UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali
Dottorato di Ricerca in
Translational Molecular Medicine and Surgery
Ciclo: XXXV
Coordinatore Dottorato:
Ch.mo Prof. Gaetano Caramori
Vice coordinatore:
Ch.ma Prof. Alessandra Bitto

STORIA NATURALE DEI DIFETTI DI CONDUZIONE ATRIO-VENTRICOLARI E ARITMIE IN PAZIENTI CON CARDIOMIOPATIA DILATATIVA: ANALISI GENETICA MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING

Settore Scientifico Disciplinare: 06/D1 – MED/11

Ph.D. tesi:
Dott. ssa Mariapaola Campisi

Tutor:
Ch.mo Prof. Gianluca Di Bella

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE 3
1.1 Definizione e classificazione delle cardiomiopatie 3

2. DIAGNOSI DELLE CARDIOMIOPATIE 19
2.1 Elettrocardiogramma 20
2.2 Ecocardiogramma color doppler 22
2.3 Risonanza Magnetica cardiaca 24
2.4 Biopsia Endomiocardica 25
2.5 Esami Ematochimici 26
2.6 Test Genetici 27

3. DEFINIZIONE DELLE LAMINOPATIE 29

4. DIFETTI DI CONDUZIONE E ARITMIE 35
4.1 Fenotipi in base al difetto di conduzione e aritmie 35

5. SCOPO DELLO STUDIO 36

6. MATERIALI E METODI 37
6.1 ...Pazienti arruolati 37
6.2 Analisi genetiche 38
6.3 Limiti del test 40
6.4 Analisi bioinformatica 41

7. RISULTATI 44

8. DISCUSSIONE 56

9. CONCLUSIONI 59

BIBLIOGRAFIA 60

1. INTRODUZIONE

1.1 Definizione e classificazione delle cardiomiopatie

"Le cardiomiopatie sono malattie caratterizzate da anomalie morfologiche e funzionali del miocardio in assenza di qualsiasi altra patologia sufficiente, di per sé, a causare il fenotipo", secondo quanto recita la più accreditata definizione della Società Europea di Cardiologia (1), a cui gli studiosi sono giunti in seguito a numerose proposte che nel tempo si sono susseguite.

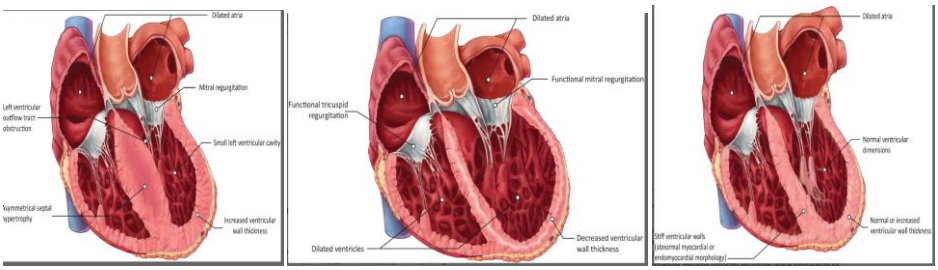
Il termine "*myocarditis*" per le "*inflammatory heart muscle diseases*" e "*myocardiosis*" per le altre "*heart muscle diseases*", fu proposto nel 1956 (2) e nell'anno successivo (3) fu adottata la definizione di cardiomiopatie come "*uncommon, non-coronary heart muscle diseases*", fino a quando Goodwin e Oakley (4) parlarono di cardiomiopatie come "*myocardial diseases of unknown origin*" e suggerirono la classificazione basata sulla distinzione tra cardiomiopatia dilatativa (DCM), ipertrofica (HCM) e restrittiva (RCM), tenendo conto della diagnosi descrittiva dei fenotipi e dei loro eventuali aspetti patologici. Questa classificazione fu mantenuta nel 1980 dalla World Health Organization (WHO) e dall'International Society and Federation of Cardiology (ISFC) che però considerando la mancanza di informazioni specifiche sulle

cause delle cardiomiopatie (5) definirono quest'ultime come "*myocardial diseases of unknown etiology*" e per delineare quelle a causa nota introdussero il termine "*specific heart muscle disease*". Un ampliamento della definizione "*diseases of myocardium associated with myocardial dysfunction*" e l'aggiunta di due ulteriori gruppi di cardiomiopatie, la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC) e le cosiddette cardiomiopatie non classificate (6), si ebbe con la successiva classificazione WHOISFC. Una nuova indicazione di classificazione da parte dell'AHA, nel 2006, si basò sull'inclusione sia del fenotipo che del genotipo (7) e, nel 2008, la ESC propose una revisione della classificazione in cui venivano formalmente riconosciute le cardiomiopatie a carattere eredo-familiari e genetiche (1).

Nel 2013 la WHF propose un nuovo sistema nosologico per le cardiomiopatie che include in aggiunta alla diagnosi descrittiva fenotipica anche informazioni cliniche relative al coinvolgimento di organi ed apparati, oltre il cuore, l'eventuale familiarità e modalità di trasmissione, le basi genetiche, nelle forme familiari, e non genetiche, nelle forme sporadiche, ed infine informazioni funzionali come lo stage ACC-AHA e la classe NYHA (8, 9).

Ad oggi le Cardiomiopatie (10) dal punto di vista fenotipico si distinguono in Dilatativa (DCM), Ipertrofica (HCM), Restrittiva

(RCM), Aritmogena del ventricolo destro (ARVC) e non classificate.



Cardiomiopatia Ipertrofica-Cardiomiopatia Dilatativa-Cardiomiopatia restrittiva

La varietà delle cause, i molteplici meccanismi fisiopatologici sottesi e le differenti espressioni fenotipiche influenzano la loro presentazione e risposta al trattamento.

La Cardiomiopatia Dilatativa (DCM) è caratterizzata da dilatazione ventricolare sinistra e disfunzione sistolica in assenza di patologia coronarica. Essa è considerata una delle cause principali di scompenso cardiaco a frazione di eiezione ridotta nel mondo che nel 40% dei casi, dopo terapia ottimizzata, porta a trapianto.

La familiarità per tale patologia è stata rilevata nel 30-50% dei casi e la genetica è determinante in più del 40% dei pazienti con DCM.

Ad oggi ci sono più di 60 geni che codificano per proteine sarcomeriche, citoscheletro, membrana nucleare, sarcolemma, canali

ionici e molecole, che fungono da giunzione intercellulare, implicate nella patogenesi.

La maggior parte delle mutazioni sono a trasmissione autosomica dominante ma ci sono anche a trasmissione X-linked, autosomica recessiva e mitocondriale (trasmissione materna).

Mutazioni a carico del gene Lamina A/C e del gene Fosfolambano sono state viste predisporre i pazienti ad alto rischio aritmico e a morte cardiaca improvvisa portando ad impianto di ICD soprattutto in prevenzione primaria.

Il restante 50% delle cause che possono portare all'insorgenza delle cardiomiopatie dilatative sono: virali, autoimmunitarie e post chemioterapiche.

La Cardiomiopatia Ipertrofica (HCM) è caratterizzata da un aumento dello spessore miocardico (≥ 15 mm e/o ≥ 13 mm dei familiari dei pazienti affetti) in uno o più segmenti della parete del ventricolo sinistro, che non può essere giustificato dalla presenza di una condizione di sovraccarico emodinamico (ipertensione arteriosa sistemica o valvulopatie).

La maggior parte dei pazienti ha un'ipertrofia asimmetrica del setto e circa il 40-70% ha un'ostruzione all'efflusso diagnosticata da un aumento del gradiente intracavitario del ventricolo sinistro ≥ 30 mmHg a riposo o sotto sforzo.

Nel 60% dei pazienti tale patologia è trasmessa in modo autosomico dominante a causa di mutazioni di geni che codificano per proteine sarcomeriche, quali la catena pesante della beta-miosina (MYH7), e per la proteina C che lega la miosina (MYBPC3). Meno comuni sono le mutazioni dei geni che codificano per la troponina cardiaca I e T (TNNI3, TNNT2), la catena alfa-tropomiosina (TPM1) e la catena leggera (3) della miosina (MYL3).

