ello, nuestro modelo no muestra remplazo a pesar de los defectos estructurales y moleculares sufridos. Tal y como demuestra el modelo celular, dicha vía tiene una actividad normal en presencia de PKP2 truncada (Figura 36), lo que apoya el hecho de la ausencia de tejido fibro-adiposo en el modelo animal. En este apartado se especula sobre los motivos que podrían favorecer la actividad normal de Wnt/ $\beta$ -cat en el modelo.

### *26.2.1. Tejido fibro-adiposo y PKP2 nuclear: ¿están ambos procesos conectados?*

En esta tesis se ha comprobado que la proteína PKP2 truncada Ser329X se acumula en tres fracciones sub-celulares: en la membrana (probablemente asociada a los discos intercalares), en el citosol y en el núcleo (Figuras 18, 34 y 35). Debido a la sobreexpresión de la proteína en el cardiomiocito, cabe la posibilidad de que las localizaciones citosólicas y nucleares fuesen artefactos. Sin embargo, existen evidencias que demuestran la localización de PKP2 en el núcleo de manera

natural[96, 99], lo que sugiere una localización fisiológicamente normal para nuestra proteína transgénica. No obstante, dentro del tejido cardíaco, PKP2 solo se acumula en los discos intercalares de los cardiomiocitos, tal y como se ha comprobado en esta tesis (Figuras 34 y 35). Por tanto, nuestros resultados indican que PKP2 truncada presenta una localización anómala dentro del tejido cardíaco, lo que podría alterar la expresión génica del cardiomiocito. Debido a los cambios de expresión que subyacen a la formación del tejido fibro-adiposo (Figura 13), nos planteamos si la fracción de proteína PKP2 truncada nuclear podría tener alguna implicación en la ausencia de este fenotipo.

Por un lado, parece que proteínas truncadas para PKP2 tienen mayor predisposición a su internalización al núcleo. La región N-terminal de PKP2 (0-351aa) se acumula principalmente en el núcleo, mientras que su región armadillo C-terminal (352-881aa), permanece en el citoplasma[100]. Además, la proteína truncada PKP2-I554X, que solo contiene 3 de los 9-10 dominios armadillo de la proteína, también tiene una localización nuclear *in vitro*[178]. Estos datos sugieren que la ausencia de algunos dominios armadillo en PKP2 truncada podría facilitar su translocación al núcleo.

Por otro, existe una señal específica de translocación nuclear para PKP2. Se trata de una secuencia aminoacídica presente en el dominio N-terminal de la proteína. PKP2 es diana natural de la quinasa *Cdc25C-associated kinase 1* (C-TAK1), la cual fosforila el residuo S82 de su secuencia para su translocación. Luego, la proteína de unión 14-3-3 reconoce la modificación e introduce a



PKP2 en el núcleo[173]. Por tanto, es posible que una PKP2 truncada que reduzca su interacción a través de los dominios armadillo sea más susceptible a la fosforilación por parte de C-TAK1, facilitando así su internalización al núcleo (④ en Figura 52).

Aunque el mecanismo de translocación nuclear de PKP2 es bien conocido, poco se sabe sobre su función allí. Se ha visto que PKP2 es capaz de interactuar con la ARN polimerasa III en el núcleo[96], aunque su función al respecto no ha sido aún investigada. Si bien, existen evidencias sobre la implicación de PKP2 en la regulación de la vía Wnt/ $\beta$ -cat. La supresión de PKP2 en células HL-1 inhibe la vía Wnt/ $\beta$ -cat[175], mientras que en células pro-epicárdicas induce la acumulación de lípidos[174]. Por contra, la sobreexpresión de PKP2 parece producir el efecto contrario. Recientemente se ha demostrado que su sobreexpresión en células mesenquimales derivadas de pacientes de MCA reduce el contenido de lípidos en estas células[179]. Más aún, se observa que ello activa la vía Wnt/ $\beta$ -cat[100], lo que confirma la modulación de PKP2 en el proceso adipogénico en los pacientes. Finalmente, se han aportado datos sobre el mecanismo en el que PKP2 podría actuar. Chen *et al.*, demostraron que PKP2 es capaz de interactuar directamente con  $\beta$ -CAT (Figura 10), sugiriendo que la modulación de la vía Wnt/ $\beta$ -cat se debe a que PKP2 es capaz de facilitar la translocación nuclear de  $\beta$ -CAT[100].

Todos estos datos en conjunto demuestran la participación directa o indirecta de PKP2 en la modulación de la vía Wnt/ $\beta$ -

cat, lo que nos ha permitido especular sobre los mecanismos que podrían acontecer en nuestro modelo (④ en Figura 52). En primer lugar, PKP2 truncada interacciona con  $\beta$ -CAT, ya que solo se requiere la región N-terminal de esta para su interacción con  $\beta$ -CAT[100]. Este hecho podría explicar los severos cambios de  $\beta$ -CAT en nuestro modelo. Por otro lado, la activa translocación de PKP2 truncada al núcleo apunta a que la localización nuclear de  $\beta$ -CAT podría verse aumentada en el modelo, bloqueando eventualmente la formación de tejido fibroadiposo (④ en Figura 52). Un estudio en profundidad sobre la acción de PKP2 truncada en el núcleo es necesario para testar esta hipótesis.

#### *26.2.2.El ratio PG/ $\beta$ -CAT en la formación de grasa*

En este trabajo se analizó la distribución y cantidad de PG y  $\beta$ -CAT como elementos fundamentales de la regulación de la vía Wnt/ $\beta$ -cat. Curiosamente, se observó una reducción del contenido de ambas proteínas en el tejido, lo cual podría afectar a la regulación de la vía de señalización (Figura 43).

La pérdida de la señal de PG en el tejido es un factor común a muchos pacientes de MCA, lo que ha llevado a sugerir a esta característica como criterio diagnóstico de la enfermedad[180]. Aunque esta observación parece contundente, poco se sabe acerca de los motivos moleculares que lo causan. Se ha propuesto que la pérdida de señal de PG es debida a su redistribución en la célula, lo que podría inducir su translocación al núcleo y la supresión de la vía Wnt/ $\beta$ -cat[180] (Figura 13). Sin embargo, ninguna señal de PG nuclear se detecta en el tejido





cardíaco de los pacientes, lo que podría deberse a la baja sensibilidad de la técnica inmunofluorescencia para detectar pequeñas cantidades de proteína. Finalmente, estudios mediante *western blot* parecen demostrar que existe una degradación de la proteína que subyace al fenotipo en los pacientes[175]. Todo ello sugiere que la reducción de PG en el tejido no afecta a la formación del tejido fibro-adiposo.

Por otro lado,  $\beta$ -CAT no muestra una distribución o contenido diferencial en pacientes y en otros modelos animales[177] que desarrollan tejido fibro-adiposo. Esto indica la particularidad de nuestro modelo en este sentido, hecho que podría estar relacionado con la ausencia de fenotipo. Es posible que la redistribución celular de  $\beta$ -CAT en nuestro modelo aumente su contenido en el núcleo, activando la vía Wnt/ $\beta$ -cat y evitando así la formación del tejido fibro-adiposo.

### **26.3. La infección como mecanismo desencadenante**

El descubrimiento realizado por Bowles *et al.*, en 2002 permitió indagar sobre una nueva teoría que explicaba el origen del tejido fibro-adiposo[124]. Este grupo describió por primera vez la presencia de ARN de origen viral en tejido cardíaco de pacientes con MCA, lo que sugería una participación directa de las infecciones en el desarrollo de la enfermedad. Desde entonces mucho se ha especulado sobre la posible implicación de agentes patógenos en la formación de tejido fibro-adiposo[123].

Los infiltrados inflamatorios son frecuentes entre los pacientes de MCA, lo que podría ser una consecuencia de la infección del tejido[123]. Asimismo, la miocarditis recuerda al proceso acontecido en los pacientes de MCA. Se han descrito casos donde una primera prospección sugería un diagnóstico de MCA, mientras que posteriores análisis revelaban una miocarditis aguda[181].

Además, parece que el efecto de los patógenos en el tejido podría ser indirecto, como consecuencia de la activación del sistema inmunitario aquí. Estudios experimentales *in vivo* han demostrado que la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS) genera miocarditis, con una especial afectación del VD[182]. Del mismo modo, el tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata con las citoquinas TNF- $\alpha$  (del inglés *tumor necrotic factor alpha*) y las interleuquinas IL-17 e IL-6 provocaba el remodelado de PG en cultivo. Es más, este efecto también se observaba en pacientes de sarcoidosis cardíaca[183], patología que genera una lesión granulomatosa y que mimetiza parte de los síntomas de la MCA[184].

En conjunto, estos resultados sugieren que una infección o reacción inflamatoria dentro del tejido cardíaco puede desencadenar la formación del tejido fibro-adiposo en pacientes genéticamente predispuestos[123]. Por tanto, el desarrollo de tejido fibro-adiposo en nuestro modelo podría estar supeditado a la inflamación cardíaca, de la cual los animales podrían estar protegidos en el ambiente “limpio” del animalario.



## **27. Fenotipo ultra-estructural**

El estudio ultra-estructural mostró una redistribución de los orgánulos, roturas de los discos intercalares y desorganización de los desmosomas (Figuras 31 y 33). Estas anomalías se concentraron principalmente en el grupo TG-A, mientras que el grupo TG-M no reveló ningún defecto destacable.

En un estudio ultra-estructural de tejido de pacientes se observaron alteraciones de los discos intercalares, con pequeñas separaciones entre las células y un menor contenido y longitud de los desmosomas[185]. Por contra, en el grupo animal TG-A se encontraron anomalías severas, caracterizadas por roturas de los discos intercalares y una evidente reducción del contenido y desorganización de desmosomas (Figura 32). Ello sugiere que el modelo animal muestra defectos ultra-estructurales más severos que los pacientes.

En este mismo trabajo, Basso *et al.*, cuantificaron la longitud de los desmosomas y su contenido en los discos, revelando así cambios no distinguibles durante la observación[185]. Por nuestra parte, la línea TG-M no muestra importantes modificaciones en la estructura de los discos intercalares y la organización de los desmosomas (Figura 32). Sin embargo, un análisis cuantitativo de algunas de estas características podría revelar anomalías no detectadas hasta ahora en esta línea.

Por otro lado, el tejido de pacientes de MCA mostraba una acumulación anormal de glucógeno en el citoplasma de los cardiomiocitos[185]. En esta tesis no se identificaron tales

observaciones, aunque se detectó una anormal organización de los orgánulos intracelulares en el grupo TG-A (Figuras 31 y 33). Estos acúmulos mitocondriales y espacios intracelulares recuerdan al fenotipo encontrado en ratones *knock-out* para el gen de la desmina (*Des*). Este modelo muestra una anómala acumulación de mitocondrias en tejido muscular[186], así como dilatación ventricular, hipertrofia y calcificación cardíaca[187]. En consonancia con esto, en esta tesis se ha observado una reducción del contenido de DES en la línea TG-A, lo que podría explicar el fenotipo ultra-estructural encontrado (Figura 33).

Por último, algunos modelos animales para el estudio de la MCA muestran graves anomalías ultra-estructurales, similares a las encontradas en la línea TG-A[88, 105, 140]. Sin embargo, en todos estos casos se observa un fenotipo muy severo, con baja viabilidad de los animales, rápida progresión de la enfermedad y algún tipo de remplazo del tejido. En contraposición al grupo TG-A, otros modelos animales sin remplazo del tejido (incluidos modelos para PKP2) muestran pocas o ninguna anomalía a este nivel de organización[126, 133, 142].

## **28. Defectos estructurales y funcionales del corazón en**

### ***la MCA***

Una de las características más importantes entre los pacientes de MCA son los defectos estructurales y funcionales del corazón. Su carácter degenerativo hace que estas anomalías pasen inadvertidas en las primeras fases de la enfermedad[26] (Figura 3). Sin embargo, la progresiva dilatación del ventrículo



lleva a una disfunción del mismo, que finalmente puede causar la muerte por fallo cardíaco progresivo, lo cual acontece hasta en un 59% de los casos[37].

Por otro lado, es conocido que el ejercicio intensivo afecta a las dimensiones y la función del corazón de los atletas, lo cual puede ser el origen de miocardiopatías adquiridas, con síntomas similares a la MCA[188]. Por eso, no es de extrañar que el ejercicio sea un factor de riesgo en la dilatación ventricular y la progresión de la MCA en los pacientes.

Como elemento de gran importancia en la patología, en esta tesis doctoral se ha evaluado la estructura y función del corazón en los diferentes grupos transgénicos, así como tras el ejercicio intensivo y el envejecimiento. Además, en búsqueda de las bases moleculares que originan los defectos estructurales en el modelo, se han estudiado algunas de las proteínas encargadas de la adhesión entre los cardiomiocitos. Todas estas cuestiones son discutidas en profundidad en los siguientes apartados.

### **28.1. Las mutaciones desmosomales y el remplazo fibro-adiposo en la dilatación cardíaca**

Parece bastante asumido que la presencia de tejido fibro-adiposo es el substrato fundamental para el desarrollo de las características típicas de la MCA. Sin embargo, la dificultad de detección de este tejido, sobre todo en fases tempranas de la enfermedad, imposibilita afirmar este hecho.

