

Rilevanza clinica del test genetico nella cardiomiopatia ipertrofica

Francesca Girolami¹, Sara Bardi¹, Laura Berti¹, Franco Cecchi², Eleonora Servettini², Benedetta Tomberli², Francesca Torricelli¹, Iacopo Olivotto²

Riassunto. Sono trascorsi più di 20 anni dalla scoperta del primo gene sarcomerico associato all'insorgenza della Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI). Durante tale periodo lo svilupparsi di moderne tecnologie per il sequenziamento del genoma umano, unitamente alla crescita delle conoscenze sulla genetica, hanno reso disponibile un test genetico specifico per la CMI effettuabile a scopo diagnostico e diffuso in molti paesi. Nel frattempo per l'intensificarsi dello scambio reciproco di conoscenze tra cardiologi e genetisti, è emersa la necessità di discutere sulla vera utilità clinica del test genetico. La prescrizione del test ha incontrato spesso difficoltà da parte del cardiologo perché ritenuto di scarsa utilità nella pratica clinica anche a fronte del costo elevato. In realtà tale resistenza è in contrasto con una serie di evidenze che supportano la necessità del test genetico nella gestione del paziente con CMI. Tali ragioni sono passate in rassegna nel presente lavoro e spaziano dall'importanza dell'identificazione dei genotipi complessi perché prognostici di un decorso più sfavorevole della malattia, alla possibilità di effettuare diagnosi nei casi dubbi mediante l'identificazione della mutazione, fino a porre diagnosi differenziale con le forme non sarcomeriche. In ultimo, ma non per importanza, vale la pena sottolineare che il test genetico permette di stabilire la natura ereditaria della malattia, rendendo possibile la diagnosi talvolta presintomatica nei familiari del probando.

Parole chiave. Cardiomiopatia ipertrofica, consulenza genetica, mutazioni sarcomeriche, test genetico.

Introduzione

La Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI) è la più frequente malattia genetica del muscolo cardiaco, con una prevalenza di 1:500 nella popolazione generale, pari a oltre 100.000 pazienti stimati in Italia. La patologia è caratterizzata da espressione morfologica e decorso clinico eterogenei¹, e si identifica per la presenza di ipertrofia ventricolare sinistra, generalmente asimmetrica, in assenza di malattie cardiache o sistemiche in grado di pro-

Clinical relevance of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy.

Summary. More than two decades have elapsed since the discovery that sarcomere gene defects cause familial hypertrophic cardiomyopathy (HCM). Since then, genetic testing in HCM has developed and expanded, and is now widely available as a potential clinical service in the Western countries. In the meantime, however, the cross-talk between geneticists and clinicians has developed slowly, and still remains unstandardized, with modalities of interaction and degree of mutual comprehension that vary wildly in various settings. In addition, clinicians often question the clinical utility of genetic testing in HCM patients and their families. The apparent lack of practical benefit, in the face of considerable costs, has long hindered large-scale diffusion of genetic testing, particularly in developing countries, and still accounts for understandable (but not always justifiable) resistance on the part of the physicians. However, such resistance is in contrast with considerable evidence supporting a role for molecular diagnosis in tailoring management for HCM patients. We here review several sound clinical reasons in favour of systematic genetic testing in HCM, ranging from identification of complex genotypes, heralding severe disease expression and outcome, to the added benefit of multidisciplinary genetic teamwork, enhancing awareness towards inheritable diseases in the cardiology community. We hope to show that to underestimate the clinical potential of genetic testing in HCM, and to defer its implementation until more advanced knowledge becomes available, is to lose an important opportunity for present improvement in care.

Key words. Genetic counselling, genetic test, hypertrophic cardiomyopathy, sarcomeric mutation.

durre tale ipertrofia (figura 1). Nel 1869 Liouville e Hallopeau descrissero per la prima volta quadri di ipertrofia asimmetrica del setto interventricolare, ma solo negli anni '50 la CMI venne descritta come entità clinica a sé stante, denominata "ostruzione funzionale del ventricolo sinistro" e "ipertrofia settale asimmetrica" grazie alle osservazioni pubblicate dal patologo Teare. Nel 1957, in seguito ad esami autoptici effettuati su nove pazienti (di cui otto morti di morte improvvisa), Teare individuò una spiccata ipertrofia del muscolo cardiaco, e

¹SOD Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze; ²Centro di Riferimento per le Cardiomiopatie. Pervenuto il 15 luglio 2011.