È stato dimostrato che i pazienti con mutazioni a carico delle proteine sarcomeriche manifestano la malattia in età più precoce e hanno una più alta incidenza di storia familiare di HCM e morte cardiaca improvvisa. Inoltre tendono a manifestare un'ipertrofia più severa, disfunzione microvascolare e fibrosi miocardica che funge da substrato comportando l'insorgenza di aritmie ventricolari maligne.

Nella restante percentuale dei pazienti con segni di ipertrofia ventricolare sinistra, la valutazione multidisciplinare e l'identificazione di "red flags" sono indispensabili per la diagnosi differenziale con patologie simili fenotipicamente alla HCM, quali quelle infiltrative come l'amiloidosi e metaboliche come la Malattia di Fabry.

Queste ultime rientrano nella Classificazione delle Cardiomiopatie a fenotipo restrittivo (RCM) con funzione globale di

pompa conservata, in cui si ha un irrigidimento delle pareti cardiache con una disfunzione diastolica di terzo grado.

Le cause possono essere sia genetiche che non.

L'amiloidosi, ad esempio, è causata da mutazione TTR (gene che codifica per una proteina, la Transtiretina) e wild type.

La malattia di Fabry, malattia da accumulo lisosomiale, è causata da deficit dell'enzima α-galattosidasi e trasmessa con modalità X-linked.

Altre malattie da accumulo sono: la malattia di Gaucher; l'Emocromatosi ereditaria; Malattia di accumulo da glicogeno; la Mucopolisaccoridosi di tipo I (sindrome di Hurler); la Mucopolissacaridosi di tipo II (sindrome di Hunter); la Malattia di Niemann-Pick.

Nel 2013 La Prof.ssa Arbustini pubblicò un lavoro sulla nuova Classificazione delle Cardiomiopatie (8, 9), ispirandosi al sistema TNM dei tumori, conosciuta con l'acronimo MOGES, che ad oggi viene utilizzata nell'iter diagnostico e clinico quando si ha sospetto di tali patologie.

Questa nosologia descrive una cardiomiopatia attraverso cinque attributi:

(M): il fenotipo morfo-funzionale, vale a dire il tipo di cardiomiopatia ipertrofica (H), restrittiva (R), dilatativa (D) o

aritmogena (A) o non compatta (NC); (M) consente anche di descrivere: fenotipi precoci o borderline (Early = E); fenotipi overlapping più complessi, come ad esempio H+R, oppure D+A, oppure H+D, o H+NC, ecc.; le *red flags* cliniche che caratterizzano i diversi tipi di cardiomiopatie causate da difetti di geni diversi: per esempio il blocco AVB, l'intervallo PR breve, il WPW, ecc. e i portatori di mutazioni patologiche ma ancora fenotipicamente sani come con M(0), dove 0 indica l'assenza di un fenotipo clinico. Questa elasticità descrittiva favorisce la creazione di sottogruppi di cardiomiopatie omogenee per fenotipo, utili dopo l'analisi dei dati relativi agli altri descrittori.

(O): organi che in ogni paziente sono coinvolti ("*organ involvement*"), insieme ai tessuti, dalla malattia. È sempre più evidente che l'eterogeneità clinica delle cardiomiopatie è tale anche perché il cuore è spesso coinvolto (e determinante per la prognosi) in numerose patologie multi-organo, dalle neuromiopatie a sindromi ancora più complesse. Il descrittore (O) quindi consente di elencare gli organi/tessuti coinvolti, usando la lettera iniziale in lingua inglese, per es. M per *skeletal Muscle*, L per *Liver*, K per *Kidney*, ecc. Il coinvolgimento cardiaco deve essere specificato quando presente ma deve essere omesso quando si tratti di descrivere portatori ancora sani di mutazione patologica (spesso bambini) o

quando la malattia presenti tratti fenotipici differenti nei diversi membri della famiglia, tipicamente le sindromi a coinvolgimento multiorgano/apparato come le malattie mitocondriali o la malattia di Anderson Fabry, o le distrofinopatie. L'importanza di questo descrittore (O) è direttamente correlata alla possibilità di evidenziare gli eventuali marcatori clinici extracardiaci che, di per sé, possono orientare una diagnosi specifica e far rivolgere quindi al test genetico una domanda specifica. Per esempio (O) H+M+A+E+N descrive una sindrome in cui sono coinvolti il cuore (H), il cui fenotipo è già stato descritto in (M), il muscolo scheletrico (M) (sia perché sono stati registrati valori elevati di sCPK sia perché vi sono segni clinici di miopatia), l'apparato uditivo (*Auditory system*, A) perché è presente ipoacusia, (E) perché è presente una patologia oculare (*Eye*, E), ed (N) perché è presente coinvolgimento del sistema nervoso (*Nervous System*, N), che può essere ulteriormente esplicitato in periferico o centrale (*Peripheral* P, *Central* C) o definito come *mental retardation* o *cognitive impairment* (MR or CI). La diagnosi clinica è già chiara sulla base dei descrittori (M) ed (O), in quanto molto verosimilmente si tratta di una cardiomiopatia in contesto di malattia mitocondriale.

Una possibile smentita a questa ipotesi potrebbe derivare dal descrittore (G) (Malattia Genetica/Familiare) qualora questo

indicasse una trasmissione autosomica dominante, nel qual caso l'ipotesi clinica diagnostica dovrebbe essere riconsiderata valutando la possibilità che si tratti di una malattia di Danon ma in cui, di fatto, il coinvolgimento oculare ed auditivo non è la regola; la regola nel paziente Danon di genere maschile è cuore + muscolo scheletrico + coinvolgimento nervoso con ritardo mentale, ed anche in questo caso è necessario il descrittore (G), che dovrebbe essere X linked.

(G): malattia genetica/familiare (o non familiare). Questa abbreviazione consente di descrivere se si tratta di una malattia eredo-familiare e se lo è, quale sia la sua modalità di trasmissione: AD per autosomica dominante, AR per autosomica recessiva, XL per X-linked, ovvero causata da difetto di un gene che mappa sul cromosoma X, cui si può aggiungere se XL recessiva (XLR) o dominante (XLD), ed infine un'ereditarietà matrilineare (M), ovvero legata a difetti di geni codificati dal DNA mitocondriale, che è di esclusiva origine materna. A questo punto della compilazione di MOGE(S) disponiamo già di più elementi clinici prima ancora di rivolgerci al laboratorio di genetica molecolare: abbiamo definito il fenotipo della cardiomiopatia, l'eventuale coinvolgimento di organi oltre al cuore stesso, e la modalità di trasmissione. Non tutte le cardiomiopatie tuttavia hanno una causa genetica: il descrittore G(0) indica che non è presente alcuna evidenza di malattia eredo-

familiare; questo descrittore deve essere utilizzato quando sia stato completato lo screening clinico (visita, ECG ed ecocardiogramma) dei parenti almeno di primo grado; infatti, uno dei vantaggi dello screening clinico è l'identificazione di membri della famiglia affetti ma asintomatici e non a conoscenza della propria malattia, oppure di membri della famiglia che presentano alterazioni strumentali predittive di cardiomiopatia ma non incontrano i criteri clinici diagnostici completi, così come codificati dalla linee guida correnti, per esempio:

- per la DCM: un aumento persistente del DTD in assenza di significativa disfunzione ventricolare sinistra, o viceversa una FE or FS borderline in presenza di un ventricolo sinistro senza significativa dilatazione;
- per HCM: uno spessore ventricolare massimo al di sotto del valore cut-off stabilito dalle linee guida (quindi <13 mm) per HCM, oppure un ECG indicativo di ipertrofia ventricolare sinistra in assenza di evidente ispessimento parietale;
- per RCM: una disfunzione diastolica ed iniziale dilatazione atriale;
- per ARVC: una dilatazione del ventricolo destro, globale o segmentaria, in assenza di altri parametri diagnostici che consentano di raggiungere i criteri indicati dalla TF per la

diagnosi di ARVC, oppure T negative in V1-V3 in adulti, a volte reperto incidentale non necessariamente associato ad altri tratti fenotipici.

Il concetto di *Early* (o *borderline*) *cardiomyopathy* non è codificato da linee guida anche se oggi è sempre più rilevante alla luce degli screening clinici nelle famiglie.

Una diagnosi di cardiomiopatia in fase precoce può essere determinante per la prevenzione di eventi aritmici potenzialmente fatali, per avviare una terapia medica (anche in assenza di trials clinici che ne rendano l'indicazione *Evidence-Based*).