La irrupción de nuevos modelos animales parece haber dado un poco de luz en este sentido. Por ejemplo, el modelo de ratón haploinsuficiente para PG o el transgénico para PKP2-R735X muestran dilatación ventricular y disfunción en ausencia de tejido fibro-adiposo[126, 142]. Si bien tales modelos requieren de un desgaste cardíaco mediante ejercicio o envejecimiento para desarrollar tales defectos[126, 142], otros modelos con remplazo fibro-adiposo no precisan de ningún ejercicio para inducir las mismas anomalías[88, 89, 105]. Estos datos sugieren que el remplazo del tejido podría desencadenar la dilatación y disfunción cardíaca. Por contra, el grupo TG-A ha revelado similares defectos en ausencia de tejido fibro-adiposo o ejercicio (Tabla 10), desmintiendo la idea de que es necesario un remplazo para sufrir alteraciones estructurales. Sin embargo, los modelos animales con remplazo del tejido muestran estos defectos a una edad temprana[88, 89, 105], a diferencia de la línea TG-A. Un examen ecocardiográfico en animales más jóvenes de esta línea podría desvelar cuando comienzan tales defectos.

Otra evidencia importante de este trabajo es la implicación del VI en la patología (Figura 38). Aunque los defectos en el VD representan una de las características más definitorias de la MCA, hasta en un 76% de los casos existe también afectación biventricular, siendo la edad un factor determinante para ello[40]. Sin embargo, nuestros datos indican que ni la edad ni el ejercicio afectan de manera significativa a la función del VI, mientras que sí lo hace un alto contenido de proteína mutada (Tabla 10). Esta



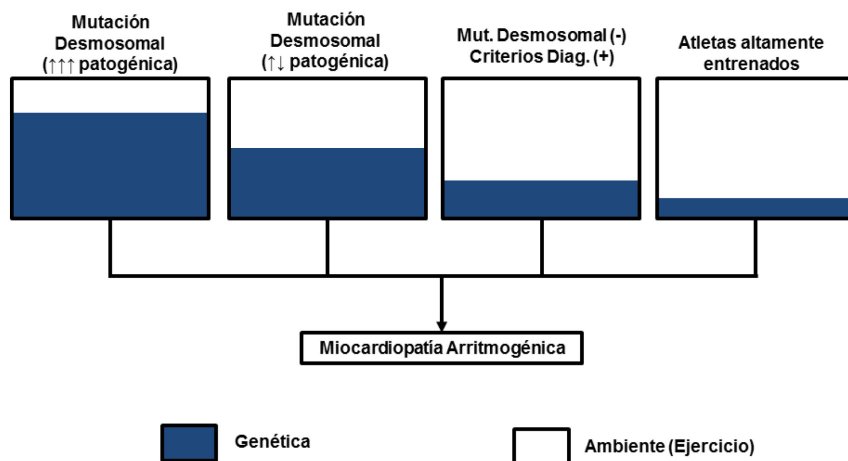
discrepancia con la realidad de los pacientes puede deberse a diversos factores. Por un lado, el VI es más resistente al desgaste debido a su mayor masa[189], lo que resulta en una menor susceptibilidad a desarrollar anomalías debido al estrés mecánico. Por tanto, un análisis en animales de mayor edad o que se hayan ejercitado durante más tiempo puede revelar dicho fenotipo. Finalmente, es posible que en presencia de tejido fibroadiposo en el modelo apareciese un fenotipo biventricular, como ha sido descrito en otros modelos[88, 140].

## **28.2. El desgaste cardíaco desencadena las anomalías estructurales en la MCA**

Como ya se ha descrito antes, el ejercicio y el envejecimiento han desencadenado las anomalías estructurales en los animales transgénicos. Dichas anomalías se han restringido al VD, siendo este muy sensible a dichos factores ambientales (Figura 37).

En humanos, el ejercicio intensivo induce la dilatación y disfunción del VD[189]. Debido a su menor grosor y masa, el estrés mecánico del VD durante el ejercicio puede ser hasta un 170% mayor que en reposo, mientras que para el VI apenas supera el 23%[172]. Entre otros factores, el aumento de la presión pulmonar durante el ejercicio facilita la sobrecarga del VD, lo cual aumenta aún más el estrés en su pared[172]. Por ende, los cambios fisiológicos agudos acontecidos durante el ejercicio generan una mayor exigencia cardíaca en el VD en comparación con el VI, lo que conlleva una mayor predisposición a posibles daños a largo plazo[188]. De hecho, los deportistas

de élite sanos muestran cambios estructurales y funcionales del corazón que recuerdan, en menor grado, a los defectos encontrados entre los pacientes de MCA[190]. Por tanto, durante el desarrollo de la MCA existe un equilibrio entre los factores ambientales y genéticos, que pueden ser claves en el proceso (Figura 53).



**Figura 53. Implicación genética y ambiental en el desarrollo de MCA.** Modificado y adaptado de Sawant *et al.*, 2014[191].

Existen estudios experimentales que avalan la dualidad de los factores (genéticos y ambientales) en el desenmascaramiento del fenotipo. Al igual que el modelo de PKP2 truncada presentado en este trabajo, la haploinsuficiencia de PG en ratón solo revelaba defectos estructurales tras un ejercicio intensivo[126]. Más tarde, Fabritz *et al.*, demostraron que, reduciendo la carga del VD mediante diuréticos, se prevenía la dilatación ventricular en este modelo[127]. Ello demuestra que, a pesar de ser portadores de mutaciones, el desarrollo de la





enfermedad también depende, en gran medida, de factores ambientales (Figura 53). En este sentido, nuestro modelo demuestra la necesidad de defectos genéticos para la aparición de los síntomas. Sin embargo, en dosis bajas de proteína transgénica, el ejercicio y el envejecimiento representan los factores más determinantes en el desarrollo de dicho fenotipo.

### **28.3. Las proteínas de adhesión como causa de los defectos estructurales**

Como resultado de las alteraciones encontradas en la estructura del corazón, en este trabajo se quiso analizar algunas de las moléculas candidatas de promover el fenotipo. El esfuerzo se centró en el estudio de proteínas relacionadas con el soporte mecánico en los cardiomiocitos presentes en el disco intercalar (Figuras 39, 40 y 43).

El análisis por inmunofluorescencia reveló una normal localización e intensidad de señal para PG y DSP (Figuras 39 y 40). Sin embargo, se observó el remodelado de DSC2 en cardiomiocitos de animales TG-A (Figura 41). Se ha demostrado que el remodelado de DSC2 altera la adhesión entre los cardiomiocitos *in vitro*[87], lo que podría contribuir a la dilatación del VD en este modelo. Además, su acumulación en el citoplasma indica un posible bloqueo del tráfico de la molécula hacia la membrana. De hecho, PKP2 participa de manera activa en el correcto tráfico de esta proteína hacia la membrana[97], lo que podría verse alterado con la presencia de PKP2 truncada (③ en Figura 52).

Por otro lado, esta tesis ha desvelado, por primera vez, la alteración de  $\beta$ -CAT debida a una mutación en PKP2. La señal de  $\beta$ -CAT va progresivamente reduciéndose con el aumento de la cantidad de transgén, lo que resulta en una redistribución de  $\beta$ -CAT por el citoplasma en animales TG-A (Figura 42). Además, esto provoca una reducción del contenido de la proteína total en corazón (Figura 43), lo que indica que la presencia de PKP2 truncada afecta de manera decisiva a su estabilidad. Aunque ninguna referencia de esta proteína ha sido reportada entre los pacientes, algunos autores han sugerido su importancia en la MCA. Por ejemplo, *Li et al.*, en 2011 demostraron que el *knock-out* de PG en ratón incrementa los niveles de expresión de  $\beta$ -CAT, como un mecanismo compensatorio[129], mientras que el doble *knock-out* PG/ $\beta$ -CAT promueve un fenotipo de MCA más severo[192].

El análisis mediante *Western blot* también ha demostrado la reducción del contenido de PKP2 endógena, PG y DES (Figura 43). Por un lado, la reducción de PKP2 endógena sugiere una desestabilización de la proteína nativa en el tejido, que puede llevar a su degradación debido a la competencia con PKP2 truncada (Figura 52). No obstante, se ha demostrado que la presencia de mutaciones en PKP2 puede suprimir la expresión del gen en pacientes[170]. Por tanto, un análisis de la expresión del transcrito de PKP2 endógeno podría contrastar estos resultados.

Por otro lado, el contenido de PG también se ve reducido ~45% en el modelo (Figura 43). Este hecho ha sido ampliamente



descrito en tejido miocárdico de pacientes[193-195], lo que ha llevado a proponer este fenotipo como un nuevo criterio diagnóstico de la enfermedad[180]. Por último, la reducción del contenido de DES no ha sido descrita anteriormente, aunque sí su deslocalización en los discos intercalares de pacientes del síndrome de Carvajal[195].

Aunque los datos aportados por la cuantificación de proteínas parecen concluyentes, en muchos casos no coinciden con las observaciones realizadas por las inmunofluorescencias. Ello puede ser debido a las limitaciones que presenta la técnica[134, 180]. Se trata de un método cualitativo, que depende en gran medida del grosor y sentido de la sección, la composición del tejido, la fijación de las muestras y el observador, lo que dificulta alcanzar conclusiones claras[170]. Aunque también tenga sus limitaciones, un estudio semi-cuantitativo de la intensidad de fluorescencia para cada proteína en el tejido podría aportar un dato más riguroso al respecto.

Finalmente, hay que tener en cuenta que los estudios sobre el contenido de proteínas han sido realizados sobre la fracción ventricular de los corazones. El grosor de la pared del VI en ratón supera en tres veces la del VD[196]. Por ello, los efectos producidos en el VD (previsiblemente más severos) han podido quedar diluidos por la gran masa que representa el VI. De hecho, se ha observado la correlación entre los defectos del VI y la alteración de proteínas de adhesión, procesos que parecen estar conectados (Tabla 10). Aunque el estudio se centró en el efecto global del transgén sobre las proteínas del corazón, un

análisis de ambos ventrículos por separado permitiría conocer la especificidad anatómica de estas alteraciones.

En conjunto, los datos moleculares aportados en este estudio revelan un remodelado y una reducción del contenido de proteínas de anclaje en los animales TG-A (Tabla 10). Esto sugiere que, a partir de un cierto contenido de PKP2 truncada en el tejido, la integridad u/y organización de las proteínas estructurales dentro del tejido puede verse comprometida. Como consecuencia, la adhesión célula-célula se reduce, lo que deriva en una dilatación ventricular (② en Figura 52). No obstante, hay que tener en cuenta que no se han estudiado los niveles de transcrito para las diferentes proteínas. Ello nos permitiría conocer si la reducción de estas proteínas en el tejido se debe a una desestabilización de las mismas o a una represión de su expresión génica.

### ***29. Anomalías eléctricas en el modelo de PKP2 truncada***

Todas las enfermedades de MSC tienen en común la aparición de arritmias que, finalmente, desencadenan la fibrilación y la muerte del paciente. En la MCA, la degeneración cardíaca provoca eventos arrítmicos cada vez más frecuentes (Figura 3). Sin embargo, las MSC por fibrilación ventricular solo suponen un tercio del total entre los pacientes[37]. Por contra, la muerte por este mecanismo se dispara entre jóvenes y atletas con MCA [26, 171]. Se especula que la alta incidencia de MSC en este grupo se relaciona con una fase de progresión de la enfermedad,



debida a una apoptosis masiva o una inflamación del tejido que provoca arritmias más inestables. Sin embargo, en pacientes de mayor edad se alcanza una fase estacionaria, donde se generan taquiarritmias ventriculares más estables y, por tanto, menos susceptibles a generar la fibrilación[26].

Por otra parte, aunque el tejido fibro-adiposo tiene un papel importante en todo este proceso (Figura 12), ahora se sabe que las anomalías eléctricas son independientes de este remplazo[126, 132]. Si bien se sospecha que estos defectos se originan por la alteración del acoplamiento eléctrico entre los cardiomiocitos, poco se conoce sobre el mecanismo molecular que lo origina.

Gracias a las características únicas de nuestro modelo, se han podido desvelar varias características aún desconocidas de la MCA: i) el efecto de una PKP2 truncada en ausencia de tejido fibro-adiposo ii) el comportamiento eléctrico del corazón en diferentes situaciones ambientales y iii) los mecanismos moleculares que alteran el acoplamiento eléctrico en el tejido.

### **29.1. Implicación de PKP2 truncada en la actividad eléctrica del corazón**

El estudio electrocardiográfico solo reveló la prolongación del complejo QRS en el grupo TG-A (Figura 44), lo que coincide con los defectos ultra-estructurales y la disfunción del VI, procesos que podrían estar conectados.

Por otro lado, ningún otro modelo animal presenta defectos tan evidentes sobre el intervalo PR o el A-H (Figura 45 y Tabla 7). Esto sugiere que la mutación PKP2-Ser329 afecta de manera específica al sistema de conducción cardíaco. En este sentido, los defectos encontrados en proteínas encargadas del acoplamiento eléctrico pueden explicar parte de estos resultados (Figuras 48, 49 y 51). Sin embargo, la particularidad de este fenotipo hace pensar en proteínas expresadas específicamente en el sistema de conducción. Por ejemplo, las conexinas 40 y 45 (CX40, CX45) se expresan mayoritariamente en el haz de His y las ramas derecha e izquierda del corazón[79]. Asimismo, el *knock-out* de *Cx40* en ratón altera los parámetros del ECG[197, 198], mientras que el *knock-out* para *Cx45* provoca específicamente una prolongación del intervalo PR, A-H y H-V[199]. Es más, existen datos que demuestran una reducción en la expresión de CX40 y CX45 en pacientes[200]. Todo ello las convierten en candidatas ideales para testar cuál es origen de las alteraciones en el sistema de conducción en este modelo.

Al margen de las alteraciones del ECG, se observó un aumento de la inducibilidad de arritmias en los animales (Figura 47). Dicha inducción era más frecuente cuanto mayor era el contenido de transgén, siendo los animales del grupo TG-A los más fácilmente inducibles. Una similar proporción de animales inducibles se observó en los grupos TG-B y TG-M. Este resultado podría deberse a dos motivos: primero, es probable que un estudio con mayor número de animales en cada grupo permitiera ver estas diferencias. Segundo, puede que el



protocolo de inducibilidad realizado no fuese el más óptimo para detectar diferencias entre ambos grupos.