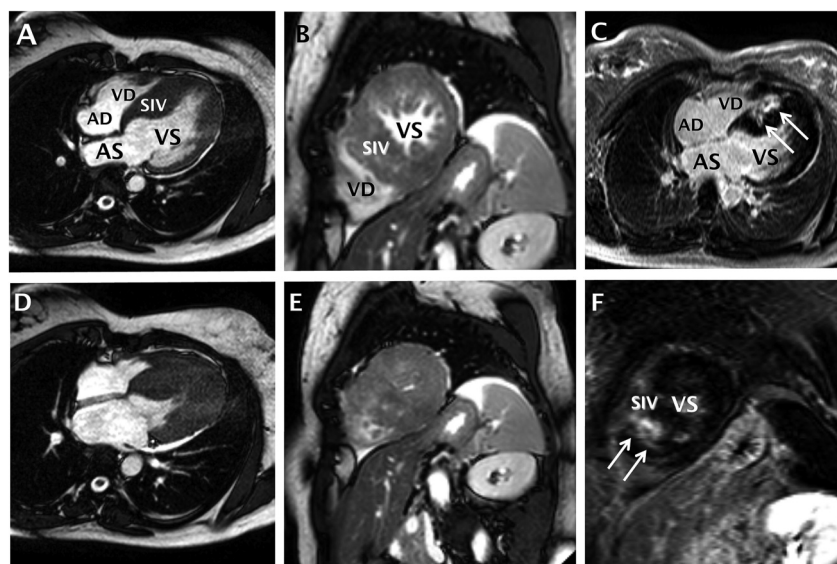


Figura 1. Paziente di 32 anni affetta da Cardiomiopatia Iperτροφica con ipertrofia di grado marcato prevalente a livello medio-apicale. Immagini di risonanza magnetica nucleare ottenute con sequenze cine in telediastole (A,B,C) ed in telesistole (D,E,F). A,D: Le immagini in 4 camere mostrano l'importante ispessimento del setto interventricolare e della parete anteriore medio-apicale, e dilatazione biatriale. B,E Sezione coronale asse corto a livello medio-ventricolare: è evidente l'obliterazione sistolica di cavità a questo livello. C,D Immagini ottenute rispettivamente in 4 camere ed asse corto, dopo somministrazione di mezzo di contrasto: sono evidenti le aree di impregnazione tardiva del setto interventricolare (freccie), espressione di fibrosi intramiocardica. AD atrio destro; AS atrio sinistro; SIV setto interventricolare; VD ventricolo destro; VS ventricolo sinistro

ne intuì la natura familiare². Poco dopo, nel 1959, venne effettuata per la prima volta una diagnosi di CMI *in vivo*, presso il Clinical Center of National Institutes of Health, negli USA³. Negli anni '70, l'introduzione della metodica ecocardiografica e i suoi continui progressi hanno consentito di caratterizzare con precisione il grado e la sede dell'ipertrofia, di visualizzare in tempo reale il contatto sistolico del lembo anteriore della mitrale (SAM) con il setto interventricolare, e di misurare i gradienti sistolici intraventricolari e i flussi intracavitari⁴⁻⁷. L'ecocardiografia ha inoltre permesso di osservare l'evoluzione nel tempo dei pazienti con CMI, portando alla luce i diversi profili evolutivi della malattia^{8,9}, e di eseguire screening familiari su ampia scala. Recenti contributi nella diagnosi di CMI sono stati portati dall'introduzione della RMN cardiaca che permette una migliore definizione anatomica rispetto all'ecocardiografia, ma soprattutto la valutazione della presenza ed estensione della fibrosi intramiocardica¹⁰.

Le manifestazioni morfofunzionali e cliniche della malattia sono molto eterogenee. I pazienti con CMI possono rimanere asintomatici per tutta la vita; nella maggioranza dei casi, tuttavia, sono presenti sintomi che possono comparire a qualsiasi età e che comprendono la dispnea, l'astenia, il dolore toracico tipico o atipico per *angina pectoris*, le palpitazioni e la sincope. Il quadro sintomatologico è in genere di entità lieve o moderata, e risulta compatibile con uno stile di vita normale: nei

sai minore di quanto precedentemente riportato (intorno all'1% all'anno)^{1,13,14}. La complicanza più temibile della CMI, la morte improvvisa aritmica, si osserva in una minoranza di pazienti; purtroppo, l'identificazione dei soggetti a rischio resta molto difficile, in assenza di marker specifici per la prevenzione primaria.

La CMI come malattia del sarcomero

La scoperta delle basi genetiche della CMI è scaturita da un'estesa collaborazione tra clinici, genetisti, ricercatori e famiglie di pazienti. La natura familiare della malattia era nota fin dagli anni '50; tuttavia l'identificazione della prima mutazione genetica associata a CMI, nel gene codificante la catena pesante della β -miosina (MYH7), risale al 1987, in seguito a studi di linkage su famiglie estremamente ampie¹⁵. Oggi la CMI è universalmente conosciuta come una malattia autosomica dominante del sarcomero, causata da varianti in almeno 13 geni codificanti proteine dell'apparato contrattile del cardiomiocita. (figura 2 e tabella 1). Tra i geni sarcomerici, 8 sono quelli comunemente analizzati a scopo diagnostico: il gene della proteina C legante la miosina, la cui sigla internazionale è MYBPC3; il gene della catena pesante della β -miosina, o MYH7; il gene della catena essenziale leggera 1 della miosina, o MYL3; il gene della catena regolatrice leggera 2 della miosina, o MYL2;

bambini e negli adolescenti la malattia viene spesso riconosciuta solo nel corso di studi di screening familiari. In circa un terzo dei pazienti, tuttavia, la CMI progredisce verso lo scompenso cronico, che può divenire refrattario, fino ad una fase ipocinetico-dilatativa definita "end-stage". Sfortunatamente, predire il corso clinico e l'esito della malattia nei singoli pazienti con CMI si è rivelato molto difficile. Le prime grandi casistiche di pazienti con CMI, raccolte presso i Centri di riferimento internazionali negli anni '70, presentavano la CMI come una condizione ad alto rischio, soprattutto nei giovani, con una mortalità annuale riportata del 3-6%^{11,12}. Studi più recenti, in popolazioni con minor grado di selezione, hanno mostrato che la CMI presenta in realtà un decorso relativamente stabile, una prognosi complessivamente benigna ed una mortalità globale as-