Qualora lo screening clinico risulti negativo e la ricostruzione del "pedigree" della famiglia, anche fruendo della documentazione clinica (se disponibile) dei parenti non arrivi all'osservazione clinica, la cardiomiopatia può essere definita "sporadica" (0) relativamente al momento in cui questa viene osservata. Una forma sporadica sul piano clinico può essere di origine extracardiaca (e questo sarà specificato nel descrittore - (E) per *Etiology* - e quindi su base infiammatoria (per esempio una miocardite o una forma post-miocarditica infiammatoria cronica, o autoimmune/immuno-mediata, tossica endogena o da farmaci, ecc.). Alternativamente, una forma sporadica può essere una malattia genetica che si presenta con una mutazione de novo nel/nella probando/a affetto/ a. Quindi, in

generale, per le cardiomiopatie anche clinicamente sporadiche, l'ipotesi della causa genetica è la prima da accertare o escludere. Anche una trasmissione autosomica recessiva può trarre in inganno e suggerire una forma sporadica, specie nel contesto di famiglie di piccole dimensioni. In questi casi, spesso aiuta la verifica della consanguineità genitoriale o la provenienza dei genitori da piccoli isolati geografici.

(E): eziologia, genetica e non. (E) è un descrittore fondamentale sia che la causa della cardiomiopatia venga accertata o meno. Nelle cardiomiopatie ha carattere eredo-familiare l'orientamento clinico, derivato dal percorso descritto in (M), (O), e (G), può essere di aiuto nell'indicazione specifica al test genetico. (E) consente quindi di definire se il test genetico (G) sia stato espletato e sia risultato positivo, negativo, incerto, non informativo, ecc. Nel caso in cui sia risultato positivo, è possibile aggiungere il termine abbreviato del gene malattia e quindi la mutazione identificata. Un sistema automatico di colore consente di mostrare subito se si tratta di una mutazione patologica, oppure di una variante genica a significato incerto, oppure di un polimorfismo, magari a significato funzionale ignoto o incerto.

Il sistema colore è ormai universalmente adottato in tutti i DB genetici pubblici: il rosso definisce mutazioni patologiche, il giallo,

varianti geniche di significato incerto, il verde gli SNP. Il descrittore (E) consente anche l'inserimento di più geni e più mutazioni; infatti, con le nuove tecnologie di sequenziamento del DNA (le cosiddette *Next Generation Sequencing tech-nologies*, NGS, sia di seconda generazione, attualmente in uso, che di terza generazione, prossimamente disponibili), il numero di mutazioni/varianti per paziente è destinato ad aumentare. Questo obbligherà sempre alla verifica o all'effetto funzionale delle mutazioni identificate (poco probabile perché la *rate detection* delle mutazioni è più veloce di qualsiasi sistema di espressione di mutazione in vitro o in modelli animali) o mediante la segregazione del fenotipo con il genotipo nella famiglia. Quest'ultima necessità imporrà un ulteriore sforzo clinico al cardiologo, che dovrà comunque estendere la sua attenzione al maggior numero possibile di membri di ciascuna famiglia.

Sempre grazie ad (E) è possibile descrivere eziologie:

- Virali (V) ed il virus o isolato o identificato con tecniche quantitative molecolari (per es. Coxsackie B3 virus [CB3], o il citomegalovirus umano human [HCMV], o il virus di Epstein-Barr [EBV]) utilizzando la tassonomia codificata dall'*International Committee on Taxonomy of Viruses*

(http://www.ictvonline.org/index.asp) [per es. (EV-HCMV), (EV-CB3) or (EV-EBV)].

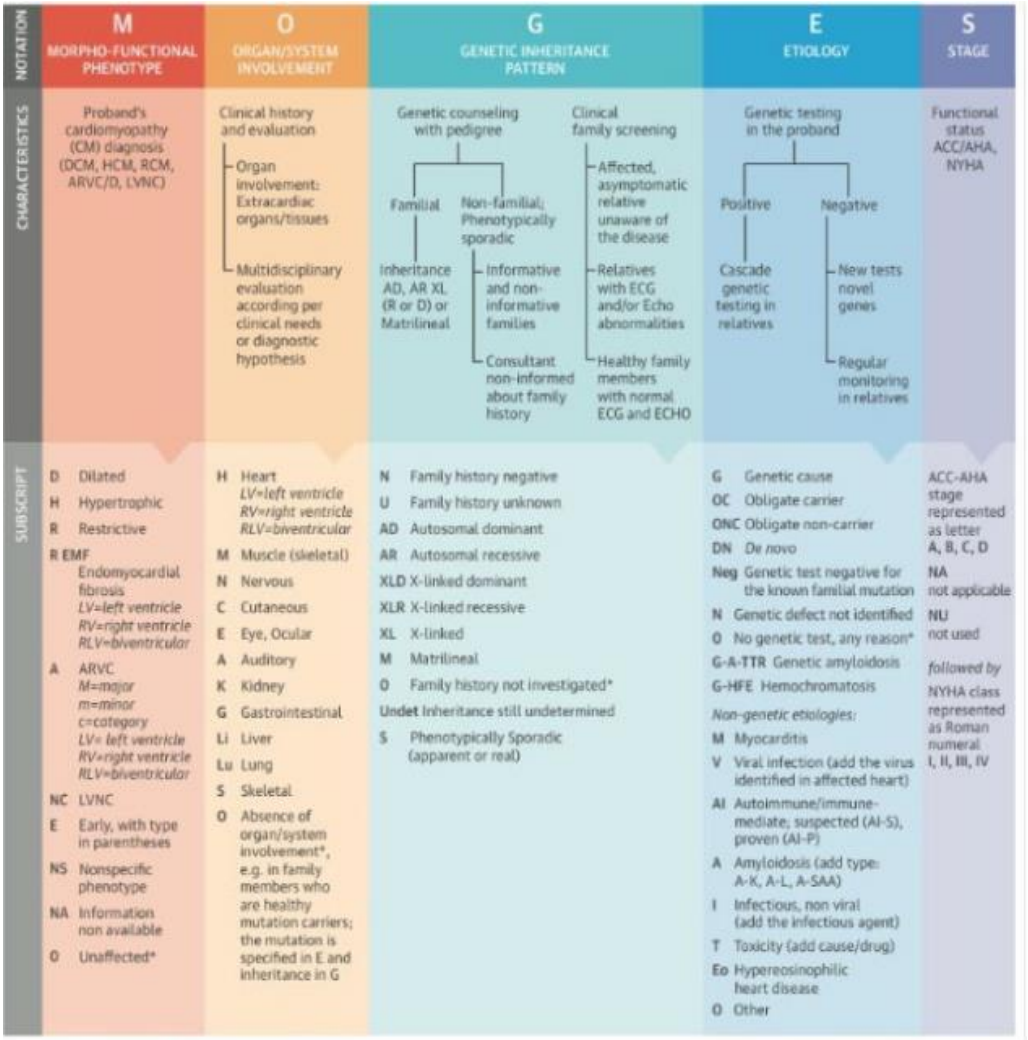
- Infettive non virale (EI), aggiungendo la descrizione dell'agente infettivo utilizzando la *Human Infectious Disease Taxonomy*.
- Miocarditi (EM) quando sia provato che la miocardite è la causa della cardiomiopatia; a questa può essere aggiunta la causa, per esempio, virale (EMV- CB3), la sarcoidosis (EM-Sarcoid) o la miocardite a cellule giganti (EM-Giant cell).
- Autoimmune, sia sospetta che documentata (proven) (EAI-S) o (EAI-P).
- Amiloidotica non ereditaria con relative caratterizzazioni kappa (EA-K), lambda (EA-L), o serum amyloid A protein (EA-SAA).
- Tossica, come nel feocromocitoma (ET-Pheo), o da farmaci (ET-Chloroquine). Quando poi un feocromocitoma sia nel contesto di sindromi come VHL, o MEN2A/2B o NF1, queste possono essere aggiunte nella descrizione stessa (per es. ET-Pheo-VHL).
- Sindrome ipereosinofilica, con endomiocardite; a questa descrizione di base può essere aggiunta la causa, sia idiopatica, ove non si trovino spiegazioni o fattori causali, che parte di una sindrome mieloproliferativa associata a riarrangiamenti cromosomici (per es. PDGFR□□o PDGFR□□gene) che generino proteine di fusione alla base della sensibilità a farmaci

specifici (per es. un gene di fusione che codifichi una tirosin chinasi PDGFR costitutivamente attiva).