En este sentido, los defectos moleculares en CX43 y Na<sub>v</sub>1.5 pueden afectar de manera decisiva a la inducibilidad. Una menor expresión de CX43 o Na<sub>v</sub>1.5 se ha relacionado con algunos síndromes arrítmicos y MSC en pacientes[201, 202], hecho que ha sido corroborado en modelos animales[80, 203]. Mientras que el grupo TG-A muestra una reducción y remodelado claro de ambos canales, el grupo TG-M muestra un fenotipo más leve (Tabla 10).

Por último, parece evidente que la reducción de la adhesión celular y las roturas entre cardiomiocitos han determinado, en parte, el alto porcentaje de animales inducidos en el grupo TG-A. En concordancia con estos datos, el modelo de ratón para DSG2-N271S muestra defectos electrofisiológicos asociados a cambios ultra-estructurales sin ningún tipo de remplazo del tejido[132]. Parece que todo ello contribuye al severo fenotipo electrofisiológico presentado en el grupo TG-A.

## **29.2. Defectos eléctricos derivados del envejecimiento y el ejercicio**

Como uno de los objetivos principales de esta tesis, se ha desvelado la influencia del ejercicio y la edad en las propiedades electrofisiológicas. Como conclusión, se ha demostrado que tales factores no inducen defectos eléctricos en este modelo, aunque sí son dependientes del contenido de PKP2 truncada (Tabla 10).

En primer lugar, el envejecimiento en los distintos grupos no alteraba de manera significativa los parámetros derivados del ECG (Tabla 7 y Figura 45). Estos resultados contradicen la idea de que la progresión de la enfermedad conlleva una peor conducción eléctrica (Figura 3). Es posible que el progresivo remplazo de tejido fibro-adiposo en los pacientes afecte a esta característica. Por otra parte, los datos sugieren que los defectos del ECG podrían estar presentes desde el nacimiento de los animales en este modelo. Un análisis más exhaustivo sería necesario para contrastar esta idea.

En este estudio también trabajamos sobre la hipótesis de que el ejercicio afectaba de manera crítica a los parámetros del ECG y a la inducción de arritmias. Curiosamente, la actividad física intensa no altera los parámetros del ECG ni incrementa la inducibilidad de arritmias ventriculares en los grupos TG-B y TG-M (Tabla 10). Estos resultados contradicen una extensa bibliografía, donde se observan efectos negativos del ejercicio intensivo a largo plazo. Se sabe que los atletas desarrollan disfunción del VD y un aumento de arritmias ventriculares debido al remodelado cardíaco[172, 189], efectos que se exacerban en pacientes de MCA[30]. En concordancia con estos datos, modelos animales sometidos a ejercicio intensivo en cinta corredora muestran un aumento de la duración del complejo QRS y la inducibilidad de arritmias[157]. Por ello, las razones del fenotipo encontrado en el modelo no están claras.

Por un lado, es posible que el protocolo de entrenamiento utilizado en este trabajo no sea adecuado para detectar un





aumento de inducibilidad en los grupos transgénicos. Sin embargo, pudimos confirmar que el ejercicio aumentaba la incidencia de arritmias en ratones WT, corroborando así el efecto observado en otros modelos animales y en humanos[126, 157, 204]. Además, los grupos corredores mostraron un aumento significativo de la duración del QRS derivado del ejercicio (Figura 45), aunque esto era independiente del genotipo.

Por último, es posible que solo el grupo TG-A sea susceptible a una mayor inducibilidad tras el entrenamiento intensivo, aunque, desafortunadamente, dicho grupo no fue desarrollado.

### **29.3. PKP2 es esencial en la estabilidad de los canales iónicos**

Además de su función mecánica, las proteínas desmosomales actúan como soporte de proteínas encargadas del acoplamiento eléctrico dentro del tejido[118]. Por tanto, es factible que los defectos electrofisiológicos encontrados en este modelo se basen en el incorrecto acoplamiento eléctrico entre cardiomiocitos. En este sentido, es sabido que PKP2 interacciona con los canales CX43 y Na<sub>v</sub>1.5 en el tejido[102, 205], los cuales son elementos esenciales en el PA cardíaco y el acoplamiento eléctrico (Figura 11). Por todo ello, quisimos conocer el efecto de PKP2 truncada en la estabilidad de estos canales en el tejido.

En contraste con las proteínas estructurales, los canales CX43 y Na<sub>v</sub>1.5 mostraron cambios más severos en su localización y

contenido en el modelo (Figuras 48, 49 y 51). Muchos son los estudios que apuntan a que estas proteínas son especialmente sensibles a defectos en PKP2. La mutación o supresión de PKP2 provoca el remodelado y/o la reducción de  $\text{Na}_v1.5$  y CX43 *in vitro*[101, 102, 115]. Además, este efecto genera una menor velocidad de conducción, bajada en la corriente de sodio y arritmogénesis *in vivo*[133, 142, 206]. De hecho, estudios histológicos en biopsias de paciente de MCA han demostrado un remodelado de ambas proteínas en el tejido [134, 135, 177, 193] lo cual podría representar un factor clave en la patogénesis de la MCA. Con todo ello, es probable que los defectos eléctricos de este modelo vengan determinados, en gran medida, por los defectos hallados en la localización y contenido de CX43 y  $\text{Na}_v1.5$  (① en Figura 52).

Desde una perspectiva molecular, las anomalías encontradas en nuestro modelo pueden deberse a la interacción directa o indirecta de PKP2 truncada con CX43 y  $\text{Na}_v1.5$ . Curiosamente, solo se requiere el dominio N´terminal de PKP2 para interactuar con estas proteínas[101, 102, 205] (Figura 10). Esto sugiere que PKP2 truncada podría competir con PKP2 endógena por su unión a CX43 y  $\text{Na}_v1.5$ . Finalmente, la ausencia del dominio armadillo puede alterar procesos necesarios para el reclutamiento o la estabilidad de estas proteínas en la membrana.

Las anomalías encontradas en CX43 pueden estar potenciadas por otras interacciones en el disco intercalar. El grupo de Shaw *et al.*, demostró en 2007 que el tráfico de CX43 hacia la



membrana plasmática venía determinada por el extremo (+) de los microtúbulos. Además, se requería de la presencia de  $\beta$ -CAT para su anclaje a la membrana, por lo que la supresión de esta limitaba la integración de CX43 aquí, reduciendo así el tamaño de las uniones tipo GAP[207]. Como se ha descrito en esta tesis, la reducción y el remodelado de  $\beta$ -CAT eran evidentes en el modelo (Figuras 42 y 43). Por tanto, es factible que el efecto de PKP2 sobre CX43 venga en parte determinado por su acción en la redistribución y degradación de  $\beta$ -CAT.

Por último, algunos estudios han descrito que el canal  $\text{Na}_v1.5$  forma parte de un complejo proteico junto a PKP2 y ANK-G dentro del tejido[115] (Figura 7). Ello parece estabilizar al canal  $\text{Na}_v1.5$  en la membrana, ya que la supresión de PKP2 o ANK-G *in vitro* promueve el remodelado y degradado de esta[115]. Además, el *knock-out* de *Ank-G* en ratón induce la redistribución de PKP2, así como su sobre-expresión, probablemente debido a un mecanismo compensatorio[116]. Por tanto, el estudio de ANK-G en el modelo podría aportar nuevas evidencias de la implicación de esta proteína en la MCA.

### **30. Interpretación clínica de los resultados**

Hasta hace pocos años, se creía que cada enfermedad hereditaria causante de MSC se asociaba a un grupo de genes concretos. Sin embargo, cada vez más estudios demuestran el solapamiento de genes entre las diferentes enfermedades, contradiciendo así este dogma. Por ejemplo, el gen *Lamina A/C* (*LMNA*) ha sido asociado a las miocardiopatías MCH, MCD y

MCA, mientras que *SCN5A* se asocia a canalopatías como QT largo, QT corto o SBr. El gen *PKP2* tampoco queda al margen de estos descubrimientos. Recientemente, mutaciones en el gen codificante para *PKP2* han sido asociadas a la MCD o al SBr, lo que indica la complejidad etiológica de este tipo de patologías.

Por otro lado, en este trabajo se han desarrollado tres líneas transgénicas, las cuales han sido estudiadas en diferentes situaciones fisiológicas. Esto ha generado hasta 15 grupos experimentales distintos para algunos experimentos (p.ej. el análisis de ECG). Como resultado, se ha obtenido un abanico de fenotipos diferentes, con una sintomatología desigual para cada grupo (Tabla 10), lo que ha provocado que algunos de ellos no cumplan las características establecidas para la MCA (Tabla 1).

Gracias a la nueva asociación de *PKP2* con otras enfermedades, y a la diversidad de fenotipos obtenidos en este trabajo, nos hemos planteado si nuestro modelo puede asociarse también a otras enfermedades similares a la MCA. Los siguientes apartados tratan de establecer la posible relación del modelo con la MCD y el SBr.

### **30.1. Concepto de “Miocardiopatía Arritmogénica” asociada a MCA y MCD**

La MCA y MCD son enfermedades muy relacionadas, que presentan una sintomatología similar. Ello provoca, irremediablemente, un solapamiento de los criterios diagnósticos entre ellas, que puede llevar a un diagnóstico erróneo[208]. Aunque la fisiopatología sea similar, también se ha observado



que comparten una etiología genética común. Los genes desmosomales *DSG2*, *DSC2*, *PKP2* y *DSP* han sido ya asociados a la MCD[18, 209, 210].

En algunos de estos casos, el diagnóstico del paciente es aún, si cabe, más complejo. Por un lado, se sabe que algunas mutaciones en *DSP* son causantes de una variante de MCA que afecta predominantemente al VI[211-213]. Por otro, se ha demostrado que pacientes diagnosticados de MCD y portadores de mutaciones en *DSP* presentan remplazo de tejido fibroadiposo[214]. Todo ello apunta a que las mutaciones desmosomales son capaces de generar fenotipos intermedios entre ambas enfermedades.

Por último, en el estudio de Van der Zwaag *et al.*, de 2012, se observó que la mutación R14del en el gen codificante para Fosfolamban (*PLN*) era capaz de producir tanto MCA como MCD en los pacientes[215]. Este trabajo demostró que ambas enfermedades forman parte de una misma entidad patológica, lo que los autores denominaron como “Miocardiopatía Arritmogénica”. De esta forma, MCA y MCD pueden presentar el mismo substrato patogénico, aunque con una manifestación diferente, probablemente determinada por el fondo genético y/o la acción del ambiente[208].

### **30.2. Relación entre MCA y SBr: Implicación del canal Na<sub>v</sub>1.5**

El síndrome de Brugada (SBr) es una canalopatía causante de MSC, caracterizada por un patrón anómalo del ECG, arritmias y

fibrilación ventricular. Se trata de una enfermedad genética, donde entorno un 20-25% de las mutaciones encontradas se acumulan en el gen codificante para la subunidad  $\alpha$  del canal  $\text{Na}_v1.5$  (gen *SCN5A*). Dichas mutaciones resultan en una pérdida de función de la proteína[202]. Curiosamente, y a pesar de tratarse de una canalopatía, también se han descrito mutaciones en el gen *PKP2* asociadas a pacientes de SBr [206]. En este sentido, existen estudios que relacionan íntimamente ambas proteínas en el tejido cardíaco y que podrían explicar tales observaciones[102, 115, 133]. En concordancia con estos datos, se ha confirmado que la proteína *PKP2* truncada afecta de manera decisiva al contenido de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio cardíaco ( $\text{Na}_v1.5$ ) en nuestro modelo (Figuras 49 y 51).

Asimismo, Cerrone *et al.*, demostraron por primera vez el déficit de función del canal de  $\text{Na}_v1.5$  en presencia de mutaciones *missense* de *PKP2* descritas en pacientes de SBr[206]. Estos datos sugerían que ciertas mutaciones de *PKP2* pueden ejercer un efecto directo sobre la función del canal de  $\text{Na}_v1.5$ , sin un aparente remodelado estructural del corazón. Asimismo, pacientes de MCA portadores de mutaciones *missense* en *PKP2* desarrollan un patrón de ECG característico de SBr[216], lo que demuestra el solapamiento de ambas enfermedades.

Finalmente, parece que los cambios acontecidos en el corazón de pacientes de SBr no solo afectan a la electrofisiología. Van Hoorn *et al.*, describieron alteraciones estructurales y funcionales del corazón asociadas a pacientes del SBr y portadores de mutaciones en el canal  $\text{Na}_v1.5$ [217]. Los



pacientes mostraban dilatación del RVOT y acortamiento de la fracción de acortamiento del VI, así como otros defectos eléctricos tales como la prolongación del intervalo PR o del complejo QRS. Del mismo modo, el modelo animal descrito en esta tesis mostraba similares defectos estructurales y eléctricos (Tabla 10).

Todos estos datos demuestran la íntima relación que existe entre PKP2 y Na<sub>v</sub>1.5 en el tejido. Esto se refleja en una sintomatología variable entre MCA y SBr entre los pacientes, que sugiere que los límites entre ambas enfermedades no están bien establecidos[70].

### **31. Repercusión del estudio y perspectivas**

Gracias a su alta frecuencia entre los pacientes, el estudio de las bases biológicas de mutaciones en *PKP2* supone el mayor reto para el entendimiento de esta patología. En este sentido, nuestro trabajo analiza el modelo más representativo de la enfermedad en humanos hasta el momento: el truncamiento de la proteína PKP2. Además, se han estudiado los principales factores genéticos y ambientales que podrían afectar al desenmascaramiento y el desarrollo de la MCA en este modelo. Todo ello hace de esta tesis doctoral el trabajo más completo desarrollado para una mutación en PKP2 hasta el momento.