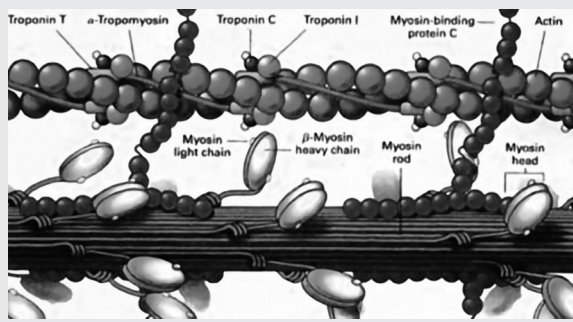


Figura 2. Il Sarcomero Cardiaco. (Immagine modificata da Watkins, 2003).

il gene della troponina T cardiaca, o *TNNT2*; il gene della troponina I, o *TNNI3*; il gene dell' α -actina, o *ACTC*; ed il gene dell' α -tropomiosina, o *TPM1*. Una mutazione in questi geni viene identificata in circa i due terzi dei pazienti sottoposti a screening genetico. I difetti di *MYH7* e *MYBPC3* sono i più frequenti, caratterizzando circa il 50% delle diagnosi genetiche; gli altri 6 geni coprono una per-

centuale che va da un 3% ad un 15% del totale a seconda dei centri¹⁶. Inoltre, dal 3% al 6% dei soggetti con CMI presenta un genotipo complesso, caratterizzato cioè da più mutazioni coesistenti, sia nello stesso gene (eterozigote composto) che in geni diversi (eterozigote doppio); nell'1% dei pazienti sono addirittura descritte triple mutazioni¹⁷.

Al contrario di altre malattie genetiche quali la Fibrosi Cistica o l'Emofilia, in cui le mutazioni genetiche sono ricorrenti, la CMI è caratterizzata da estrema variabilità nelle mutazioni riscontrate. Nei geni sarcomerici sono state infatti descritte oltre 1000 varianti diverse, la maggior parte delle quali identificate in una sola famiglia e perciò definite "private". Eccezionalmente sono descritte mutazioni con "effetto founder" e perciò tipiche di una precisa area geografica^{18,19}. Le varianti identificate, soprattutto nel gene *MYH7*, sono di tipo missense, ossia caratterizzate dalla sostituzione di una singola base di DNA che dà luogo a sua volta alla sostituzione di un singolo aminoacido nella struttura proteica. Nel gene *MYBPC3*, invece, circa la metà delle varianti sono di tipo frameshift, dette anche mutazioni da scivolamento. Queste sono causate dall'aggiunta (inserzione) o l'elimina-

Tabella 1. Geni coinvolti nella Cardiomiopia Ipertrofica.

Gene	Simbolo	Locus	Prevalenza (%)
Proteine sarcomeriche			
Catena pesante della β -miosina	<i>MYH7</i>	14q11.2-q12	25-30
Proteina C legante la miosina	<i>MYBPC3</i>	11p11.2	25-30
Troponina T	<i>TNNT2</i>	1q32	5
Troponina I	<i>TNNI3</i>	19p13.4	~5
α -tropomiosina	<i>TPM1</i>	15q22.1	<5
Catena leggera della Miosina			
Essenziale	<i>MYL3</i>	3p21.2-p21.3	<1
Regolatrice	<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	<1
Catena pesante dell' α -miosina	<i>MYH6</i>	14q11.2-q12	rara
Troponina C	<i>TNNC</i>	15q14	rara
Actina	<i>ACTC</i>	3p21	rara
Altre proteine			
Proteina LIM	<i>CSRP3</i>	10q22.2-q23.3	<2
α -actina 2	<i>ACTN2</i>	1q42-q43	rara
Titina	<i>TTN</i>	2q13-33	rara
Fosfolambano	<i>PLN</i>	6q22.1	rara
Caveolina-3	<i>CAV3</i>	3p25	rara
Teletonina	<i>TCAP</i>	17q12-q21.1	rara
Giuntofilina	<i>JPH2</i>	20q12	rara
LIM binding domain 3 (ZASP)	<i>LBD3</i>	10q22.2-q23.3	rara

zione (delezione) di uno o pochi nucleotidi che, nel caso i nucleotidi modificati siano in numero non multiplo di tre, alterano tutta la struttura della proteina a valle (in inglese: frame). Molto frequentemente tale meccanismo porta ad un arresto della sintesi proteica e conseguentemente alla produzione di una proteina tronca. Per le forme di CMI associate a mutazioni frameshift di MYBPC3, è stato ipotizzato un meccanismo patogenetico di aploinsufficienza, per cui l'allele non mutato (wild-type) non riesce a compensare la carenza di proteina determinata da quello mutato. Per le mutazioni missense la maggior parte dei modelli transgenici indica che la CMI deriva da effetti di dominanza negativa (cioè da un effetto "tossico" della proteina mutata), più che da aploinsufficienza¹. Ad oggi, tuttavia, la patogenesi della CMI a partire dalla mutazione sarcomerica resta largamente ignota, e verosimilmente sono coinvolti più meccanismi, come suggerito dalla marcata eterogeneità di espressione interindividuale della malattia²⁰.