- Ogni altra eziologia può essere descritta sfruttando i nomenclatori internazionali già disponibili.

Più eziologie sono infine possibili: in un paziente portatore di mutazione patologica che causi una cardiomiopatia non è obbligatoriamente esclusa la possibilità di una concausa acquisita, che potrà essere aggiunta a quella genetica.

(S): stage o stato funzionale in cui possono essere descritti lo stage ACC-AHA e la classe NHYA. Il descrittore (S) è opzionale in quanto consente di inserire lo stage ACC/AHA e la classe funzionale NYHA. Si tratta di informazioni dinamiche che possono facilitare la sintesi dello stato clinico del paziente.



The MOGE(S) Classification for a Phenotype-Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed by the World Heart Federation.

2. DIAGNOSI DELLE CARDIOMIOPATIE

La diagnosi delle cardiomiopatie negli ultimi decenni (11) ha incominciato a tener conto, nella pratica clinica, oltre che delle basi descrittive fenotipiche anche di quelle di genetica molecolare e c'è stato un incremento delle conoscenze delle cardiomiopatie a carattere eredo-familiare. Ciò ha indotto all'implementazione di programmi di screening clinico delle famiglie e all'identificazione di centinaia di geni-malattia e geni-candidati. In base alle odierne conoscenze le cardiomiopatie sono sempre meno di origine sconosciuta e sempre più caratterizzabili sia sulla base delle cause genetiche (forme familiari) che di quelle non genetiche (cardiomiopatie sporadiche post-virali, autoimmuni-immuno-mediate, da tossicità legata a cause endogene o esogene come farmaci, agenti tossici, ecc)

La stragrande maggioranza delle cardiomiopatie ha, di fatto, basi eredofamiliari già facilmente accertabili con gli strumenti di uso quotidiano del cardiologo (visita, ECG ed ecocardiogramma). La cardiomiopatia familiare è diagnosticabile quando due o più membri della stessa famiglia presentino lo stesso fenotipo. La definizione, apparentemente intuitiva ma riconosciuta a livello di società scientifica (1), autorizza lo screening clinico non invasivo dei parenti dei probandi. Questo anche alla luce del crescente riconoscimento di

cardiomiopatie “diagnosticabili in fase precoce”, quando cioè non sono ancora presenti tutti i criteri per la diagnosi ma sono confermati reperti strumentali di morfologia e funzione già predittivi di malattia in membri asintomatici all’interno delle famiglie (12, 13).

2.1 Elettrocardiogramma

L’elettrocardiogramma è il primo esame che indica la possibile presenza di patologia miocardica.

L’interpretazione dell’ECG in un paziente con diagnosticata o sospetta cardiomiopatia è guidata da alcuni principi generali:

- Un anormale elettrocardiogramma potrebbe essere la sola manifestazione fenotipica di una disfunzione del muscolo cardiaco
- L’elettrocardiogramma dovrebbe sempre essere interpretato nel contesto delle informazioni derivanti dall’Ecocardiografia e dalla Risonanza magnetica cardiaca (RMN)
- Un certo numero di segni elettrocardiografici può, in associazione con altri segni clinici specifici, indicare la diagnosi sospetta.

Ci sono anomalie elettrocardiografiche che indicano specifiche diagnosi, suddivise in base al principale fenotipo cardiaco.

I blocchi atrio-ventricolari dovuti alla malattia del nodo AV o al sistema di conduzione His-Purkinjie sono comuni a molte patologie genetiche che interessano il miocardio, incluse le laminopatie (14, 15), le malattie mitocondriali (16, 17) e le patologie infiltrative (18, 19). La presenza del BAV è indicativa nelle tre principali cardiomiopatie (HCM, DCM, RCM). In pazienti con fenotipo moderatamente dilatato, il BAV può essere anche il risultato di una infiammazione acuta/subacuta, come nella malattia di Lyme, nelle miocarditi a cellule giganti e nella sarcoidosi (20, 21).

La Pre-eccitazione Ventricolare è un comune segno di malattia da accumulo (malattia di Pompe, malattia di Danon) (22, 23, 24, 25) e di malattie mitocondriali (Melas, Merf) (26, 27). Quindi, l'età alla diagnosi, il pattern ereditario, il tipo di cardiomiopatia e la presenza di segni come la miopatia muscolo-scheletrica sono segni chiave quando si ha un forte sospetto diagnostico.

Le anomalie della ripolarizzazione ventricolare sono molto comuni ma non specifiche per le malattie del muscolo cardiaco. Ma nel contesto delle Cardiomiopatie esse sono espressione o il risultato di una alterazione specifica del processo che sta alla base; per esempio nella displasia aritmogena del ventricolo destro (ARVC) vi è la presenza di onde T negative (28). Nell'ARVC con interessamento

biventricolare, le onde T negative possono trovarsi anche nelle derivazioni inferiori e/o laterali.

Un altro comune esempio di anomalie della ripolarizzazione è la presenza di onde T profonde nelle derivazioni precordiali e/o inferolaterali in pazienti con Cardiomiopatia Ipertrofica. Il voltaggio del complesso QRS estremamente largo è un tipico segno di malattie da accumulo come nelle Malattie di Pompe e di Danon, mentre il basso voltaggio potrebbe essere presente, in assenza di altre cause come nel versamento pericardico, nell'amiloidosi cardiaca che potrebbe essere evidente in alcuni pazienti con progressiva fibrosi miocardica e con aggravamento della disfunzione sistolica. Ma sia nell'amiloidosi che nella cardiomiopatia ipertrofica anche il pattern di pseudo-necrosi può essere osservato con onde Q di necrosi e onde T alte nelle stesse derivazioni.

2.2 Ecocardiogramma color doppler

L'ecocardiografia color doppler rimane il primo strumento di imaging per le più importanti forme di patologie del muscolo cardiaco.

Nell’ambito delle cardiomiopatie vi sono importanti “red flags”, come i segni elettrocardiografici, per individuare i sottotipi di cardiomiopatie in base ai rispettivi fenotipi.

I segni ecocardiografici che dovrebbero orientare alle patologie di natura infiltrativa, come l’amiloidosi cardiaca, includono: ipertrofia biventricolare con il coinvolgimento della parete libera del ventricolo destro, aumento dello spessore delle valvole atrio ventricolari, aumento dello spessore del setto interatriale e la presenza di un piccolo versamento pericardico (29, 19).

Nelle HCM si possono osservare i seguenti segni: Ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro, Ipocinesia globale (con o senza dilatazione del ventricolo sinistro), Valvulopatie (prevalentemente stenosi aortica e ingrandimento atriale sinistro).

Nelle DCM si osservano: Dilatazione del ventricolo sinistro + acinesia/discinesia dei segmenti con coronarie esenti da lesioni coronariche non significative, acinesia/discinesia posterolaterale.

Nelle ARVC si osserva la disfunzione del ventricolo sinistro con coinvolgimento anche del destro.

Nelle RCM si osserva interessamento parziale dell’apice del ventricolo sinistro o dell’apice del ventricolo destro.

2.3 Risonanza Magnetica cardiaca

La RMN cardiaca, indagine diagnostica di secondo livello, serve nell'ambito delle cardiomiopatie a caratterizzare il substrato miocardico sulla base della distribuzione del gadolinio nel tessuto miocardico. Essa può fornire informazioni relative alla presenza di: edema miocardico, infiltrazione amiloidotica, sostituzione di tessuto adiposo, deposito di ferro e fibrosi miocardica. Tutto ciò permette di fare diagnosi differenziale tra i diversi tipi di cardiomiopatie.

Nella HCM può esservi deposito di late gadolinium enhancement in sede posterolaterale + ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro, diffuso late gadolinium enhancement in sede subendocardica.

Nella DCM si osserva: late gadolinium enhancement nella parete intermedia con distribuzione a patch; acinesia/discinesia + (LGE) a livello del setto anterobasale o dei muscoli papillari.

Nella ARVC si osserva deposito di tessuto adiposo dentro la parete del ventricolo destro, ma anche in quello sinistro.