Aunque está bastante asumido que la presencia de una proteína PKP2 mutada en el tejido es el causante de la enfermedad, recientes trabajos matizan este hecho. Rasmussen *et al.*, demostraron que mutaciones de *PKP2* en pacientes reduce la

expresión de este gen, lo que sugiere que el efecto patogénico es, al menos en parte, provocada por la haploinsuficiencia del gen[170]. En este sentido, nosotros observamos una reducción de PKP2 endógena asociada al aumento de dosis de PKP2 truncada en la línea TG-A, lo que podría explicar, en parte, el fenotipo tan severo encontrado en este grupo. Todo ello demuestra que PKP2 truncada tiene un efecto dominante negativo por la competición con PKP2 endógena en el modelo. Además, el balance entre el contenido de proteína mutada y nativa en el tejido podría ser determinante para el desarrollo de la MCA en los pacientes.

El remplazo de tejido fibro-adiposo es una de las características más representativas de la enfermedad, y un proceso clave en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, como demuestra este trabajo, la presencia de infiltrados fibro-adiposos no es necesaria para desencadenar la MCA, tal y como ya ha sido demostrado en otros modelos[126, 142]. Esto nos ha permitido especular sobre los motivos de este fenotipo, abriendo la puerta a nuevas investigaciones sobre los mecanismos que lo regulan (④ en Figura 52). Además, la ausencia de tejido fibro-adiposo ha permitido revelar características que podrían haber quedado enmascaradas en presencia de este remplazo.

En relación con esto, hemos descrito una evolución diferencial entre las características estructurales y eléctricas en el modelo. Mientras que el contenido del transgén afectaba por igual a ambas características, el ejercicio intensivo y la edad provocaban la dilatación del VD, pero ningún cambio en las





propiedades eléctricas del corazón (Tabla 10). Se trata de la primera descripción de una afectación diferencial entre ambas características.

En este sentido, el fenotipo de este modelo podría estar condicionado específicamente por la mutación PKP2-S329. Es probable que mutaciones en otras regiones de la proteína determinen la aparición de un fenotipo diferente. Pacientes portadores de distintas proteínas PKP2 truncadas muestran una sintomatología y penetrancia dispar[59]. Esto sugiere una fuerte dependencia del sitio de mutación entre los pacientes de MCA con mutaciones en *PKP2*[59, 218]. Por tanto, es posible que el estudio de otra PKP2 truncada en un modelo animal revelara un fenotipo diferente a nuestro modelo.

Aunque investigaciones más profundas son necesarias, en este trabajo se han descrito moléculas potencialmente implicadas en el desarrollo de la patología. Las anomalías en proteínas de adhesión sugiere un efecto directo en la rotura de los discos intercalares y la dilatación del VD, mientras que el remodelado y reducción de CX43 y  $\text{Na}_v1.5$  representan los principales factores que pueden determinar los defectos eléctricos. Estos resultados en conjunto, nos ha permitido especular sobre los mecanismos moleculares que subyacen al fenotipo encontrado en el modelo (Figura 52). Un análisis más pormenorizado de estos mecanismos permitirá identificar la contribución de cada proteína en la MCA, así como nuevas proteínas implicadas en el proceso.

Por último, la diferente sintomatología encontrada en el modelo apoya las nuevas evidencias que relacionan la MCA con la MCD y el SBr. Por un lado, se encuentra la relación entre la MCA y MCD, las cuales pueden estar determinadas por una entidad patológica común[208, 215]. Por otro, la alteración del canal  $Na_v1.5$  en el modelo sugiere un importante papel de PKP2 en su estabilidad. Muchos trabajos apuntan también en este sentido[102, 133], sugiriendo que ello puede ser un factor clave para el desarrollo del SBr[70], lo cual ha sido demostrado clínicamente[206, 216]. Todo esto permite especular sobre un cambio en el paradigma entre las enfermedades hereditarias causantes de MSC, estableciendo una nueva relación entre las canalopatías y las miocardiopatías. Este trabajo abre el camino a una nueva perspectiva en el estudio de las enfermedades hereditarias causantes de MSC.





## **VI. Conclusiones**

---





1. El tejido fibro-adiposo no es esencial para el desarrollo de MCA en el modelo de ratón para PKP2-Ser329X.
2. PKP2 truncada tiene un efecto dominante negativo en el modelo animal. Asimismo, el balance entre el contenido de PKP2 truncada y nativa puede representar un factor clave en el desarrollo de la MCA.
3. La aparición de los defectos estructurales están relacionados con el contenido de PKP2 truncada, el ejercicio físico intensivo y el envejecimiento.
4. La pérdida de desmosomas y la rotura de discos intercalares en los cardiomiocitos son debidos a las alteraciones de las proteínas de adhesión celular. Tales anomalías moleculares están asociadas a los defectos estructurales en el modelo.
5. La aparición y la severidad de las alteraciones electrofisiológicas son función del contenido de PKP2 truncada en el tejido. Sin embargo, el ejercicio físico intenso o el envejecimiento no afectan a las propiedades eléctricas en el modelo animal.
6. El remodelado y reducción de los canales CX43 y Na<sub>v</sub>1.5 están asociados a las anomalías eléctricas del corazón.

7. Los defectos estructurales y electrofisiológicos se desarrollan de manera separada en el modelo, indicando que existen entidades moleculares diferentes implicadas en cada una de las características.







## **VII. Referencias Bibliográficas**

---





- 
- [1] D. P. Zipes and M. Rubart. Neural modulation of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death, *Heart Rhythm*. vol. 3, pp. 108-113, 2006.
- [2] A. L. George, Molecular and genetic basis of sudden cardiac death, *J Clin Invest*, vol. 123, pp. 75-83, 2013.
- [3] J. C. Lopshire y D. P. Zipes. Sudden cardiac death: better understanding of risks, mechanisms, and treatment, *Circulation*, vol. 114, pp. 1134-1136, 2006.
- [4] J. J. Goldberger, A. E. Buxton, M. Cain, O. Costantini, D. V. Exner, B. P. Knight, *et al.*, Risk stratification for arrhythmic sudden cardiac death: identifying the roadblocks, *Circulation*, vol. 123, pp. 2423-2430, 2011.
- [5] J. A. Guzzo y K. Nanda, Sudden Cardiac Death. *Prim Care Update Ob Gyns*, vol. 3, pp. 130-134, 1996.
- [6] L. B. Becker, D. W. Smith, y K. V. Rhodes. Incidence of cardiac arrest: a neglected factor in evaluating survival rates, *In Ann Emerg Med*. vol. 22, pp. 86-91, 1993.
- [7] R. Virmani, A. P. Burke, y A. Farb. Sudden cardiac death, *Cardiovasc Pathol*, vol. 10, pp. 275-282, 2001.
- [8] S. G. Priori, E. Aliot, C. Blomstrom-Lundqvist, L. Bossaert, G. Breithardt, P. Brugada, *et al.*, Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology, *Europace*, vol. 4, pp. 3-18, 2002.

- [9] C. Atwood, M. S. Eisenberg, J. Herlitz, y T. D. Rea. Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe, *Resuscitation*. vol. 67, pp. 75-80, 2005.
- [10] D. P. Zipes y H. J. Wellens. Sudden cardiac death, *Circulation*, vol. 98, pp. 2334-2351, 1998.
- [11] P. Kubuš y J. Janoušek. Sudden cardiac death in children and young adults—epidemiology and prevention, *Cor et Vasa*, vol. 54, pp.223-226, 2012.
- [12] D. Corrado, C. Basso, A. Pavei, P. Michieli, M. Schiavon, y G. Thiene. Trends in sudden cardiovascular death in young competitive athletes after implementation of a preparticipation screening program, *JAMA*, vol. 296, pp. 1593-601, 2006.
- [13] P. Elliott, B. Andersson, E. Arbustini, Z. Bilinska, F. Cecchi, P. Charron, *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*, vol. 29, pp. 270-286, 2008.
- [14] O. Campuzano, G. Sarquella-Brugada, R. Brugada, y J. Brugada. Genetics of channelopathies associated with sudden cardiac death, *Glob Cardiol Sci Pract*. vol. 39, 2015.
- [15] H. Riuro, O. Campuzano, E. Arbelo, A. Iglesias, M. Batlle, F. Perez-Villa, *et al.*,. A missense mutation in the sodium



- channel beta1b subunit reveals SCN1B as a susceptibility gene underlying long QT syndrome, *Heart Rhythm*, vol. 11, pp. 1202-1219, 2014.
- [16] O. Campuzano, M. Alcalde, C. Allegue, A. Iglesias, P. García-Pavía, S. Partemi, *et al.*, Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *J Med Genet*, vol. 50, pp. 280-289, 2013.
- [17] C. Y. Ho, P. Charron, P. Richard, F. Girolami, K. Y. Van Spaendonck-Zwarts, y Y. Pinto, Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art, in *Cardiovasc Res*. vol. 105, pp. 397-408, 2015.
- [18] J. Haas, K. S. Frese, B. Peil, W. Kloos, A. Keller, R. Nietsch, *et al.*, Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy, *Eur Heart J*, vol. 36, pp.1123-1135 2014.
- [19] K. Y. van Spaendonck-Zwarts, M. P. van den Berg, y J. P. van Tintelen. DNA analysis in inherited cardiomyopathies: current status and clinical relevance, *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 31 , pp. S46-9, 2008.
- [20] J. J. Goldberger, M. E. Cain, S. H. Hohnloser, A. H. Kadish, B. P. Knight, M. S. Lauer, *et al.*, American Heart Association/american College of Cardiology Foundation/heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death: a scientific

- statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention, *Heart Rhythm*, vol. 5, pp. e1-21, 2008.
- [21] G. Thiene, D. Corrado, y C. Basso. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia, *Orphanet J Rare Dis*, vol. 2, pp. e1-16, 2007.
- [22] G. M. Lancisi. De Motu Cordis et Aneurysmatibus Opus Posthumum In Duas Partes Divisum, ed. Naples, 1736.
- [23] C. Basso, B. Bauce, D. Corrado, y G. Thiene. Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy, *Nat Rev Cardiol*, vol. 9, pp. 223-233, 2012.
- [24] G. Fontaine, R. Frank, J. L. Tonet, G. Guiraudon, C. Cabrol, G. Chomette, y Y. Grosogeat. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a clinical model for the study of chronic ventricular tachycardia, *Jpn Circ J*, vol. 48, pp. 515-538, 1984.
- [25] F. I. Marcus, G. H. Fontaine, G. Guiraudon, R. Frank, J. L. Laurenceau, C. Malergue, y Y. Grosogeat, Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases, *Circulation*, vol. 65, pp. 384-398, 1982.
- [26] C. Basso, D. Corrado, F. I. Marcus, A. Nava, y G. Thiene. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Lancet*, vol. 373, pp. 1289-1300, 2009.





- 
- [27] F. I. Marcus. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy (ARVD/C): we've come a long way, baby, *Trends Cardiovasc Med*, vol. 25, pp. 199-200, 2015.
- [28] P. Gallo, G. d'Amati, y F. Pelliccia. Pathologic evidence of extensive left ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Hum Pathol*, vol. 23, pp. 948-952, 1992.
- [29] L. Lindström, E. Nylander, H. Larsson, y B. Wranne. Left ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy - a scintigraphic and echocardiographic study, *Clin Physiol Funct Imaging*, vol. 25, pp. 171-177, 2005.
- [30] D. Corrado, C. Basso, G. Rizzoli, M. Schiavon, y G. Thiene. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults?, *J Am Coll Cardiol*, vol. 42, pp. 1959-1963, 2003.
- [31] W. J. McKenna, G. Thiene, A. Nava, F. Fontaliran, C. Blomstrom-Lundqvist, G. Fontaine, y F. Camerini. 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*, vol. 71, pp. 215-228, 1994.

- [32] J. Romero, E. Mejia-Lopez, C. Manrique, y R. Lucariello, Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review, *Clin Med Insights Cardiol*, vol. 7, pp. 97-114, 2013.
- [33] A. Nava, G. Thiene, B. Canciani, R. Scognamiglio, L. Daliento, G. Buja, B. Martini, P. Stritoni, y G. Fasoli. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: a study involving nine families, *J Am Coll Cardiol*, vol. 12, pp. 1222-1228, 1988.
- [34] B. Bauce, G. Frigo, F. I. Marcus, C. Basso, A. Rampazzo, F. Maddalena, D. Corrado, M. Winnicki, L. Daliento, I. Rigato, A. Steriotis, E. Mazzotti, G. Thiene, y A. Nava. Comparison of clinical features of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in men versus women, *Am J Cardiol*, vol. 102, pp. 1252-1257, 2008.
- [35] D. Corrado y G. Thiene. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies, *Circulation*, vol. 113, pp. 1634-1637, 2006.
- [36] M. M. Awad, H. Calkins, y D. P. Judge. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy, *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, vol. 5, pp. 258-267, 2008.
- [37] J. S. Hulot, X. Jouven, J. P. Empana, R. Frank, y G. Fontaine, Natural history and risk stratification of arrhythmogenic right ventricular



- dysplasia/cardiomyopathy, *Circulation*, vol. 110, pp. 1879-1884, 2004.
- [38] C. Basso, G. Thiene, D. Corrado, A. Angelini, A. Nava, y M. Valente, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis?, *Circulation*, vol. 94, pp. 983-91, 1996.
- [39] C. Tichnell, C. A. James, B. Murray, H. Tandri, S. F. Sears, y H. Calkins, Cardiology patient page. Patient's guide to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: past to present, *Circulation*, vol. 130, pp. e89-92, 2014.
- [40] D. Corrado, C. Basso, G. Thiene, W. J. McKenna, M. J. Davies, F. Fontaliran, *et al.*, Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study, *J Am Coll Cardiol*, vol. 30, pp. 1512-1520, 1997.
- [41] L. M. Gerlis, S. C. Schmidt-Ott, S. Y. Ho, y R. H. Anderson. Dysplastic conditions of the right ventricular myocardium: Uhl's anomaly vs arrhythmogenic right ventricular dysplasia, *Br Heart J*, vol. 69, pp. 142-150, 1993.
- [42] F. I. Marcus, W. J. McKenna, D. Sherrill, C. Basso, B. Bauce, D. A. Bluemke *et al.*, Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed

- modification of the Task Force Criteria, *Eur Heart J*, vol. 31, pp. 806-814, 2010.
- [43] L. G. Rudski, W. W. Lai, J. Afilalo, L. Hua, M. D. Handschumacher, K. Chandrasekaran, *et al.*, Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography, *J Am Soc Echocardiogr.* vol. 23, pp. 685-713, 2010.
- [44] T. Wichter, M. Borggrefe, W. Haverkamp, X. Chen, y G. Breithardt, Efficacy of antiarrhythmic drugs in patients with arrhythmogenic right ventricular disease. Results in patients with inducible and noninducible ventricular tachycardia, *Circulation*, vol. 86, pp. 29-37, 1992.
- [45] T. Wichter, T. M. Paul, L. Eckardt, P. Gerdes, P. Kirchhof, D. Böcker, y G. Breithardt. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Antiarrhythmic drugs, catheter ablation, or ICD?, *Herz*, vol. 30, pp. 91-101, 2005.
- [46] C. M. Tschabrunn y F. E. Marchlinski, Ventricular tachycardia mapping and ablation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Lessons Learned, *World J Cardiol*, vol. 6, pp. 959-967, 2014.