Nell'ambito delle casistiche cliniche con CMI, è stata inoltre accertata in tempi recenti la presenza delle cosiddette "fenocopie", cioè di patologie con espressione morfologica molto simile o indistinguibile dalla CMI sarcomerica, ma causate da meccanismi molecolari molto diversi e associate a significative differenze sul piano prognostico e terapeutico. Sono state ad esempio identificate cardiomiopatie a fenotipo ipertrofico associate a mutazioni nei geni del metabolismo energetico e della produzione di ATP. Rientrano in questo gruppo le cardiomiopatie secondarie a deficit della catena respiratoria mitocondriale (CMM), le cardiomiopatie da alterazioni del metabolismo lipidico e un gruppo geneticamente eterogeneo rappresentato dalle cardiomiopatie da accumulo. Tra queste ultime troviamo due malattie X-linked quali la sindrome di Anderson Fabry (da difetto del gene per l'alfa-galattosidasi A), in cui le manifestazioni cardiologiche si associano spesso a un quadro clinico complesso con interessamento multiorgano, e la malattia di Danon (da difetto del gene LAMP2)^{21,22} caratterizzata da aumento estremo della massa cardiaca in età pediatrica. Infine, una cardiomiopatia di incerta classificazione è quella secondaria a mutazioni nella subunità catalitica 2 della proteina chinasi AMP-attivata (PRKAG2), in cui il fenotipo ipertrofico si associa a frequente e precoce comparsa di pre-eccitazione ventricolare²³.

Ipotesi patogenetiche

L'incorporazione di proteine mutate nel sarcomero porta alla compromissione del normale funzionamento delle proteine wild-type e questo è stato dimostrato essere la principale causa di sviluppo dell'ipertrofia nella CMI²⁴. Inizialmente si pensava che la mutazioni dei geni che codificano proteine mutate portasse nel sarcomero una depressione della funzione contrattile, con conseguente deplezione energetica del cardiomiocita determi-

nando così un'ipertrofia compensatoria²⁵. Tuttavia studi successivi hanno dimostrato che mutazioni a carico della miosina possono addirittura portare ad un incremento dell'attività contrattile e ad un aumento della sensibilità al Ca^{2+} delle proteine regolatorie dei filamenti sottili^{26,27}. Per questo, alcuni autori hanno ipotizzato che la CMI rappresenti non tanti il risultato di un deficit contrattile, quanto della deplezione energetica del cardiomiocita, a causa di un inefficiente impiego dei depositi di energia cellulare a causa della anomalia del sarcomero. Ashrafian nel 2003 ha dimostrato che la presenza di proteine mutate nel sarcomero portavano ad un incremento della richiesta energetica causata da un inefficiente utilizzo dell'ATP. Questa alterazione comporta una ridotta capacità del cardiomiocita di mantenere i livelli energetici nel compartimento responsabile della contrazione, e compromette importanti funzioni omeostatiche come il re-uptake del calcio intracellulare. Il conseguente, prolungato transiente di calcio, stimola i processi trascrizionali, attraverso l'attivazione di messengeri cellulari (proteine chinasi Calcio-calmodulina-dipendente; via delle MAP-chinasi; fattori di trascrizione): l'insieme di tutti questi segnali porterebbe allo sviluppo dell'ipertrofia, come meccanismo di compenso.

Nuove ipotesi sullo sviluppo della CMI riguardano la possibilità che le mutazioni sarcomeriche interferiscano con lo sviluppo embriologico del cuore, in particolare con i meccanismi di migrazione e differenziazione delle cellule pluripotenti che derivano dal pro-epicardio. Durante le fasi iniziali dello sviluppo embrionale, cellule pro-epicardiche migrano a costituire l'epicardio, e da qui migrano diffusamente all'interno del miocardio e si differenziano in varie linee cellulari, che danno luogo ai fibroblasti interstiziali, alla muscolatura liscia vascolare, alle cellule avventizie, alle valvole atrio-ventricolari. Le mutazioni del sarcomero, e l'alterata contrattilità del cuore primordiale all'epoca di questa colonizzazione, potrebbero influenzare l'espressione genica delle cellule epicardiche, mediante un meccanismo di mecano-trasduzione. Infatti, al momento della migrazione di queste cellule dall'epicardio al miocardio, il cuore ha già iniziato a contrarsi e le mutazioni causa di CMI sono già espresse²⁸. Tale meccanismo potrebbe spiegare le molte espressioni fenotipiche della CMI che riguardano tessuti diversi dal miocardio, in cui le mutazioni non sono espresse: come ad esempio le alterazioni della valvola mitralica, il rimodellamento del microcircolo e la fibrosi interstiziale.