Nella RCM si osserva interessamento parziale dell'apice del ventricolo sinistro o coinvolgimento dell'apice del ventricolo destro + LGE a livello endocardico.

Nelle cardiomiopatie il contributo della medicina nucleare è limitato, ad eccezione della sarcoidosi e della amiloidosi TTR.

Nello specifico la PET 18F-FDG ha un'alta sensibilità e risoluzione spaziale nella diagnosi della sarcoidosi cardiaca e in altre condizioni come la Cardiomiopatia dilatativa idiopatica.

La scintigrafia miocardica, invece, con Tc-DPD, è il gold-standard per la diagnosi di TTR amiloidosi (wild tipe o mutata) (30, 31).

2.4 Biopsia Endomiocardica

L'uso della biopsia endomiocardica varia enormemente tra i Centri specializzati e i Cardiologi. Nel contesto delle cardiomiopatie essa rimane il gold standard per la diagnosi di disordini specifici quali l'amiloidosi, la sarcoidosi e le miocarditi. Questa biopsia è il solo mezzo diagnostico per stabilire la diagnosi eziologica delle cardiomiopatie infiammatorie (virali o immunomediate). Il suo ruolo è anche importante nei pazienti con emacromatosi, tuttavia l'esame genetico e la RMN potrebbero essere sufficienti a stabilire la diagnosi.

2.5 Esami Ematochimici

Gli esami di laboratorio nell'ambito delle cardiomiopatie devono essere valutati in specifiche circostanze e in accordo a principali fenotipi ecocardiografici. Nel contesto delle cardiomiopatie dilatative o miocarditi, con familiarità positiva o con storia personale di malattia autoimmune, i test sierologici e gli autoanticorpi cardiaco specifici potrebbero essere considerati nel paziente affetto e nei parenti di primo grado. L'esame del CK rientra invece tra gli esami di primo livello analogamente alla funzione renale, alla proteinuria e alla funzionalità epatica nelle cardiomiopatie dilatative, ipertrofiche e restrittive.

Un aumento del CK in pazienti con cardiomiopatia dilatativa può suggerire la presenza di una distrofinopatia (es. Becker o cardiomiopatia X linked), una laminopatia, o più raramente una malattia del sarcoglicano, una desminopatia o una miopatia miofibrillare. La cardiomiopatia dilatativa X linked è un tipico esempio di cardiomiopatia correlata alla distrofia con fenotipo esclusivamente cardiaco. In questo caso, l'aumento sierico del CK potrebbe essere l'unico indizio diagnostico (32).

Nelle cardiomiopatie a fenotipo restrittivo, come ad esempio nell'amilodosi AL, i test biochimici possono essere usati per rilevare

la produzione anomala di immunoglobuline monoclonali, includendo le catene leggere delle immunoglobuline sieriche, l'immunofissazione sierica e delle urine e l'elettroforesi urinaria.

2.6 Test Genetici

I test genetici oggi consentono diagnosi precise (33, 34, 35): in oltre il 60% dei casi delle cardiomiopatie ipertrofiche/restrittive, in circa il 50% dei casi di cardiomiopatia dilatativa e in oltre il 50% dei casi di cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro.

Nel 2010 una task force di esperti ha proposto tre varianti: la forma classica ventricolare destra (quella per la quale i criteri diagnostici, se pur di difficile applicazione clinica, sono chiaramente codificati), la forma biventricolare e quella prevalentemente sinistra (9). Per queste ultime, la codifica dei criteri diagnostici non è disponibile e, nella pratica clinica, sono proprio queste le forme difficilmente distinguibili da cardiomiopatie dilatative con coinvolgimento del ventricolo destro.

In sintesi, oggi esiste la concreta possibilità di affiancare alla diagnosi fenotipica di cardiomiopatia, anche la sua specifica causa, sia essa di natura genetica o non.

La maggior parte delle malattie genetiche sono causate da mutazioni rare che compromettono la funzione delle singole proteine; l'85% di queste mutazioni si trova nelle regioni codificanti o nei siti di splicing. Negli ultimi tempi è stato visto quanto sia importante l'identificazione di numerose varianti, spesso nuove, a bassa penetranza, e le loro interazioni con modifiche genetiche e ambientali. Questo può portare ancora di più ad evidenze di nuovi fenotipi clinici e alla definizione di sottotipi.

3. DEFINIZIONE DELLE LAMINOPATIE

Le lamine sono proteine di filamenti intermedi capaci di polimerizzare e formare una rete organizzata sottostante la membrana nucleare nella maggior parte delle cellule somatiche differenziate. Le mutazioni del gene LMNA, che codifica per le due principali isoforme di lamine A e C, causano diverse malattie chiamate laminopatie che includono le cardiomiopatie dilatative associate ad una prognosi infausta e ad alto rischio di morte cardiaca improvvisa dovuta a difetti di conduzione e a precoce insorgenza di aritmia ventricolare maligna (36, 37, 38).

L'identificazione di mutazioni del gene LMNA nella pratica clinica è in rapido aumento, cosí come lo screening familiare cardiaco e genetico.

Una delle funzioni della lamina è di provvedere al supporto della struttura del nucleo e di mantenere l'integrità meccanica delle cellule con il linking tra citoscheletro e nucleoscheletro (39). Essa ha anche un complesso ruolo nella funzione del poro nucleare, nell'organizzazione della cromatina, nella replicazione e trascrizione del Dna (40, 41). Più di 450 mutazioni sono state identificate nel gene LMNA e possono causare diverse patologie che coinvolgono: il muscolo striato (cardiomiopatia dilatative e miopatia scheletrica), il

tessuto adiposo (sindrome lipodistrofica) e i nervi periferici (neuropatia Charcot-Marie-Tooth). Le mutazioni più frequenti riportate in letteratura sono di tipo missenso 72%, inserzioni/delezioni in-frame 9%, inserzioni/delezioni out-frame 9%; siti di splicing 7% e mutazioni non senso 5%. Le relazioni tra genotipo e fenotipo ad oggi non sono completamente chiare.

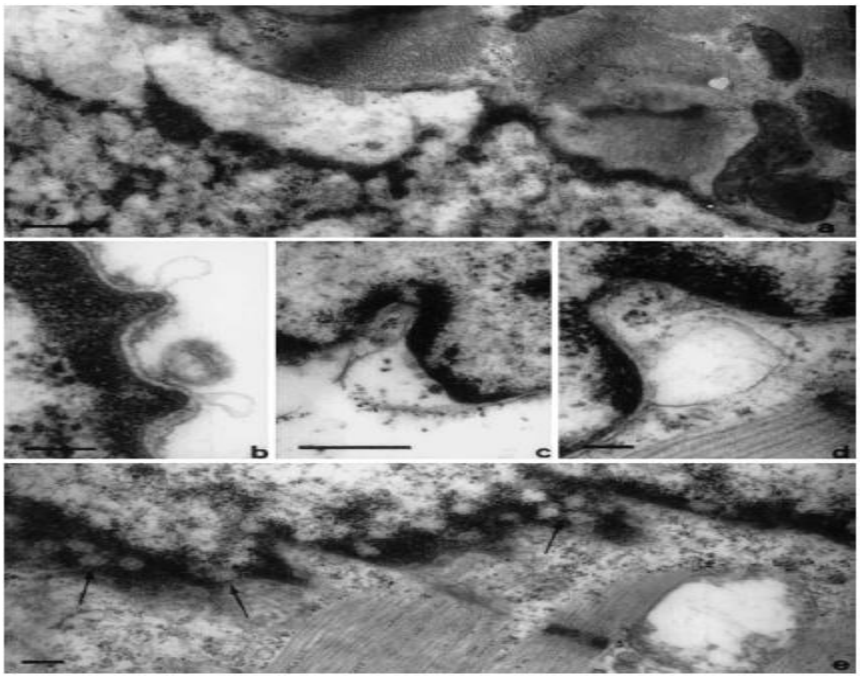
Alcuni predittori clinici di mutazioni del gene LMNA, che sono stati evidenziati nei pazienti con cardiomiopatia dilatativa, sono: l'aritmia sopraventricolare, i difetti di conduzione e moderata dilatazione del ventricolo sinistro, indipendentemente dalla storia familiare.