- [47] D. Corrado, L. Leoni, M. S. Link, P. Della Bella, F. Gaita, A. Curnis, *et al.*, Implantable cardioverter-defibrillator therapy for prevention of sudden death in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia, *Circulation*, vol. 108, pp. 3084-3091, 2003.
- [48] A. Rampazzo, A. Nava, G. A. Danieli, G. Buja, L. Daliento, G. Fasoli, *et al.*, The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24, *Hum Mol Genet*, vol. 3, pp. 959-962, 1994.
- [49] G. McKoy, N. Protonotarios, A. Crosby, A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, A. Coonar, *et al.*, Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease), *Lancet*, vol. 355, pp. 2119-2124, 2000.
- [50] N. Protonotarios, A. Tsatsopoulou, P. Patsourakos, D. Alexopoulos, P. Gezerlis, S. Simitsis, y G. Scampardonis, Cardiac abnormalities in familial palmoplantar keratosis, *Br Heart J*, vol. 56, pp. 321-326, 1986.
- [51] L. Carvajal-Huerta. Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy, *J Am Acad Dermatol*, vol. 39, pp. 418-421, 1998.
- [52] E. E. Norgett, S. J. Hatsell, L. Carvajal-Huerta, J. C. Cabezas, J. Common, P. E. Purkis, *et al.*, Recessive

- mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma, *Hum Mol Genet*, vol. 9, pp. 2761-2766, 2000.
- [53] M. M. Awad, D. Dalal, C. Tichnell, C. James, A. Tucker, T. Abraham, *et al.*, Recessive arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to novel cryptic splice mutation in PKP2, *Hum Mutat*, vol. 27, pp. 1157-1170, 2006.
- [54] B. Gerull, A. Heuser, T. Wichter, M. Paul, C. T. Basson, D. A. McDermott, *et al.*, Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Nat Genet*, vol. 36, pp. 1162-1164, 2004.
- [55] D. Garrod y M. Chidgey. Desmosome structure, composition and function, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1778, pp. 572-587, 2008.
- [56] E. Lazzarini, J. D. Jongbloed, K. Pilichou, G. Thiene, C. Basso, H. Bikker, *et al.*, The ARVD/C genetic variants database: 2014 update, *Hum Mutat*, vol. 36, pp. 403-410, 2015.
- [57] J. D. Kapplinger, A. P. Landstrom, B. A. Salisbury, T. E. Callis, G. D. Pollevick, D. J. Tester, *et al.*, Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise, *J Am Coll Cardiol*, vol. 57, pp. 2317-2327, 2011.



- [58] A. H. Christensen, M. Benn, H. Bundgaard, A. Tybjaerg-Hansen, S. Haunso, y J. H. Svendsen, Wide spectrum of desmosomal mutations in Danish patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *J Med Genet*, vol. 47, pp. 736-744, 2010.
- [59] J. P. van Tintelen, M. M. Entius, Z. A. Bhuiyan, R. Jongbloed, A. C. Wiesfeld, A. A. Wilde, et al., Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy, *Circulation*, vol. 113, pp. 1650-1658, 2006.
- [60] D. Dalal, L. H. Molin, J. Piccini, C. Tichnell, C. James, C. Bomma, et al., Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2, *Circulation*, vol. 113, pp. 1641-1649, 2006.
- [61] S. Sen-Chowdhry, P. Syrris, A. Pantazis, G. Quarta, W. J. McKenna, y J. C. Chambers. Mutational heterogeneity, modifier genes, and environmental influences contribute to phenotypic diversity of arrhythmogenic cardiomyopathy, *Circ Cardiovasc Genet*, vol. 3, pp. 323-330, 2010.
- [62] S. Sen-Chowdhry, P. Syrris, y W. J. McKenna. Genetics of right ventricular cardiomyopathy, *J Cardiovasc Electrophysiol*. vol. 16, pp. 927-935, 2005.

- [63] V. Fressart, G. Duthoit, E. Donal, V. Probst, J. C. Deharo, P. Chevalier, et al., Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice, *Europace*, vol. 12, pp. 861-868, 2010.
- [64] A. G. Kleber y J. E. Saffitz. Role of the intercalated disc in cardiac propagation and arrhythmogenesis, *Front Physiol*, vol. 5, pp. e1-9, 2014.
- [65] S. Goossens, B. Janssens, S. Bonne, R. De Rycke, F. Braet, J. van Hengel, y F. van Roy, A unique and specific interaction between alphaT-catenin and plakophilin-2 in the area composita, the mixed-type junctional structure of cardiac intercalated discs, *J Cell Sci*, vol. 120, pp. 2126-2136, 2007.
- [66] D. Swope, J. Li, y G. L. Radice. Beyond cell adhesion: the role of armadillo proteins in the heart, *Cell Signal*, vol. 25, pp. 93-100, 2013.
- [67] H. S. Duffy, M. Delmar, y D. C. Spray. Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins, *J Physiol Paris*, vol. 96, pp. 243-249, 2002.
- [68] D. Shy, L. Gillet, y H. Abriel. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1833, pp. 886-894, 2013.





- 
- [69] J. A. Palatinus, J. M. Rhett, y R. G. Gourdie. The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1818, pp. 1831-1843, 2012.
- [70] E. Agullo-Pascual, M. Cerrone, y M. Delmar, Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: diseases of the connexome, *FEBS Lett*, vol. 588, pp. 1322-1330, 2014.
- [71] A. Vite y G. L. Radice. N-Cadherin/Catenin Complex as a Master Regulator of Intercalated Disc Function, *Cell Commun Adhes*, vol. 21, 169-179, 2014.
- [72] W. W. Franke, C. M. Borrmann, C. Grund, y S. Pieperhoff. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins, *Eur J Cell Biol*, vol. 85, pp. 69-82, 2006.
- [73] J. Li, S. Goossens, J. van Hengel, E. Gao, L. Cheng, K. Tyberghein, *et al.*, Loss of alphaT-catenin alters the hybrid adhering junctions in the heart and leads to dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia following acute ischemia, *J Cell Sci*, vol. 125, pp. 1058-1067, 2012.
- [74] W. J. Nelson y R. Nusse. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways, *Science*, vol. 303, pp. 1483-1487, 2004.

- [75] J. Behrens. Everything You Would Like to Know About Wnt Signaling, *Scie Signal*, pp. e17, 2013.
- [76] J. Zhurinsky, M. Shtutman, y A. Ben-Ze'ev. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin, *Mol Cell Biol*, vol. 20, pp. 4238-4252, 2000.
- [77] B. Rubinfeld, B. Souza, I. Albert, S. Munemitsu, y P. Polakis. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin, *J Biol Chem*, vol. 270, pp. 5549-5555, 1995.
- [78] K. J. Green y C. L. Simpson. Desmosomes: new perspectives on a classic, *J Invest Dermatol*, vol. 127, pp. 2499-2515, 2007.
- [79] S. Verheule y S. Kaese. Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models, *Front Pharmacol*, vol. 4, pp.e1-14, 2013.
- [80] D. E. Gutstein, G. E. Morley, H. Tamaddon, D. Vaidya, M. D. Schneider, J. Chen, *et al.*, Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43, *Circ Res*, vol. 88, pp. 333-339, 2001.
- [81] A. G. Reaume, P. A. de Sousa, S. Kulkarni, B. L. Langille, D. Zhu, T. C. Davies, *et al.*, Cardiac malformation in



- neonatal mice lacking connexin43, *Science*, vol. 267, pp. 1831-1834, 1995.
- [82] E. Agullo-Pascual, X. Lin, A. Leo-Macias, M. Zhang, F.-X. Liang, Z. Li, *et al.*, Super-resolution imaging reveals that loss of the C-terminus of connexin43 limits microtubule plus-end capture and NaV1.5 localization at the intercalated disc, vol. 104, pp.371-381, 2014.
- [83] N. Protonotarios y A. Tsatsopoulou. Naxos disease: cardiocutaneous syndrome due to cell adhesion defect, *Orphanet J Rare Dis*, vol. 1, pp. e1-5, 2006.
- [84] N. Protonotarios y A. Tsatsopoulou. Naxos disease and Carvajal syndrome: cardiocutaneous disorders that highlight the pathogenesis and broaden the spectrum of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Cardiovasc Pathol*, vol. 13, pp. 185-194, 2004.
- [85] D. L. Stokes. Desmosomes from a structural perspective, *Curr Opin Cell Biol*, vol. 19, pp. 565-571, 2007.
- [86] M. Saito, D. K. Tucker, D. Kohlhorst, C. M. Niessen, y A. P. Kowalczyk, Classical and desmosomal cadherins at a glance, *J Cell Sci*, vol. 125, pp. 2547-2552, 2012.
- [87] A. Schlipp, C. Schinner, V. Spindler, F. Vielmuth, K. Gehmlich, P. Syrris, *et al.*, Desmoglein-2 interaction is crucial for cardiomyocyte cohesion and function, *Cardiovasc Res*, vol. 104, pp. 245-257, 2014.

- [88] K. Pilichou, C. A. Remme, C. Basso, M. E. Campian, S. Rizzo, P. Barnett, et al., Myocyte necrosis underlies progressive myocardial dystrophy in mouse *dsg2*-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *J Exp Med*, vol. 206, pp. 1787-1802, 2009.
- [89] C. A. Krusche, B. Holthöfer, V. Hofe, A. M. van de Sandt, L. Eshkind, E. Bockamp, et al., Desmoglein 2 mutant mice develop cardiac fibrosis and dilation, *Basic Res Cardiol*, vol. 106, pp. 617-633, 2011.
- [90] A. Heuser, E. R. Plovie, P. T. Ellinor, K. S. Grossmann, J. T. Shin, T. Wichter, et al., Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Am J Hum Genet*, vol. 79, pp. 1081-1088, 2006.
- [91] A. E. Bass-Zubek, L. M. Godsel, M. Delmar, y K. J. Green. Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling, *Curr Opin Cell Biol*, vol. 21, pp. 708-716, 2009.
- [92] M. Hatzfeld. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion?, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, pp. 69-77, 2007.
- [93] B. J. Roberts, K. E. Johnson, K. P. McGuinn, J. Saowapa, R. A. Svoboda, M. G. Mahoney, et al., Palmitoylation of plakophilin is required for desmosome assembly, *J Cell Sci*, vol. 127, pp. 3782-3793, 2014.