Correlazioni genotipo-fenotipo

La CMI è caratterizzata da una grande eterogeneità genetica, fenotipica e clinica, con scarsa correlazione tra i vari aspetti nel singolo individuo. Per tale motivo, una volta identificata la mutazione causante CMI in un paziente, non è in genere possibile trarne informazioni prognostiche o im-

plicazioni riguardo allo sviluppo di un fenotipo più o meno marcato nei familiari. La stessa mutazione può determinare un ampio spettro di fenotipi perfino nell'ambito della stessa famiglia, e suggerisce l'importanza di geni modificatori (varianti in cis o in trans, polimorfismi, varianti rare), fattori epigenetici (grado di metilazione del DNA, di acetilazione degli istoni, e modificazioni post trascrizionali), e fattori ambientali (età, attività sportiva, fumo, ecc.) nel determinare le manifestazioni morfologiche e cliniche della malattia. Sebbene labili, correlazioni genotipo-fenotipo sono state ricercate attivamente in passato, soprattutto nei primi anni dopo la scoperta dei geni coinvolti nella CMI. Ad esempio, in alcuni studi le mutazioni nel gene MYH7 venivano associate ad insorgenza precoce della malattia, elevata penetranza ed ipertrofia di grado marcato, mentre le mutazioni nel gene TNNT2 sembravano comportare una ipertrofia di grado modesto ma un alto rischio di morte improvvisa, e mutazioni del gene MYBPC3 si correlavano ad insorgenza tardiva di malattia, penetranza incompleta e prognosi favorevole¹. Inoltre, specifiche mutazioni, identificate nei geni MYH7 e TNNT2, fortunatamente rare, sono state correlate con un alto rischio di morte improvvisa in giovane età e perciò definite "maligne"²⁹. Tuttavia, tali associazioni genotipo-fenotipo si basavano su piccoli numeri di pazienti, appartenenti a famiglie molto ampie, altamente selezionate per rischio aritmico. In realtà, studi successivi su grandi casistiche hanno spesso contraddetto tali assunti. Un esempio eclatante è quello delle mutazioni di TNNT2, che in alcuni centri venivano considerate di per sé un fattore di rischio maggiore per morte improvvisa, indipendentemente dal profilo clinico. L'esperienza del nostro e di altri centri ha dimostrato che la CMI da TNNT2 può associarsi a profili estremamente diversi malattia che spaziano da forme lievi e asintomatiche fino a forme con ipertrofia marcata e sintomi invalidanti, con un rischio di morte improvvisa non diverso dagli altri geni³⁰.

Ruolo clinico del test genetico

Fino a poco tempo fa considerata un mero strumento di ricerca, la diagnostica genetica è oggi un momento estremamente importante dell'inquadramento di pazienti con CMI e delle loro famiglie, e riveste un ruolo pratico che è ancora poco apprezzato dai cardiologi, anche per le limitate opportunità di interazione con i genetisti in ambito cardiologico. Il contributo del test genetico si riflette su vari momenti dell'iter clinico dei pazienti con CMI.

CONFERMA DELLA DIAGNOSI NEI FENOTIPI DUBBI

Nell'ambito della CMI, sono frequenti i cosiddetti casi "grigi", il grado di ipertrofia è talmente lieve da non consentire una diagnosi sicura, e i re-

stanti reperti strumentali (soprattutto l'ECG) sono nella norma. Questa situazione è ricorrente ad esempio nel caso degli atleti. In questi individui, l'identificazione di una mutazione in uno dei geni sarcomerici consente di confermare diagnosi di CMI³¹. Tale possibilità ha consentito di svelare gli aspetti più lievi della malattia, e di caratterizzare meglio lo spettro fenotipico, soprattutto in ambito di screening familiare; tra le altre cose, questo fatto ha permesso di validare le manifestazioni ancillari della malattia (dilatazione atriale sinistra, aspetti di non compattazione del VS, anomalie della mitrale) che vengono descritte frequentemente con le tecniche di imaging oggi disponibili.

DIAGNOSI DIFFERENZIALE

Il test genetico può essere utile per distinguere una CMI primitiva, cioè causata da mutazioni in geni sarcomerici, dalle forme cosiddette pseudo-ipertrofiche (fenocopie). Particolarmente importante è la possibilità di distinguere forme autosomiche dominanti da forme X-linked e perciò la possibilità di stabilire un preciso rischio di ricorrenza e di trasmissibilità familiare³².

IDENTIFICAZIONE DEI GENOTIPI COMPLESSI E RISCHIO DI PROGRESSIONE DI MALATTIA

La possibilità di identificare genotipi complessi rappresenta un elemento prognostico importante. La presenza di due o più mutazioni in uno stesso paziente è solitamente associata ad insorgenza precoce della malattia, decorso sfavorevole e rischio aumentato di morte improvvisa o per scompenso¹⁶. Questi dati sono importanti nell'identificazione del paziente a rischio. In un recente lavoro del nostro gruppo¹⁷, si descrivono quattro famiglie con CMI, in cui il soggetto indice presenta un genotipo complesso con tre mutazioni in vari geni. Anche se la presenza di tre mutazioni si riscontri raramente (0,8%), essa rappresenta un rischio aumentato di progressione verso la fase end-stage e di aritmie ventricolari, suggerendo un'associazione tra genotipo complesso ed progressione di malattia sfavorevole. Escludendo questi casi estremi, è comunque una regola generale il fatto che i gruppi di pazienti con test genetico positivo presentano un aumentato rischio di decorso sfavorevole della malattia, rispetto al gruppo dei pazienti negativi al test¹⁶.