La diagnosi in tali pazienti dovrebbe essere eseguita con regolari esami cardiaci quali: l'elettrocardiogramma, l'ecocardiogramma, l'holter Ecg e il test sotto sforzo. I test genetici è consigliabile eseguirli nei parenti di primo grado con familiarità.

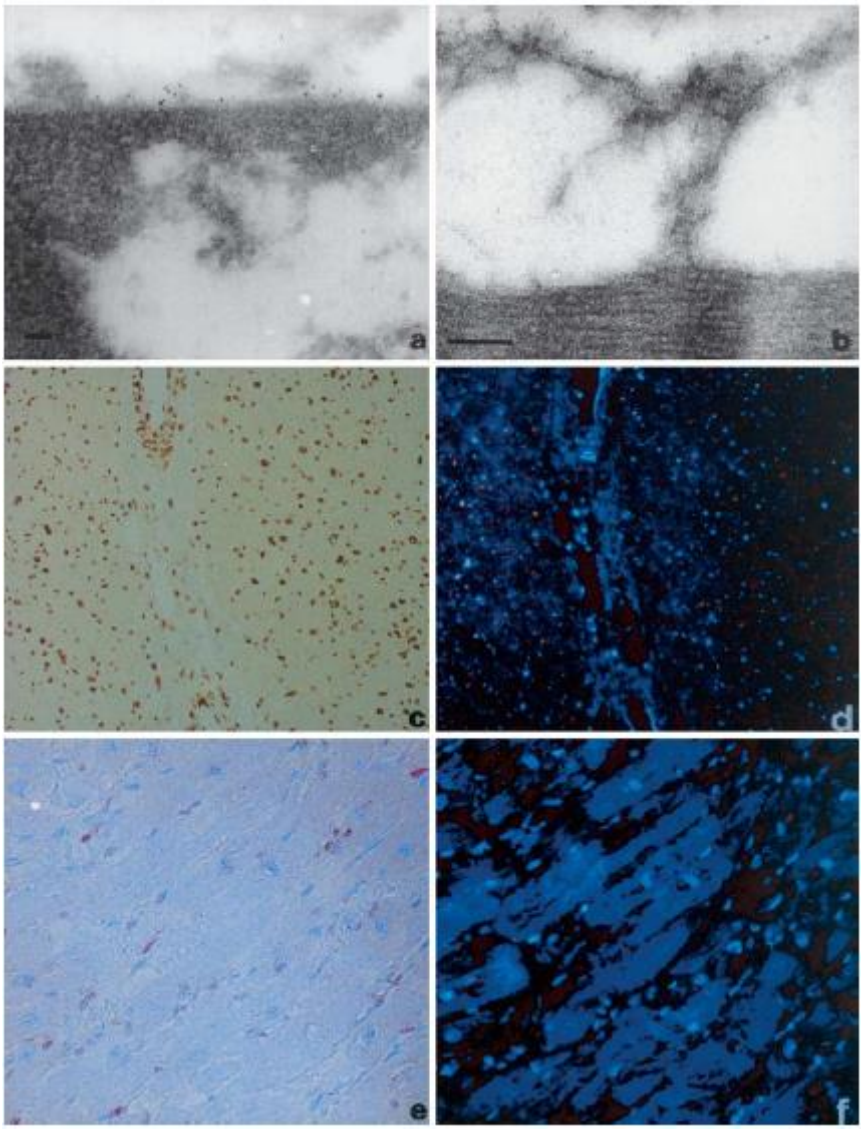
L'impianto di defibrillatore sottocutaneo può essere proposto in presenza di due criteri su 4: LVEF < 45%, TVNS, sesso maschile, mutazioni LMNA non-missenso. Tuttavia è possibile l'impianto anche in presenza di difetti di conduzione che richiedono impianto di PM (42).

Accanto alla clinica e alle metodiche di imaging è stato visto come la microscopia elettronica giochi un ruolo importante nel

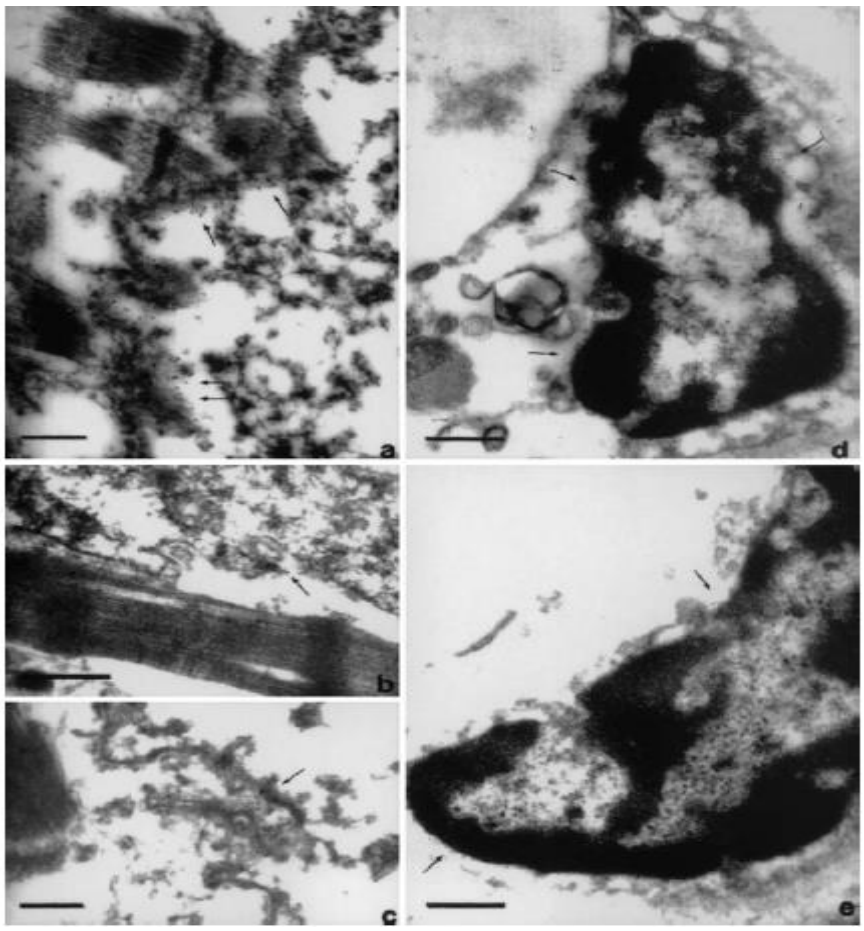
sospetto del difetto del gene LMNA (43, 44), mostrando il danno nucleare e la conferma della perdita della lamina A/C nella lamina nucleare del cardiomiocita.



Microscopia elettronica convenzionale. Nuclei dei cardiomiociti di pazienti con cardiomiopatia dilatativa causata da mutazioni del gene LMNA.



Microscopia immuno-elettronica. Nuclei dei cardiomiociti di controllo senza mutazione LMNA con reazione immunoistochimica con anticorpi anti-lamina A/C.



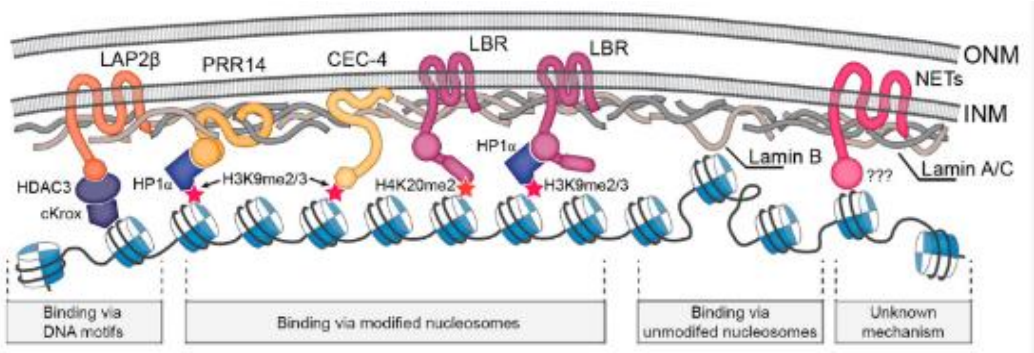
Immunocolorazione con anticorpi anti-lamina A/C. Cardiomiociti di pazienti di controllo senza mutazione del gene LMNA, post fissazione in resina bianca londinese.