- 
- [94] L. M. Godsel, A. D. Dubash, A. E. Bass-Zubek, E. V. Amargo, J. L. Klessner, R. P. Hobbs, et al., Plakophilin 2 couples actomyosin remodeling to desmosomal plaque assembly via RhoA, *Mol Biol Cell*, vol. 21, pp. 2844-2859, 2010.
- [95] P. Gosavi, S. T. Kundu, N. Khapare, L. Sehgal, M. S. Karkhanis, y S. N. Dalal. E-cadherin and plakoglobin recruit plakophilin3 to the cell border to initiate desmosome assembly, *Cell Mol Life Sci*, vol. 68, pp. 1439-1454, 2011.
- [96] C. Mertens, I. Hofmann, Z. Wang, M. Teichmann, S. Sepehri Chong, M. Schnölzer, y W. W. Franke. Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, pp. 7795-7800, 2001.
- [97] O. Nekrasova y K. J. Green. Desmosome assembly and dynamics, *Trends Cell Biol*, vol. 23, pp. 537-546, 2013.
- [98] D. Acehan, C. Petzold, I. Gumper, D. D. Sabatini, E. J. Muller, P. Cowin, y D. L. Stokes. Plakoglobin is required for effective intermediate filament anchorage to desmosomes, *J Invest Dermatol*. vol. 128, pp. 2665-2675, 2008.
- [99] C. Mertens, C. Kuhn, y W. W. Franke. Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the

- karyoplasm and the desmosomal plaque, *J Cell Biol*, vol. 135, pp. 1009-1025, 1996.
- [100] X. Chen, S. Bonne, M. Hatzfeld, F. van Roy, y K. J. Green. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling, *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 10512-10522, 2002.
- [101] E. M. Oxford, H. Musa, K. Maass, W. Coombs, S. M. Taffet, y M. Delmar. Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells, *Circ Res*, vol. 101, pp. 703-711, 2007.
- [102] P. Y. Sato, H. Musa, W. Coombs, G. Guerrero-Serna, G. A. Patiño, S. M. Taffet, *et al.*, Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes, *Circ Res*, vol. 105, pp. 523-526, 2009.
- [103] A. Sonnenberg y R. K. Liem. Plakins in development and disease, *Exp Cell Res*, vol. 313, pp. 2189-2203, 2007.
- [104] P. A. van der Zwaag, J. D. Jongbloed, M. P. van den Berg, J. J. van der Smagt, R. Jongbloed, H. Bikker, *et al.*, A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy, *Hum Mutat*, vol. 30, pp. 1278-1283, 2009.
- [105] Z. Yang, N. E. Bowles, S. E. Scherer, M. D. Taylor, D. L. Kearney, S. Ge, *et al.*, Desmosomal dysfunction due to



- mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy, *Circ Res*, vol. 99, pp. 646-655, 2006.
- [106] G. I. Gallicano, P. Kouklis, C. Bauer, M. Yin, V. Vasioukhin, L. Degenstein, y E. Fuchs. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage, *J Cell Biol*, vol. 143, pp. 2009-2022, 1998.
- [107] E. Garcia-Gras, R. Lombardi, M. J. Giocondo, J. T. Willerson, M. D. Schneider, D. S. Khoury, y A. J. Marian. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *J Clin Invest*, vol. 116, pp. 2012-2021, 2006.
- [108] W. J. Brackenbury y L. L. Isom. Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family, *Front Pharmacol*, vol. 2, pp. e1-11, 2011.
- [109] A. S. Amin, H. L. Tan, y A. A. Wilde. Cardiac ion channels in health and disease, *Heart Rhythm*. vol. 7, pp. 117-126, 2010.
- [110] A. Tarradas, E. Selga, P. Beltran-Alvarez, A. Perez-Serra, H. Riuro, F. Pico, et al., A novel missense mutation, I890T, in the pore region of cardiac sodium channel causes Brugada syndrome, *PLoS One*. vol. 8, pp. e53220, 2013.

- [111] O. Campuzano, P. Beltrán-Álvarez, A. Iglesias, F. Scornik, G. Pérez, y R. Brugada. Genetics and cardiac channelopathies, *Genetics in Medicine*, vol. 12, pp. 260-267, 2010.
- [112] P. Beltran-Alvarez, A. Tarradas, C. Chiva, A. Perez-Serra, M. Batlle, F. Perez-Villa, *et al.*, Identification of N-terminal protein acetylation and arginine methylation of the voltage-gated sodium channel in end-stage heart failure human heart, *J Mol Cell Cardiol*, vol. 76, pp. 126-129, 2014.
- [113] P. Beltran-Alvarez, F. Feixas, S. Osuna, R. Diaz-Hernandez, R. Brugada, y S. Pagans. Interplay between R513 methylation and S516 phosphorylation of the cardiac voltage-gated sodium channel, *Amino Acids*, vol. 47, pp. 429-434, 2015.
- [114] P. Beltran-Alvarez, A. Espejo, R. Schmauder, C. Beltran, R. Mrowka, T. Linke, *et al.*, Protein arginine methyltransferases-3 and -5 increase cell surface expression of cardiac sodium channel, *FEBS Lett*, vol. 587, pp. 3159-3165, 2013.
- [115] P. Y. Sato, W. Coombs, X. Lin, O. Nekrasova, K. J. Green, L. L. Isom, *et al.*, Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc, *Circ Res*, vol. 109, pp. 193-201, 2011.
- [116] M. A. Makara, J. Curran, S. C. Little, H. Musa, I. Polina, S. A. Smith, *et al.*, Ankyrin-g coordinates intercalated disc





- signaling platform to regulate cardiac excitability in vivo, *Circ Res*, vol. 115, pp. 929-938, 2014.
- [117] M. Deo, P. Y. Sato, H. Musa, X. Lin, S. V. Pandit, M. Delmar, y O. Berenfeld. Relative contribution of changes in sodium current versus intercellular coupling on reentry initiation in 2-dimensional preparations of plakophilin-2-deficient cardiac cells, *Heart Rhythm*, vol. 8, pp. 1740-1748, 2011.
- [118] M. Delmar. Desmosome-ion channel interactions and their possible role in arrhythmogenic cardiomyopathy, *Pediatr Cardiol*, vol. 33, pp. 975-979, 2012.
- [119] J. M. Nerbonne y R. S. Kass. Molecular physiology of cardiac repolarization, *Physiol Rev*, vol. 85, pp. 1205-1253, 2005.
- [120] L. Gaztañaga, F. E. Marchlinski y B. P. Betensky. Mecanismos de las arritmias cardiacas, vol. 65, pp. 174–185, 2012.
- [121] C. Bierkamp, K. J. Mclaughlin, H. Schwarz, O. Huber, y R. Kemler. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin, *Dev Biol*, vol. 180, pp. 780-785, 1996.
- [122] K. S. Grossmann, C. Grund, J. Huelsken, M. Behrend, B. Erdmann, W. W. Franke, y W. Birchmeier. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac

- junction formation, *J Cell Biol*, vol. 167, pp. 149-160, 2004.
- [123] F. Calabrese, C. Basso, E. Carturan, M. Valente, y G. Thiene. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: is there a role for viruses?, *Cardiovasc Pathol*, vol. 15, pp. 11-17, 2006.
- [124] N. E. Bowles, J. Ni, F. Marcus, y J. A. Towbin. The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy, *J Am Coll Cardiol*, vol. 39, pp. 892-895, 2002.
- [125] R. Lombardi, J. Dong, G. Rodriguez, A. Bell, T. K. Leung, R. J. Schwartz, *et al.*, Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Circ Res*, vol. 104, pp. 1076-1084, 2009.
- [126] P. Kirchhof, L. Fabritz, M. Zwiener, H. Witt, M. Schäfers, S. Zellerhoff, *et al.*, Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice, *Circulation*, vol. 114, pp. 1799-1806, 2006.
- [127] L. Fabritz, M. G. Hoogendijk, B. P. Scicluna, S. C. van Amersfoort, L. Fortmueller, S. Wolf, *et al.*, Load-reducing therapy prevents development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in



- 
- plakoglobin-deficient mice, *J Am Coll Cardiol*, vol. 57, pp. 740-750, 2011.
- [128] D. Li, Y. Liu, M. Maruyama, W. Zhu, H. Chen, W. Zhang, *et al.*, Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy, *Hum Mol Genet*, vol. 20, pp. 4582-4596, 2011.
- [129] J. Li, D. Swope, N. Raess, L. Cheng, E. J. Muller, y G. L. Radice. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of beta-catenin signaling, *Mol Cell Biol*, vol. 31, pp. 1134-1144, 2011.
- [130] S. E. Ross, N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson, y O. A. MacDougald. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling, *Science*, vol. 289, pp. 950-953, 2000.
- [131] A. Asimaki y J. E. Saffitz. Remodeling of cell-cell junctions in arrhythmogenic cardiomyopathy, *Cell Commun Adhes*, vol. 21, pp. 13-23, 2014.
- [132] S. Rizzo, E. M. Lodder, A. O. Verkerk, R. Wolswinkel, L. Beekman, K. Pilichou, *et al.*, Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes, *Cardiovasc Res*, vol. 95, pp. 409-418, 2012.

- [133] M. Cerrone, M. Noorman, X. Lin, H. Chkourko, F. X. Liang, R. van der Nagel, *et al.*, Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency, *Cardiovasc Res*, vol. 95, pp. 460-468, 2012.
- [134] M. Noorman, S. Hakim, E. Kessler, J. A. Groeneweg, M. G. Cox, A. Asimaki, *et al.*, Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy, *Heart Rhythm*, vol. 10, pp. 412-419, 2013.
- [135] L. M. Fidler, G. J. Wilson, F. Liu, X. Cui, S. W. Scherer, G. P. Taylor, y R. M. Hamilton. Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations, *J Cell Mol Med*, vol. 13, pp. 4219-4228, 2009.
- [136] M. Hong, L. Bao, E. Kefaloyianni, E. Agullo-Pascual, H. Chkourko, M. Foster, *et al.*, Heterogeneity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: enrichment at the intercalated disk, *J Biol Chem*, vol. 287, pp. 41258-41267, 2012.
- [137] R. Lombardi, M. da Graca Cabreira-Hansen, A. Bell, R. R. Fromm, J. T. Willerson, y A. J. Marian. Nuclear plakoglobin is essential for differentiation of cardiac progenitor cells to adipocytes in arrhythmogenic right



- ventricular cardiomyopathy, *Circ Res*, vol. 109, pp. 1342-1353, 2011.
- [138] E. D. Martin, M. A. Moriarty, L. Byrnes, y M. Greal. Plakoglobin has both structural and signalling roles in zebrafish development, *Dev Biol*, vol. 327, pp. 83-96, 2009.
- [139] G. I. Gallicano, C. Bauer, y E. Fuchs. Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature, *Development*, vol. 128, pp. 929-941, 2001.
- [140] R. C. Lyon, V. Mezzano, A. T. Wright, E. Pfeiffer, J. Chuang, K. Banares, A. *et al.*, Connexin defects underlie arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in a novel mouse model, *Hum Mol Genet*, vol. 23, pp. 1134-1150, 2014.
- [141] M. A. Moriarty, R. Ryan, P. Lalor, P. Dockery, L. Byrnes, y M. Greal. Loss of plakophilin 2 disrupts heart development in zebrafish, *Int J Dev Biol*, vol. 56, pp. 711-718, 2012.
- [142] F. M. Cruz, D. Sanz-Rosa, M. Roche-Molina, J. García-Prieto, J. M. García-Ruiz, G. Pizarro, *et al.*, Exercise triggers ARVC phenotype in mice expressing a disease-causing mutated version of human plakophilin-2, *J Am Coll Cardiol*, vol. 65, pp. 1438-1450, 2015.

- [143] S. Kant, P. Krull, S. Eisner, R. E. Leube, y C. A. Krusche. Histological and ultrastructural abnormalities in murine desmoglein 2-mutant hearts, *Cell Tissue Res*, vol. 348, pp. 249-259, 2012.
- [144] A. Diez-Juan, M. F. Ortiz, L. Perez-Alvarez, R. Barriales-Villa, D. A. Garcia, J. Moncayo-Arandi, *et al.*, Clinical and functional consequences associated to a PKP2 founder mutation in north-west Spain, *European Heart Journal*, vol. 32, pp. 26-27, 2011.
- [145] J. H. Kim, S. R. Lee, L. H. Li, H. J. Park, J. H. Park, K. Y. Lee, *et al.*, High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice, *PLoS One*, vol. 6, p. e18556, 2011.
- [146] R. L. Mort, M. J. Ford, A. Sakaue-Sawano, N. O. Lindstrom, A. Casadio, A. T. Douglas, *et al.*, Fucci2a: a bicistronic cell cycle reporter that allows Cre mediated tissue specific expression in mice, *Cell Cycle*, vol. 13, pp. 2681-2696, 2014.
- [147] S. Y. Gao, M. M. Jack, y C. O'Neill. Towards optimising the production of and expression from polycistronic vectors in embryonic stem cells, *PLoS One*, vol. 7, p. e48668, 2012.
- [148] S. Kredel, F. Oswald, K. Nienhaus, K. Deuschle, C. Röcker, M. Wolff, *et al.*, mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures, *PLoS One*, vol. 4, p. e4391, 2009.



- 
- [149] M. Gossen y H. Bujard. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, pp. 5547-5551, 1992.
- [150] W. C. Claycomb, N. A. Lanson, B. S. Stallworth, D. B. Egeland, J. B. Delcarpio, A. Bahinski, y N. J. Izzo, HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 2979-2984, 1998.
- [151] W. S. Pear, G. P. Nolan, M. L. Scott, y D. Baltimore. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, pp. 8392-8396, 1993.
- [152] K. Toyoshima y P. K. Vogt, Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions, *Virology*, vol. 38, pp. 414-426, 1969.
- [153] S. Pagans, S. E. Kauder, K. Kaehlcke, N. Sakane, S. Schroeder, W. Dormeyer, *et al.*, The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription, *Cell Host Microbe*, vol. 7, pp. 234-244, 2010.
- [154] A. Nagy, M. Gertsenstein, Vintersten K, y R. Behringer, Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, ed. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2003.