RIVALUTAZIONE CRITICA DELLA DIAGNOSI NEI PAZIENTI GENOTIPO-NEGATIVI

I pazienti negativi al test genetico rappresentano un gruppo composito, in cui la malattia è verosimilmente causata da geni non ancora identificati, oppure è ad eziologia non genetica^{1,16}. Nella pratica clinica ciascun paziente con fenotipo CMI e

test genetico è negativo deve essere rivalutato per sottoporlo ulteriori esami. In particolare, è importante escludere una CMI associata a malattie neuromuscolari, o mutazione nei geni che possono produrre fenocopie. Soprattutto se il soggetto è un giovane, è fondamentale andare alla ricerca di manifestazioni extra-cardiache quali dimorfismi facciali, deficit neurologico, coinvolgimento renale etc. Queste evidenze, che spesso sfuggono al cardiologo, invece possono essere estremamente utili per orientare la diagnosi nella giusta direzione. Una consulenza genetica clinica di II livello può permettere di distinguere le forme sindromiche associate a cardiomiopatia, come ad esempio le sindromi di Noonan e di Leopard, la malattia di Anderson-Fabry, ecc.^{16,21,22,30}. Perciò nei protocolli standard per l'esecuzione del test genetico deve essere inclusa la consulenza pre test e post test eseguita in team multidisciplinare.

DIAGNOSI PRE-NATALE

In situazioni in cui la CMI familiare è associata da un'insorgenza in età giovane e con una forma particolarmente severa con più soggetti morti improvvisamente in giovane età, la diagnosi prenatale potrebbe essere effettuata allo scopo di identificare la presenza della mutazione nel feto³³.

Tuttavia a causa delle incerte correlazioni genotipo-fenotipo, dovute alla variabile espressione clinica, non si ha indicazione ad effettuare la diagnosi prenatale nel caso della CMI primitiva.

PROCEDURA SEGUITA PER EFFETTUARE IL TEST GENETICO

Il contatto del paziente (e del cardiologo) con la genetica va ben oltre il semplice test, e comporta una vero e proprio iter con diverse tappe di significato diverso (figura 3). La procedura seguita presso il Centro di Firenze negli ultimi 10 anni prevede una consulenza pre-test (fase pre-analitica), la fase analitica durante la quale viene eseguito il test in laboratorio ed una consulenza post-test (fase post-analitica). Le procedure è la stessa per probandi e familiari.

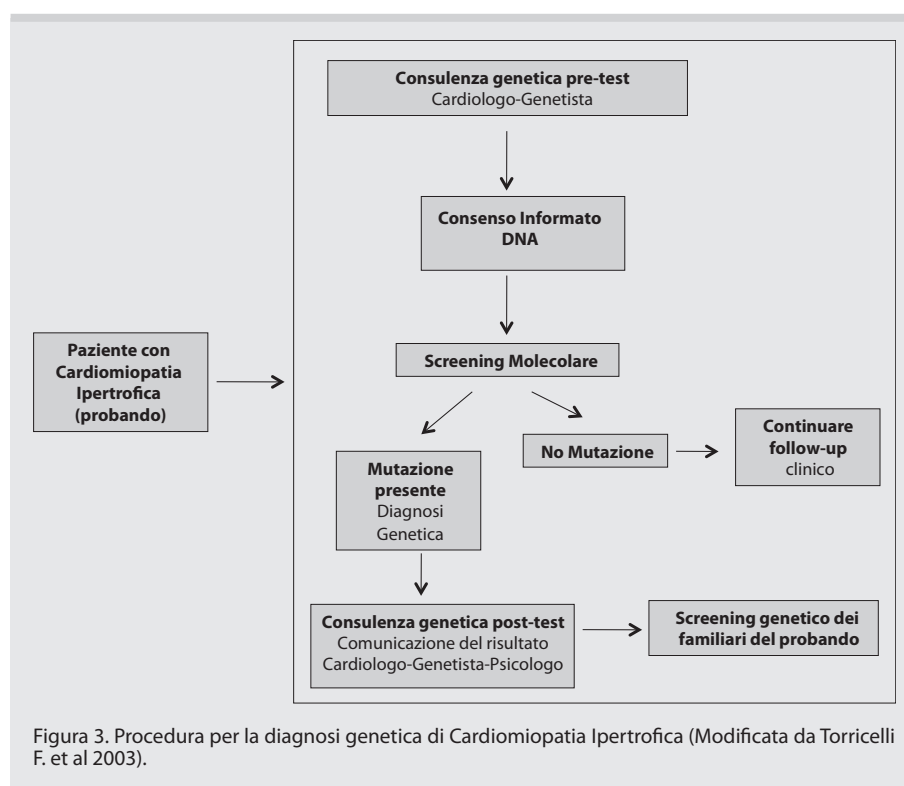
Durante la fase pre-analitica, il cardiologo propone al paziente di effettuare una consulenza genetica dal genetista. Per tale colloquio si impiegano circa 30-45 minuti. La consulenza geneti-

ca è stata definita come "Processo di comunicazione che concerne i problemi umani legati all'occorrenza o al rischio di ricorrenza di una patologia genetica in una famiglia"³². Durante la consulenza genetica pre-test viene effettuata la raccolta delle informazioni e dei quesiti posti dal consultando, viene costruito l'albero genealogico della famiglia, si effettua una prima valutazione del rischio di ricorrenza, si discute con l'interessato di ciò che è possibile fare per poter meglio precisare l'entità del rischio, chiarendo il significato e i limiti del test genetico ed infine viene raccolto uno specifico consenso informato.

La consulenza genetica ed il consenso informato sono parti integranti di un test genetico poiché permettono la discussione preliminare di tutte le possibili implicazioni dei diversi risultati ottenuti dal test, devono fornire gli strumenti per la comprensione della malattia genetica e per questo implicano l'utilizzo di particolari procedure atte ad affrontare le problematiche psicologiche, etiche e sociali insite nell'utilizzo dei test genetici³².