La perdita selettiva della lamina A/C sulla membrana nucleare del cardiomiocita e la preservazione dell'espressione proteica nei nuclei non miocitari supportano l'ipotesi che le cellule che non vanno in contro a mitosi sono quelle in cui c'è un danno proteico nei soggetti con mutazione.

La degradazione della lamina A/C e la mancanza della sostituzione della proteina che è stata degradata potrebbe costituire la

base molecolare della perdita della lamina osservata nei nuclei dei miociti che non vanno incontro a mitosi. Nelle cellule mitotiche, come i fibroblasti e le cellule endoteliali, i livelli di mRNA LMNA rimangono alti probabilmente per garantire una sufficiente quantità proteica. Un'altra ipotesi per i pazienti con X linked EDMD è che, in presenza della proteina mutata, la lamina nucleare diventa più fragile e meno efficace come struttura, in particolare nei miociti.

In conclusione, la microscopia immuno-elettronica per l'espressione della lamina A/C nei pazienti in cui è stata diagnosticata Cardiomiopatia dilatativa e blocco atrioventricolare causato da mutazione del gene LMNA conferma che tutti i tipi di difetti genetici sono associati a perdita dell'espressione proteica nelle strutture nucleari che non vanno incontro a mitosi.



Gene della lamina

4 DIFETTI DI CONDUZIONE E ARITMIE

4.1 Fenotipi in base al difetto di conduzione e aritmie

Il difetto di conduzione (CD) e le aritmie sono una delle caratteristiche cliniche ricorrenti ma non obbligatorie nei pazienti con cardiolaminopatie che in genere sviluppano cardiomiopatia dilatativa (DCM).

Sono sostanzialmente distinguibili tre gruppi di fenotipi:

1. pazienti in cui il difetto di conduzione precede l'insorgenza della cardiomiopatia dilatativa (45, 46);
2. pazienti in cui il difetto di conduzione viene diagnosticato contemporaneamente alla diagnosi di cardiomiopatia dilatativa (DCM) (46, 47);
3. pazienti in cui la prima manifestazione clinica è la DCM o fibrillazione atriale, in assenza di evidenza di difetti di conduzione (48, 49).

L'impatto clinico del CD è rilevante per il processo decisionale clinico, sia per l'impianto di PM che per i trattamenti con beta-bloccanti. Inoltre, il potenziale valore predittivo del CD sul rischio aritmogeno non è ancora chiaro (15, 50).

5. SCOPO DELLO STUDIO

Il progetto si propone l'obiettivo di valutare la prevalenza, la storia naturale, l'evoluzione e l'associazione di disturbi aritmici con altri tratti fenotipici della malattia e del rischio aritmico nei pazienti portatori di mutazioni patologiche nel gene LMNA e in altri geni implicati nell'insorgenza della cardiolaminopatia.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Pazienti arruolati

Da Novembre 2019 ad Aprile 2022 sono stati reclutati 100 pazienti, di età compresa tra i 55±10 anni, che hanno avuto accesso presso l'Unità Operativa di Cardiologia sia in degenza che in ambulatorio delle cardiomiopatie. Ogni paziente reclutato si caratterizzava per presenza di severa disfunzione e dilatazione ventricolare sinistra e quadro coronarografico con coronarie esenti da lesioni significative.

Ad ognuno dei seguenti pazienti è stata praticata terapia medica massimale ed è stata data indicazione a follow up periodico.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ECG a 12 derivazioni al fine di valutare specificatamente disturbi di conduzione AV ed aritmie sopra e ventricolari. A tal fine sono state analizzate anche registrazioni Holter ECG eseguiti negli ultimi 6 mesi e/o è stata programmata registrazione Holter ECG in pazienti con riferito cardiopalmo e/o sincope.

In tutti i pazienti arruolati l'Ecocardiogramma color-doppler è stato utilizzato per determinare le dimensioni e la funzione ventricolare sinistra; in particolare è stata valutata la FE.

In tutti i pazienti è stato valutato il CPK. Tutti i pazienti sono

stati seguiti clinicamente per un follow-up di 18 mesi. La presenza di TVNS, bi e trigeminismo ventricolare sono stati considerati eventi aritmici ventricolari di rilievo clinico.

Durante il FU ogni paziente è stato sottoposto a visita genetica ed analisi genetica mediante NGS.

6.2 Analisi genetiche

Tutti i pazienti, dopo l'acquisizione del consenso informato, sono stati sottoposti ad esame genetico mediante campione di sangue periferico dal quale è stato estratto il DNA.

È stato utilizzato il pannello delle Cardiomiopatie.

Sono state analizzate le regioni codificanti e le giunzioni esone-introne (±5 bp) dei geni: ACTC1 (NM_005159.4), ACTN2 (NM_001103), ALPK3 (NM_020778.4), BAG3 (NM_004281), CSRP3 (NM_003476), DES (NM_001927.3), DSC2 (NM _024422), DSG2

(NM_001943), DSP (NM_004415), FHL1 (NM_001449), FHOD3 (NM_025135.5), FLNC (NM_001468), GLA (NM_000169), JUP (NM_002230), KLHL24 (NM_017644.3), LAMP2 (NM_013995), LMNA (NM_170707), MYBC3 (NM_000256), MYH7 (NM_000257), MYL2 (NM_000432), MYL3 (NM_000258), PKP2 (NM_004572), PLN (NM_002667), PRKAG2 (NM_0162039), RBM20 (NM_001134363), TAZ (NM_000116), TCAP(NM_003673), TNNC1 NM_003280), TNNI3(NM_000363), TNNT2(NM_000364), TPM1(NM_001018005), TTR (NM_000371), TRIM63 (NM_032588.3), SCN5A (NM_198056), VCL (NM_014000). Ricerca di varianti troncanti nel gene TTN (NM_00125850.1).

La tecnica utilizzata è stata il sequenziamento (Next Generation Sequencing, NGS) eseguito con kit Twist Custom Panel (clinical exome- Twist Bioscience) su piattaforma NovaSeq6000 (Illumina).

Il test ha una sensibilità e specificità analitica >99%. La copertura media delle regioni sequenziate è: 230.96X. Per l'interpretazione dei risultati sono state considerate soltanto le regioni con una profondità di lettura minima di 30X.

6.3 Limiti del test

Il test può non identificare duplicazioni e delezioni del singolo esone, multiesoniche, dell'intero gene, riarrangiamenti genomici complessi e mutazioni da espansione di sequenze ripetute (mutazioni dinamiche), che posso essere caratterizzate con altre tecniche.

La metodica presenta una risoluzione limitata nell'identificazione dei mosaicismi. A causa di eventuali regioni ricche in GC e di sequenze ripetute, l'allineamento con la sequenza di riferimento potrebbe non essere attendibile. È possibile che una variante non sia identificabile a causa della mancata cattura della regione genomica in cui è localizzata o del mancato variant calling e variant annotation da parte dei software utilizzati.

La presenza di eventuali regioni cromosomiche omologhe con elevata similarità di sequenza (pseudogeni) diminuisce la sensibilità e la specificità analitica del test. Inoltre, è possibile che una variante possa non essere riconosciuta come causativa del fenotipo clinico per l'incompleta conoscenza scientifica.

L'interpretazione delle varianti è stata eseguita sulla base delle indicazioni e dei dati clinici forniti al momento della richiesta del test.

6.4 Analisi bioinformatica

L'analisi bioinformatica è stata effettuata attraverso i sistemi BWA Aligner o DRAGEN Germline Pipeline e le sequenze sono state allineate al genoma umano di riferimento GRCh37. Per il filtraggio e la prioritizzazione delle varianti è stato utilizzato il software Geneyx Analysis (Knowledge-Driven NGS Analysis tool powered by the GeneCards Suite). Per la selezione di geni associati all'indicazione clinica sono stati consultati i database HPO, OMIM, e/o GeneReviews. Sono state considerate esclusivamente le varianti nei geni selezionati, con profondità di lettura e parametri di qualità adeguati (51). L'identificazione di una variante con VAF (variant Allele Frequency) <35% può essere indicativa di uno sbilanciamento allelico causato da un evento di origine somatica (mosaicismo).