- [155] V. Schefer y M. I. Talan. Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity, *Exp Gerontol*, vol. 31, pp. 387-392, 1996.
- [156] O. J. Kemi, J. P. Loennechen, U. Wisløff, y Ø. Ellingsen, Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy, *J Appl Physiol*, vol. 93, pp. 1301-1309, 2002.
- [157] B. Benito, G. Gay-Jordi, A. Serrano-Mollar, E. Guasch, Y. Shi, J. C. Tardif, *et al.*, Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training, *Circulation*, vol. 123, pp. 13-22, 2011.
- [158] Y. Wang, U. Wisloff, y O. J. Kemi, Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy, *Physiol Res*, vol. 59, pp. 633-644, 2010.
- [159] D. M. Yoerger, F. Marcus, D. Sherrill, H. Calkins, J. A. Towbin, W. Zareba, y M. H. Picard. Echocardiographic findings in patients meeting task force criteria for arrhythmogenic right ventricular dysplasia: new insights from the multidisciplinary study of right ventricular dysplasia, *J Am Coll Cardiol*, vol. 45, pp. 860-865, 2005.
- [160] S. E. Litwin, S. E. Katz, E. O. Weinberg, B. H. Lorell, G. P. Aurigemma, y P. S. Douglas. Serial Echocardiographic-Doppler Assessment of Left Ventricular Geometry and Function in Rats With





- 
- Pressure-Overload Hypertrophy, vol. 91, pp.2642-2654, 1995.
- [161] G. F. Mitchell, A. Jeron, y G. Koren. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse, vol. 274, pp. 747-751, 1998.
- [162] L. C. Junquiera, L. C. Junqueira, y R. R. Brentani. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen, *Anal Biochem*, vol. 94, pp. 96-99, 1979.
- [163] A. R. Spurr. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J Ultrastruct Res*, vol. 26, pp. 31-43, 1969.
- [164] E. S. Reynolds. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J Cell Biol*, vol. 17, pp. 208-212, 1963.
- [165] T. B. Rasmussen, J. Palmfeldt, P. H. Nissen, R. Magnoni, S. Dalager, U. B. Jensen, *et al.*, Mutated desmoglein-2 proteins are incorporated into desmosomes and exhibit dominant-negative effects in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Hum Mutat*, vol. 34, pp. 697-705, 2013.
- [166] A. D'Andrea, A. La Gerche, E. Golia, A. J. Teske, E. Bossone, M. G. Russo, *et al.*, Right heart structural and functional remodeling in athletes, *Echocardiography*, vol. 32, pp. S11-22, 2015.

- [167] A. La Gerche, T. Roberts, y G. Claessen. The response of the pulmonary circulation and right ventricle to exercise: exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodeling in endurance athletes, *Pulm Circ*, vol. 4, pp. 407-416, 2014.
- [168] S. Petitprez, A. F. Zmoos, J. Ogradnik, E. Balse, N. Raad, S. El-Haou, *et al.*, SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes, *Circ Res*, vol. 108, pp. 294-304, 2011.
- [169] J. N. Dominguez, A. de la Rosa, F. Navarro, D. Franco, y A. E. Aranega, Tissue distribution and subcellular localization of the cardiac sodium channel during mouse heart development, *Cardiovasc Res*, vol. 78, pp. 45-52, 2008.
- [170] T. B. Rasmussen, P. H. Nissen, J. Palmfeldt, K. Gehmlich, S. Dalager, U. B. Jensen, *et al.*, Truncating Plakophilin-2 Mutations in Arrhythmogenic Cardiomyopathy Are Associated With Protein Haploinsufficiency in Both Myocardium and Epidermis, vol. 7, pp.230-240, 2014.
- [171] D. Corrado, G. Thiene, A. Nava, L. Rossi, y N. Pennelli. Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases, *Am J Med*, vol. 89, pp. 588-596, 1990.



- [172] H. Heidbuchel, D. L. Prior, y A. La Gerche. Ventricular arrhythmias associated with long-term endurance sports: what is the evidence?, *Br J Sports Med*, vol. 46 , pp. i44-50, 2012.
- [173] J. Müller, D. A. Ritt, T. D. Copeland, y D. K. Morrison. Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate, *EMBO J*, vol. 22, pp. 4431-4442, 2003.
- [174] S. A. Matthes, S. Taffet, y M. Delmar. Plakophilin-2 and the migration, differentiation and transformation of cells derived from the epicardium of neonatal rat hearts, *Cell Commun Adhes*, vol. 18, pp. 73-84, 2011.
- [175] S. N. Chen, P. Gurha, R. Lombardi, A. Ruggiero, J. T. Willerson, y A. J. Marian. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy, *Circ Res*, vol. 114, pp. 454-468, 2014.
- [176] O. E. Nekrasova, E. V. Amargo, W. O. Smith, J. Chen, G. E. Kreitzer, y K. J. Green. Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes, *J Cell Biol*, vol. 195, pp. 1185-1203, 2011.
- [177] J. Gomes, M. Finlay, A. K. Ahmed, E. J. Ciaccio, A. Asimaki, J. E. Saffitz, *et al.*, Electrophysiological abnormalities precede overt structural changes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to

- mutations in desmoplakin-A combined murine and human study, *Eur Heart J*. vol. 33, pp. 1942-1953, 2012.
- [178] C. Hall, S. Li, H. Li, V. Creason, y J. K. Wahl. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy plakophilin-2 mutations disrupt desmosome assembly and stability, *Cell Commun Adhes*, vol. 16, pp. 15-27, 2009.
- [179] E. Sommariva, S. Brambilla, C. Carbuicchio, E. Gambini, V. Meraviglia, A. Dello Russo, *et al.*, Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy, *Eur Heart J*, 2015.
- [180] A. Asimaki, H. Tandri, H. Huang, M. K. Halushka, S. Gautam, C. Basso, *et al.*, A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *N Engl J Med*, vol. 360, pp. 1075-1084, 2009.
- [181] T. Tanawuttiwat, S. J. Sager, J. M. Hare, y R. J. Myerburg. Myocarditis and ARVC/D: variants or mimics?, *Heart Rhythm*, vol. 10, pp. 1544-1548, 2013.
- [182] M. L. Wong, F. O'Kirwan, N. Khan, J. Hannestad, K. H. Wu, D. Elashoff, *et al.*, Identification, characterization, and gene expression profiling of endotoxin-induced myocarditis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 14241-14246, 2003.
- [183] A. Asimaki, H. Tandri, E. R. Duffy, J. R. Winterfield, S. Mackey-Bojack, M. M. Picken, *et al.*, Altered desmosomal



- proteins in granulomatous myocarditis and potential pathogenic links to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Circ Arrhythm Electrophysiol*, vol. 4, pp. 743-752, 2011.
- [184] V. Sekhri, S. Sanal, L. J. Delorenzo, W. S. Aronow, y G. P. Maguire. Cardiac sarcoidosis: a comprehensive review, *Arch Med Sci*, vol. 7, pp. 546-554, 2011.
- [185] C. Basso, E. Czarnowska, M. Della Barbera, B. Bauce, G. Beffagna, E. K. Wlodarska, *et al.*, Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies, *Eur Heart J*, vol. 27, pp. 1847-1854, 2006.
- [186] D. J. Milner, M. Mavroidis, N. Weisleder, y Y. Capetanaki, Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function, *J Cell Biol*, vol. 150, pp. 1283-1298, 2000.
- [187] D. J. Milner, G. E. Taffet, X. Wang, T. Pham, T. Tamura, C. Hartley, *et al.*, The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function, *J Mol Cell Cardiol*, vol. 31, pp. 2063-2076, 1999.
- [188] A. Rojas y H. Calkins. Present understanding of the relationship between exercise and arrhythmogenic right

- ventricular dysplasia/cardiomyopathy, *Trends Cardiovasc Med*, vol. 25, pp. 181-188, 2015.
- [189] A. La Gerche, A. T. Burns, D. J. Mooney, W. J. Inder, A. J. Taylor, J. Bogaert, *et al.*, Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes, *Eur Heart J*, vol. 33, pp. 998-1006, 2012.
- [190] B. Bauce, G. Frigo, G. Benini, P. Michieli, C. Basso, A. F. Folino, *et al.*, Differences and similarities between arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and athlete's heart adaptations, *Br J Sports Med*, vol. 44, pp. 148-154, 2010.
- [191] A. C. Sawant, A. Bhonsale, A. S. te Riele, C. Tichnell, B. Murray, S. D. Russell, *et al.*, Exercise has a disproportionate role in the pathogenesis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy in patients without desmosomal mutations, *J Am Heart Assoc*, vol. 3, pp. e001471, 2014.
- [192] D. Swope, L. Cheng, E. Gao, J. Li, y G. L. Radice. Loss of cadherin-binding proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis, *Mol Cell Biol*, vol. 32, pp. 1056-1067, 2012.
- [193] H. Tandri, A. Asimaki, D. Dalal, J. E. Saffitz, M. K. Halushka, y H. Calkins, Gap junction remodeling in a



- case of arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to plakophilin-2 mutation, *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 19, pp. 1212-1224, 2008.
- [194] S. R. Kaplan, J. J. Gard, N. Protonotarios, A. Tsatsopoulou, C. Spiliopoulou, A. Anastasakis, *et al.*, Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease), *Heart Rhythm*, vol. 1, pp. 3-11, 2004.
- [195] S. R. Kaplan, J. J. Gard, L. Carvajal-Huerta, J. C. Ruiz-Cabezas, G. Thiene, y J. E. Saffitz. Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome, *Cardiovasc Pathol*, vol. 13, pp. 26-32, 2004.
- [196] M. A. Laflamme, M. M. Sebastian, y B. S. Buetow, "Cardiovascular," in *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*, ed: Academic Press publication, Elsevier, pp. 135-155, 2010.
- [197] S. Kirchhoff, E. Nelles, A. Hagendorff, O. Kruger, O. Traub, y K. Willecke. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice, *Curr Biol*, vol. 8, pp. 299-302, 1998.
- [198] A. M. Simon, D. A. Goodenough, y D. L. Paul. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block, *Curr Biol*, vol. 8, pp. 295-298, 1998.

- [199] M. Frank, A. Wirth, R. P. Andrie, M. M. Kreuzberg, R. Dobrowolski, G. Seifert, *et al.*, Connexin45 provides optimal atrioventricular nodal conduction in the adult mouse heart, *Circ Res*, vol. 111, pp. 1528-1538, 2012.
- [200] M. Paul, T. Wichter, J. Gerss, V. Arps, E. Schulze-Bahr, H. Robenek, *et al.*, Connexin expression patterns in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Am J Cardiol*, vol. 111, pp. 1488-1495, 2013.
- [201] M. Boulaksil, S. K. Winckels, M. A. Engelen, M. Stein, T. A. van Veen, J. A. Jansen, *et al.*, Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias, *Eur J Heart Fail*, vol. 12, pp. 913-921, 2010.
- [202] A. A. M. Wilde y R. Brugada. Phenotypical Manifestations of Mutations in the Genes Encoding Subunits of the Cardiac Sodium Channel, *Circ Res*, vol. 108, pp. 884-897, 2011.
- [203] M. Derangeon, J. Montnach, I. Baró, and F. Charpentier, Mouse Models of SCN5A-Related Cardiac Arrhythmias, *Front Physiol*, vol. 3, pp. e1-11, 2012.
- [204] H. Heidbüchel, J. Hoogsteen, R. Fagard, L. Vanhees, H. Ector, R. Willems, y J. V. Lierde. High prevalence of right ventricular involvement in endurance athletes with ventricular arrhythmias, *Eur Heart J*, vol. 24, pp. 1473-1480, 2003.





- 
- [205] R. Joshi-Mukherjee, W. Coombs, H. Musa, E. Oxford, S. Taffet, y M. Delmar. Characterization of the molecular phenotype of two arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)-related plakophilin-2 (PKP2) mutations, *Heart Rhythm*, vol. 5, pp. 1715-1723, 2008.
- [206] M. Cerrone, X. Lin, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, A. Pfenniger, H. Chkourko Gusky, *et al.*, Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype, *Circulation*, vol. 129, pp. 1092-1103, 2014.
- [207] R. M. Shaw, A. J. Fay, M. A. Puthenveedu, M. von Zastrow, Y. N. Jan, y L. Y. Jan. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions, *Cell*, vol. 128, pp. 547-560, 2007.
- [208] J. E. Saffitz. The pathobiology of arrhythmogenic cardiomyopathy, *Annu Rev Pathol*, vol. 6, pp. 299-321, 2011.
- [209] M. H. Yacoub. Decade in review--cardiomyopathies: Cardiomyopathy on the move, *Nat Rev Cardiol*, vol. 11, pp. 628-629, 2014.
- [210] R. E. Hershberger, D. J. Hedges, y A. Morales, Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture, *Nat Rev Cardiol*, vol. 10, pp. 531-547, 2013.

- [211] B. Bauce, C. Basso, A. Rampazzo, G. Beffagna, L. Daliento, G. Frigo, *et al.*, Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations, *Eur Heart J*, vol. 26, pp. 1666-1675, 2005.
- [212] M. Norman, M. Simpson, J. Mogensen, A. Shaw, S. Hughes, P. Syrris, *et al.*, Novel mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy, *Circulation*, vol. 112, pp. 636-642, 2005.
- [213] S. Sen-Chowdhry, P. Syrris, S. K. Prasad, S. E. Hughes, R. Merrifield, D. Ward, *et al.*, Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy: an under-recognized clinical entity, *J Am Coll Cardiol*, vol. 52, pp. 2175-2187, 2008.
- [214] P. Garcia-Pavia, P. Syrris, C. Salas, A. Evans, J. G. Mirelis, M. Cobo-Marcos, *et al.*, Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation: a clinicopathological study, *Heart*, vol. 97, pp. 1744-1752, 2011.
- [215] P. A. van der Zwaag, I. A. van Rijsingen, A. Asimaki, J. D. Jongbloed, D. J. van Veldhuisen, A. C. Wiesfeld, *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*, vol. 14, pp. 1199-1207, 2012.

- [216] S. Peters. Arrhythmogenic cardiomyopathy and provokable Brugada ECG in a patient caused by missense mutation in plakophilin-2, *Int J Cardiol*, vol. 173, pp. 317-318, 2014.
- [217] F. van Hoorn, M. E. Campian, A. Spijkerboer, M. T. Blom, R. N. Planken, A. C. van Rossum, *et al.*, SCN5A mutations in Brugada syndrome are associated with increased cardiac dimensions and reduced contractility, *PLoS One*, vol. 7, p. e42037, 2012.
- [218] D. Dalal, C. James, R. Devanagondi, C. Tichnell, A. Tucker, K. Prakasa, *et al.*, Penetrance of Mutations in Plakophilin-2 Among Families With Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy, *J Am Coll Cardiol*, vol. 48, pp. 1416–1424, 2006.