Segue una fase analitica durante la quale viene effettuata la ricerca di mutazioni nei geni implicati nella CMI mediante sequenziamento in automatico a partire da DNA estratto da un prelievo di sangue periferico.

Nella fase post-analitica viene effettuata la verifica dei risultati, la preparazione del referto e la consulenza genetica post-test. La consegna del referto al paziente viene effettuata dal cardiologo insieme al genetista, secondo un approccio multidisciplinare, e prevede in particolare la spiegazione



delle ricadute pratiche del test. Talvolta è presente anche uno psicologo. In particolare è in questa fase che sia apre la possibilità di far accedere al test genetico i familiari del probando.

In generale il test genetico effettuato in un paziente con CMI può dare tre risultati diversi:

1. Identificazione di una mutazione certamente patogenetica già descritta in letteratura; in questo caso la diagnosi genetica è certa, per cui il genotipo osservato è compatibile con la diagnosi clinica e viene sempre proposto il test ai familiari.

2. Non identificare nessuna mutazione nei geni studiati a scopo diagnostico; in questo caso viene precisato che l'eventuale causa genetica della CMI potrebbe trovarsi o in geni non analizzati (più rari) oppure in geni al momento ancora non identificati. Ovviamente non può essere esclusa la diagnosi clinica sulla base di un risultato negativo del test.

3. Identificazione di una Variante non Classificabile (UVs) ossia una alterazione precedentemente non descritta per la quale è necessario definire una probabilità di associazione con la malattia tramite ulteriori approfondimenti³⁴.

Test presintomatico

In questa situazione il probando è clinicamente sano, con un ecocardiogramma ed un elettrocardiogramma normali, appartenente ad una famiglia che presenta casi di CMI. Il paziente richiede il test genetico perché vuole sapere se ha ereditato o meno la mutazione responsabile della malattia nella sua famiglia. Il rischio teorico di presentare la mutazione è del 50% (probabilità a priori), nel caso in cui il soggetto sia parente di primo grado del paziente con CMI. Tuttavia la penetranza è incompleta (70% nell'adulto), incrementa con l'età ed è legata al sesso, oltre che a fattori ambientali (abitudini di vita quali fumo, alcol, attività sportiva). La ragione per cui un soggetto richiede il test è frequentemente duplice: il rischio di essere "portatore" della mutazione causa della malattia e di sviluppare la malattia stessa, e il rischio di trasmettere la malattia alla discendenza.

Tuttavia non è noto nessun trattamento medico, in grado di prevenire o ritardare l'insorgenza della malattia. Il solo trattamento efficace nel prevenire la morte improvvisa è un defibrillatore impiantabile, ma che viene proposto solo per i pazienti con CMI ad alto rischio di morte cardiaca improvvisa¹. Nei pazienti sani, portatori della mutazione, può essere raccomandata la restrizione dell'attività fisica, tuttavia l'effetto di tale provvedimento nel prevenire la morte improvvisa è puramente speculativo³².

Nel caso in cui il soggetto risulti positivo sarà necessario un follow-up medico, volto alla diagnosi precoce dell'espressione fenotipica della malattia e alla valutazione del rischio di morte improvvisa, se possibile. Inoltre per questo soggetto ci sarà il rischio di trasmettere la mutazione alla prole. Se il

soggetto risulta negativo il paziente avrà un notevole beneficio a livello psicologico, e con l'interruzione dei controlli clinici periodici, si avrà un vantaggio anche per il sistema sanitario^{30,32}.

Il test genetico nei minori a scopo presintomatico

L'applicazione del test genetico a scopo presintomatico nei bambini è un argomento controverso: alcuni studi hanno enfatizzato i potenziali benefici, specialmente perché la morte improvvisa può essere il primo sintomo della malattia; altri considerano il test presintomatico nei bambini più deleterio che altro, per la mancanza di efficaci trattamenti per prevenire l'insorgenza della malattia e la morte improvvisa, e per i possibili effetti psicologici negativi³². Attualmente molti gruppi hanno riserve nell'effettuare il test genetico presintomatico prima della maggiore età, riferendosi al decreto del Garante della Privacy, dove si dice che: "I trattamenti di dati connessi all'esecuzione di test genetici presintomatici possono essere effettuati sui minori non affetti, ma a rischio per patologie genetiche solo nel caso in cui esistano concrete possibilità di terapie o di trattamenti preventivi prima del raggiungimento della maggiore età" (Autorizzazione generale del trattamento dei dati genetici, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n.65 del 19 marzo 2007)³⁰.

Conclusioni

Il test genetico rappresenta un punto di forza per il clinico allo scopo di inquadrare correttamente i pazienti con CMI. Risulta fondamentale al fine di confermare la diagnosi nei fenotipi dubbi, riveste un ruolo importante nella diagnosi differenziale oltre ad essere utile nell'identificazione dei genotipi complessi. Inoltre, stabilendo la natura ereditaria della malattia, interessa anche i familiari del probando, nei quali può essere utilizzato a scopo presintomatico.

Lo svilupparsi di nuove tecnologie per l'analisi di molti geni contemporaneamente, quali le piattaforme di Next-Generation Sequencing, unitamente alla sempre più stretta collaborazione tra clinici e genetisti, permetteranno di ampliare sempre più le conoscenze sulla genetica di questa malattia.