## **VIII. Apéndice**

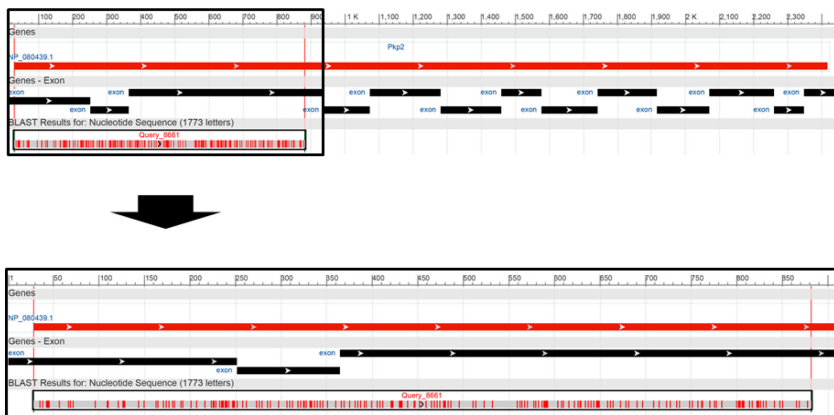
---





### 32.1. Diseño de *PKP2* truncada y alineamiento

Aquí se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica de *PKP2* truncada diseñada para este estudio y comparada con la secuencia del transcrito para *Pkp2* nativa (*Mus musculus plakophilin 2*, mRNA; referencia NM\_026163.2):



**Figura 54. Representación del fragmento de *Pkp2* truncado alineado con la secuencia de transcrito para *Pkp2* de referencia.** Arriba se muestra el alineamiento con la secuencia completa del transcrito (Rojo: secuencia completa; Negro: exones del transcrito). Abajo se muestra en detalle el alineamiento de *Pkp2* truncada (gris).

En la Figura 54 se observa el resultado del alineamiento de *Pkp2* truncada (barra gris) con la secuencia del transcrito para *Pkp2* completa (barra roja) y la representación de cada exón a lo largo de dicha secuencia (barras negras). La secuencia de *Pkp2* truncada contiene los dos primeros exones completos y gran parte del tercer exón.

Abajo se muestra una ampliación del fragmento de *Pkp2* truncado alineado. Las líneas rojas verticales en su secuencia

representan los cambios nucleotídicos sinónimos respecto a su secuencia de referencia. Este análisis fue desarrollado mediante la plataforma NCBI BLAST® (NCBI, Medline: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se utilizó la base de datos de la misma plataforma para alinear la secuencia de nuestro diseño.

### **32.2. Protocolos de tinciones histológicas**

Una vez desparafinadas e hidratadas (Apartado 12, Material y Métodos), las secciones fueron teñidas según los protocolos que aquí se describen.

#### Hematoxilina-Eosina

- Hematoxilina de Harris (Sigma, cat: HHS32) 5 min
- Lavados rápidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>
- Diferenciación (HCl 1% (v/v) en Etanol 70°) 20 s
- Lavados rápidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>
- Eosina Y acuosa (Sigma, cat: HT110216) 5 s
- Deshidratar y montar

En el tejido, los núcleos se muestran en azul-marrón oscuro y el citoplasma en rosa.

#### Tricrómico de Masson

- Celestin Blue 5min
- Lavados rápidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>
- Hematoxilina de Mayer (Sigma, cat: MH532) 5min
- Lavados rápidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>
- Diferenciación (1% HCl (v/v) en Et 70°) 20s
- Lavados rápidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>





- 
- Fucsina ácida 5min
  - Lavados rápidos en H<sub>2</sub>Od
  - Ácido fosfomolibdico (Sigma, cat:HT153) 5min
  - Escurrir el exceso
  - Verde luz 7min
  - Lavados rápidos en H<sub>2</sub>Od
  - Solución acética (Ác. Acético 1% en H<sub>2</sub>Od) 2min
  - Lavados rápidos en H<sub>2</sub>Od
  - Deshidratar y montar

La matriz extracelular se tiñe de verde, el citoplasma de los cardiomiocitos de rosa y los núcleos de color marrón oscuro.

### Picrosirio

- Rojo Sirio 30min
- Solución acética (Ác. Acético 1% en H<sub>2</sub>Od) 2min
- Deshidratar y montar

Las fibras de colágeno aparecen con un color rojo intenso contrastando con el fondo, de color amarillo.

### Oil red O (Tinción de grasas)

Se utiliza en cortes de criostato, ya que la deshidratación alcohólica y el xileno utilizados durante la inclusión en parafina disolvería las grasas. Una vez realizados los cortes en el criostato:

- Dejar secar las secciones al aire 1-2min
- Lavado rápido en Isopropanol 60%

- Solución de trabajo de *Oil red O* 15min
- Lavado rápido en Isopropanol 60%
- Lavados rápidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>
- Contraste con Azul de toluidina 1min
- Lavados rápidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>
- Montaje en medio acuoso (glicerina:PBS)

Los acúmulos de grasa aparecen de un color rojo intenso en forma de gotas dentro del tejido. Los núcleos aparecen de celeste y el citoplasma con un celeste pálido. Se recomienda el uso de un control positivo durante la tinción.

Con la excepción de la tinción Oil red, tras el protocolo de tinción las secciones fueron deshidratadas y montadas. Para la deshidratación y montaje de las secciones se usaron pasos crecientes de alcoholes (Et70° 2min → Et96° 10s → Et100° 20s) y, posteriormente se incubaron, al menos 10min, en xileno antes de su montaje con cubreobjetos en medio DPX (Merck).

Los colorantes no comerciales se realizaron en el laboratorio a partir del stock en polvo. Abajo se detalla su preparación:

*Solución Celestin Blue (Tricrómico de Masson)*

Celestin Blue B	2,5g
Sulfato de amonio férrico	25g
Glicerina	70mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	500mL



Disolver primero el sulfato de amonio en el H<sub>2</sub>Od. Una vez disuelto, se calienta a 30°C y se añade el celestin blue B. Luego se deja atemperar y se filtra. Finalmente, se disuelve la glicerina. Una vez preparado su caducidad aproximada es de 6 meses.

*Solución Fucsina ácida (Tricrómico de Masson)*

Fucsina ácida	0,5g
Ácido acético glacial	0,5mL
H <sub>2</sub> Od	100mL

Se puede utilizar indefinidamente.

*Solución Verde Luz (Tricrómico de Masson)*

Verde luz	2g
Ácido acético glacial	2,5mL
H <sub>2</sub> Od	100mL

Se puede utilizar indefinidamente.

*Rojo sirio (Picrosirio)*

Direct red	0,3g
Ácido pícrico saturado	300mL

Se puede utilizar indefinidamente.

### Oil red O

Hay que realizar una solución *stock*:

- Oil red O                    0,5g
- Isopropanol                100mL

Se debe calentar suavemente durante la disolución del colorante. Una vez realizado el colorante en *stock* se realiza la solución de trabajo:

- Solución *stock*            30mL
- H<sub>2</sub>Od                        20mL

Una vez mezcladas, la solución se deja reposar 10min y se filtra. La solución debe utilizarse antes de transcurridos 30min.

### **32.3. Desenmascaramiento de epítomos**

Tampón citrato 1% (pH=6) para desenmascaramiento de epítomos:

- Ácido cítrico                    2,26g
- Citrato sódico                2,14g
- Agua destilada                hasta 1L

Ajustar pH=6 con la adición de NaOH. No añadir nada de HCl si se el pH asciende por encima de 6.



### 32.4. Anticuerpos

En esta tesis doctoral se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios para el reconocimiento de proteínas:

Anticuerpo	Tipo	Aplicación	Dilución	Referencia
<b>T2A</b>	Pol Conejo	IF/WB	1:500/1:1000	Millipore (ABS31)
<b>GADPH</b>	Mon Ratón	WB	1:1000	Santa cruz (sc-32233)
<b>PKP2</b>	Mon Ratón	IF/WB	1:5/1:200	Abnova (MAB4871)
<b>CX43</b>	Pol Conejo	IF/WB	1:1000/1:8000	Sigma (C6219)
<b>DSC2</b>	Pol Conejo	WB/IF	1:50/1:500	Abcam (Ab95967)
<b>PG</b>	Mon Ratón	IF/WB	1:50/1:1000	Invitrogen (13-8500)
<b>DES</b>	Pol Cabra	IF/WB	1:400/1:1000	Santa cruz (sc-7559)
<b>DSP</b>	Pol Conejo	WB	1:50	Santa cruz (sc-33555)
<b>DSP</b>	Mon Ratón	IF	1:100	AbD Serotec (2722-5204)
<b><math>\alpha</math>MHC</b>	Mon Ratón	WB	1:1000	Abcam (Ab15)
<b><math>\alpha</math>1 sodio/potasio ATPasa</b>	Mon Ratón	WB	1:1000	Abcam (Ab7671)
<b>Na<sub>v</sub>1.5</b>	Pol Conejo	IF/WB	1:200/1:1000	Alomone (ASC-013)
<b>Histona H3K9-trimetil</b>	Pol Conejo	WB	1:1000	Abcam (ab8898)

**Tabla 10. Anticuerpos utilizados en esta tesis doctoral.** En la primera columna se muestran las proteínas que reconoce cada anticuerpo. En referencia se muestra la casa comercial y el número de catálogo. WB=utilizado para *western blot*. IF=utilizado para inmunofluorescencia en secciones de tejido crío preservado. Pol= policlonal. Mon= monoclonal. Para cada técnica se muestra la dilución utilizada.

### 32.5. Soluciones para Western blot

Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE). Se realizaron dos geles diferentes para la electroforesis:

- Gel de separación (o *Running gel*): Se realizaron las siguientes concentraciones de acrilamida para la electroforesis de proteínas:

- Gel de **1mm** de grosor (para 2 geles):

	7%	10%	12%	14%	16%
Agua (mL)	5,66	5,1	4,4	3,8	3,3
Tris-HCl 1,5M pH8,8 (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
SDS (10% p/v) (μL)	100	100	100	100	100
Acrilamida 40% 37 5:1 (mL)	1,68	2,4	2,9	3,4	3,9
AMPS (10% p/v) (μL)	46	46	46	46	46
TEMED* (μL)	15,4	15,4	15,4	15,4	15,4
<b>Total (mL)</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

- Gel de **1,5mm** de grosor (para 2 geles):

	7%	10%	12%	14%	16%
Agua (mL)	8,5	7,7	6,6	5,7	5,25
Tris-HCl 1,5M pH8,8 (mL)	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
SDS (10% p/v) (μL)	150	150	150	150	150
Acrilamida 40% 37 5:1 (mL)	2,52	3,6	4,35	5,1	5,85
AMPS (10% p/v) (μL)	69	69	69	69	69
TEMED* (μL)	23	23	23	23	23
<b>Total (mL)</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

\*N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina



- Gel de concentración (o *Stacking gel*; para 2 geles):

	<b>Stacking</b>
<b>Agua (mL)</b>	3
<b>Tris-HCl 0,5M pH7,4 (mL)</b>	1,25
<b>SDS (10% p/v) (μL)</b>	50
<b>Acrilamida 40% 37 5:1 (mL)</b>	0,525
<b>AMPS (10% p/v) (μL)</b>	30
<b>TEMED* (μL)</b>	10
<b>Total (mL)</b>	<b>5</b>

\*N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

#### Tampón de carga 4x (Método *Laemmli Sample Buffer*)

SDS	8% (p/v)
Tris-HCl pH=6,8	320mM
Glicerina	40% (v/v)
β-mercaptoetanol	10%
Azul de bromofenol	0,04% (p/v)

#### Tampón de transferencia 10x

Para preparar 1 litro:

SDS	10g
Tris	24,24g
Glicina	111,75g

Tampón de electroforesis de proteínas 5x

Para preparar 1 litro:

SDS	5g
Glicina	144g
Tris	30g

**32.6. Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de las proteínas de extracto celular o tisular se utiliza el kit *Pierce™ BCA protein assay* (ThermoFisher Scientific). Inicialmente se preparara la albúmina sérica (BSA) diluyendo 1:5 la solución de stock (que se encuentra a una concentración de 2mg/mL). Luego, la dilución se reparte en una placa de 96-pocillos transparente para generar una recta patrón según la siguiente tabla:

Patrón	BSA (µL)	Sol. Lisis* (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)	BCA† (µL)
Blanco	0	2,5	25	200
1 µg	2,5	2,5	22,5	200
2 µg	5	2,5	20	200
3 µg	7,5	2,5	17,5	200
5 µg	12,5	2,5	12,5	200
7 µg	17,5	2,5	7,5	200
9 µg	22,5	2,5	2,5	200

\*Solución de lisis en el que fueron lisadas las células/tejido (incluyendo inhibidores de proteasas)

†Mezcla de la solución A (transparente) y B (azul) en proporción 50:1, respectivamente.





Las muestras de proteína deben añadirse en otros pocillos de la placa como sigue:

Muestra ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	BCA ( $\mu\text{L}$ )
2,5	25	200

En función de la concentración de proteína en cada muestra, debe añadirse la solución pura o realizar alguna dilución (1:2,5; 1:5; 1:10...). En cualquier caso, el disolvente debe ser solución de lisis completa. Para una reacción más homogénea, se recomienda añadir la mezcla de BCA a la recta patrón y las muestras en el mismo momento y al final del proceso.

Tras montar la placa, esta se incuba a 37°C y oscuridad durante al menos 30 min. La medición debe realizarse entre los 30-60 min tras iniciar la incubación. Se mide la absorbancia a una  $\lambda$  de 562nm, se genera la recta patrón y se interpolan los datos obtenidos para cada muestra. El valor de cada muestra debe dividirse por su volumen (2,5 $\mu\text{L}$ ) y por la dilución realizada (si procede) para la obtención de una concentración en mg/mL.