Bibliografia

1. Maron BJ, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy. A systematic review. JAMA 2002; 287: 1308-20.
2. Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. British Heart Journal 1958; 20: 1-8.
3. Maron BJ, McKenna WJ, et al. ACC/ESC EXPERT CONSENSUS DOCUMENT American College of Cardiology/European Society of Cardiology Clinical Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology 2003; 42: 1687-713.

4. Morrow AG, Braunwald E. Functional aortic stenosis; a malformation characterized by resistance to left ventricular outflow without anatomic obstruction. *Circulation* 1959; 20: 181-9.
5. Shah PM, Gramiak R, Adelman AG, et al. Role of echocardiography in diagnostic and hemodynamic assessment of hypertrophic subaortic stenosis. *Circulation* 1971; 44: 891-8.
6. Epstein SE, Morrow AG, Henry WL, et al., Editorial: The role of operative treatment in patients with idiopathic hypertrophic subaortic stenosis. *Circulation* 1973; 48: 677-80.
7. McKenna W, Deanfield J, Faruqi, et al. Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy: role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. *Am J Cardiol* 1981; 47: 532-8.
8. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 655-70.
9. Olivetto I, Cecchi F, Gistri R, et al. Relevance of coronary microvascular flow impairment to long-term remodeling and systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1043-8.
10. Nagueh SF, Bierig SM, Budoff MJ, et al. American Society of Echocardiography clinical recommendations for multimodality cardiovascular imaging of patients with hypertrophic cardiomyopathy: Endorsed by the American Society of Nuclear Cardiology, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, and Society of Cardiovascular Computed Tomography. American Society of Echocardiography; American Society of Nuclear Cardiology; Society for Cardiovascular Magnetic Resonance; Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Soc Echocardiogr* 2011; 24: 473-98.
11. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995; 332: 1058-64.
12. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 655-70.
13. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, et al. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002; 105: 446-51.
14. Nistri S, Olivetto I, Girolami F, et al. Looking for hypertrophic cardiomyopathy in the community: why is it important? *J Cardiovasc Transl Res* 2009; 2: 392-7.
15. Seidman CE, Seidman JG. Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circ Res* 2011; 108: 743-50.
16. Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, et al. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2008; 83: 630-8.
17. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, et al. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 1444-53.
18. Girolami F, Olivetto I, Passerini I, et al. A molecular screening strategy based on beta-myosin heavy chain, cardiac myosin binding protein C and troponin T genes in Italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med* 2006; 7: 601-7.
19. www.angis.org.au/Databases/Heart/heartbreak.html; cardiogenomics.med.harvard.edu; www.gdb.org; www.hgmd.cf.ac.uk
20. McKenna WJ, Elliott PM. *Cardiomiopatia Ipertrofica. Textbook of Cardiovascular Medicine* 2009; 28: 433-47.
21. Patel MR, Cecchi F, Cizmarik M, et al. Cardiovascular events in patients with fabry disease natural history data from the fabry registry. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57: 1093-9.
22. Maron BJ, Roberts WC, Arad M, et al. Clinical Outcome and Phenotypic Expression in LAMP2 Cardiomyopathy. *JAMA* 2009; 301: 1253-9.
23. Giordano C, D'Amati G. Cardiomyopathies due to defective energy metabolism: morphological and functional features]. *Pathologica* 2005; 97: 361-8.
24. Ashrafian H, Redwood C, Blair E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet* 2003; 19: 263-8.
25. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995; 332: 1058-64.
26. Lowey S. Functional consequences of mutations in the myosin heavy chain at sites implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 348-54.
27. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* 2008; 29: 270-276.
28. Olivetto I, Girolami F, Nistri S, et al. The many faces of hypertrophic cardiomyopathy: from developmental biology to clinical practice. *J Cardiovasc Trans Res* 2009; 2: 349-67.
29. Ackerman MJ, VanDriest SL, Ommen SR, et al. Prevalence and age-Dependence of malignant mutations in the Beta-myosin heavy chain and troponin T genes in Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC* 2002; 39: 2042-8.
30. Torricelli F, Girolami F, Olivetto I, et al. Prevalence and clinical profile of troponin T mutations among patients with hypertrophic cardiomyopathy in tuscany. *Am J Cardiol* 2003; 92: 1358-62.
31. Baldi M, Girolami F. A new type of "tracing" for cardiologists? *G Ital Cardiol (Rome)* 2009; 10: 266.
32. Charron P, Heron D, Gargiulo M, et al. Genetic testing and genetic counselling in hypertrophic cardiomyopathy: the French experience. *J Med Genet* 2002; 39: 741-6.
33. Charron P, Héron D, Gargiulo M, et al. Prenatal molecular diagnosis in hypertrophic cardiomyopathy: report of the first case. *Prenat Diagn* 2004; 24(9): 701-3.
34. Clinical Molecular Genetics Society (CMGS). Practice guidelines for the interpretation and reporting of unclassified variants (UVs) in clinical molecular genetics. Available at: <http://www.cmgs.org/>.

Indirizzo per la corrispondenza:
 Dott. Francesca Girolami
 SOD Diagnostica Genetica
 Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi
 Largo Brambilla, 3
 50134 Firenze
 E-mail: girolamif@aou-careggi.toscana.it