Per il filtraggio delle varianti la MAF (Minor Allele Frequency) considerata viene corretta in base alla frequenza della patologia. Di prassi, nei fenotipi sindromici le varianti con MAF >0,2% sono escluse dall'indagine. Tale cut-off è stato calcolato tenendo conto della prevalenza di una malattia rara, stabilita dal Regolamento sui prodotti Medicinale orfani del 1999 dell'Unione Europea, secondo cui è da considerarsi rara una malattia che interessa non più di 1 individuo ogni 2000 nella popolazione europea [Regulation (EC)N.141/2000].

Le varianti sono state annotate secondo la nomenclatura HGVS e classificate secondo le linee guida standard ACMG (52) come benigne (classe 1), probabilmente benigne (classe 2), di incerto significato VUS (classe 3), probabilmente patogenetiche (classe 4), patogenetiche (classe 5).

Per l'interpretazione delle varianti viene fatto riferimento alla letteratura scientifica, ai database ClinVar, HGMD, LVOD e ai database gene e/o malattia specifici, qualora disponibili; per la frequenza allelica viene fatto riferimento al database di popolazione gnomAD v2.1.1 e al database interno di laboratorio. La nomenclatura e la classificazione delle varianti, in modo particolare quelle di significato incerto, potrebbero cambiare sulla base di aggiornamenti della sequenza di riferimento e di nuove evidenze scientifiche. Non sono state segnalate tutte quelle varianti clinicamente e biologicamente non rilevanti in base alle conoscenze attuali, varianti classificate come benigne e/o probabilmente benigne, varianti sinonime ,varianti introniche, varianti nelle regioni UTR o situate nei siti non canonici di splicing. Di norma non sono riportate le varianti a segregazione parentale di classe 3, riscontrate in geni associati a condizioni dominanti, nonostante non si possa escludere la presenza di un difetto di penetranza o di espressività variabile. Nelle analisi in trio i dati genomici dei genitori vengono utilizzati esclusivamente per la

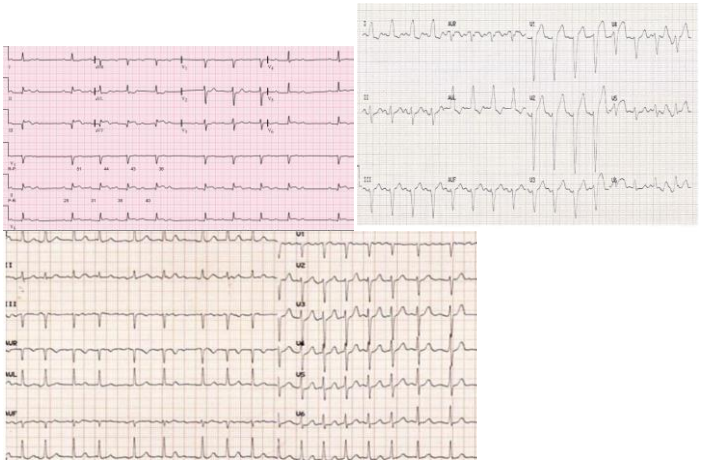
valutazione della segregazione delle varianti presenti sul probando. Relativamente ai risultati secondari vengono considerate solo le varianti patogenetiche e/o probabilmente patogenetiche in base alle raccomandazioni correnti ACMG (53).. Il test di conferma, quando necessario, viene effettuato su seconda estrazione di Dna, se disponibile il campione di sangue periferico. Lo scopo del test è di identificare una possibile causa della condizione clinica del paziente e non di segnalare eventuali varianti in eterozigosi associate a patologie a trasmissione autosomica recessiva, che esulano dall'indicazione clinica. La non identificazione di varianti patogenetiche non esclude la possibilità che l'indicazione clinica, per la quale è stato richiesto il test, abbia basi genetiche. Il laboratorio è certificato secondo la norma di riferimento UNI EN ISO 9001.2015 e partecipa ai controlli esterni di qualità GenQA (Genomics Quality Assessment) per lo schema NGS.

7. RISULTATI

I pazienti sono stati valutati al primo follow-up entro 3 mesi dalla prima valutazione cardiologica, per essere seguiti presso l'ambulatorio di malattie rare della Cardiologia del Policlinico di Messina per eseguire visita specialistica genetica ed analisi genetica.

Su 100 pazienti 20 sono andati incontro a morte cardiaca improvvisa, 47 pazienti a causa della pandemia da Covid19, non sono voluta sottoporre a controlli diagnostici mentre la restante parte dei pazienti è stata sottoposta a controlli diagnostico-strumentali e test molecolare. Pertanto la popolazione analizzata si caratterizzava in 33 pazienti.

Questi pazienti sono stati sottoposti ad analisi delle registrazioni Holter che ha evidenziato difetti di conduzione (BAV I-II grado) in 2/33 pazienti, minori difetti di conduzione (BBSn) in 8/33 pazienti, fibrillazione atriale in 5/33 pazienti e nei 18/33 pazienti restanti numerosi episodi di BEV, BESV e TVNS .



Gli esami di laboratorio hanno evidenziato un aumento del CPK (>200 U/L) in solo 8 pazienti (6 uomini e 2 donne) su 33 (24,2%).

In pazienti con cardiomiopatia dilatativa, l'aumento di tale enzima è stato associato a coinvolgimento muscolare e a difetti del gene LMNA.

Al follow up clinico strumentale, 16 pazienti, nonostante ottimizzazione di terapia medica, all'ecocardiogramma presentavano ancora funzione globale di pompa depressa (FE <40%) ed eventi aritmici ventricolari all'Holter ECG Dinamico (TVNS, bi e trigeminismo ventricolare). Per tale motivo sono stati sottoposti ad impianto di ICD in prevenzione primaria e, alcuni di questi, successivamente ad upgrade (CRTD).

Valutazione clinica genetica ed analisi genetica

I genetisti hanno eseguito la consulenza genetica e un successivo prelievo da sangue periferico, per effettuare un pannello NGS cardiomiopatie dilatative in convenzione con l'Ospedale Bambino Gesù di Roma.

Ne è risultato che:

- 19 pazienti (16 uomini e 3 donne) non presentavano all'anamnesi familiare eventi di morte cardiaca improvvisa ma riferivano la presenza, in alcuni familiari di primo grado, di casi di cardiopatie ndd.
- 8 pazienti (5 uomini e 3 donne) riferivano una forte familiarità per cardiomiopatia dilatativa e familiarità positiva per mutazione del gene **LMNA** in eterozigosi (**c.949G>A p.Glu317Lys**) in un parente di primo grado che era stato ricoverato presso l'Utic della cardiologia del Policlinico di Messina, dove era stato sottoposto ad impianto di device per funzione di pompa severamente depressa e per la presenza di eventi aritmici.
- 5 pazienti (1 uomo e 4 donne) presentavano una forte familiarità anch'essi per cardiomiopatia dilatativa e morte cardiaca improvvisa. Inoltre è stata individuata una variante in eterozigosi nel **gene VCL** (**c.2378C>A p.Thr793Asn**) classificata come VUS

(variante di incerto significato), in un parente di primo grado con segni di grave scompenso cardiaco ed FE fortemente depressa.

In 12 pazienti (10 maschi e 2 donne), non sono state rilevate varianti classificate come patogenetiche e/o probabilmente patogenetiche nei geni analizzati.

In 7 pazienti (6 maschi e 1 donna) sono state individuate delle varianti ad incerto significato (VUS). Ad oggi tali varianti rimangono ad incerto significato, pertanto non è possibile attribuire loro un chiaro ruolo funzionale né escluderne un ruolo di concausa nel quadro clinico. Tali varianti (VUS) non dovrebbero orientare in atto le decisioni cliniche e/o la stima del rischio di ricorrenza.

Le VUS riscontrate in questi pazienti sono :

TNNC1: c.305 G>T (p.Arg102Leu)

MYH7: c.2359 C>T (p.Arg787Cys)

FHOD3: c.1874 C>A (p.Ser625Tyr)

PRKAG2: c.68G>A (p.Arg23His)

MYH7: c.4687C>G (p.Leu1563Val)

SCNA: c.3523T>C (p.Cys1175Arg)

KLHL24: c.1609_1610delTG (p.Cys537fsTer6)

Tra queste vi è **MYH7: c.2359 C>T (p.Arg787Cys)** che è stata riportata in VarSome come probabilmente patogenetica secondo la

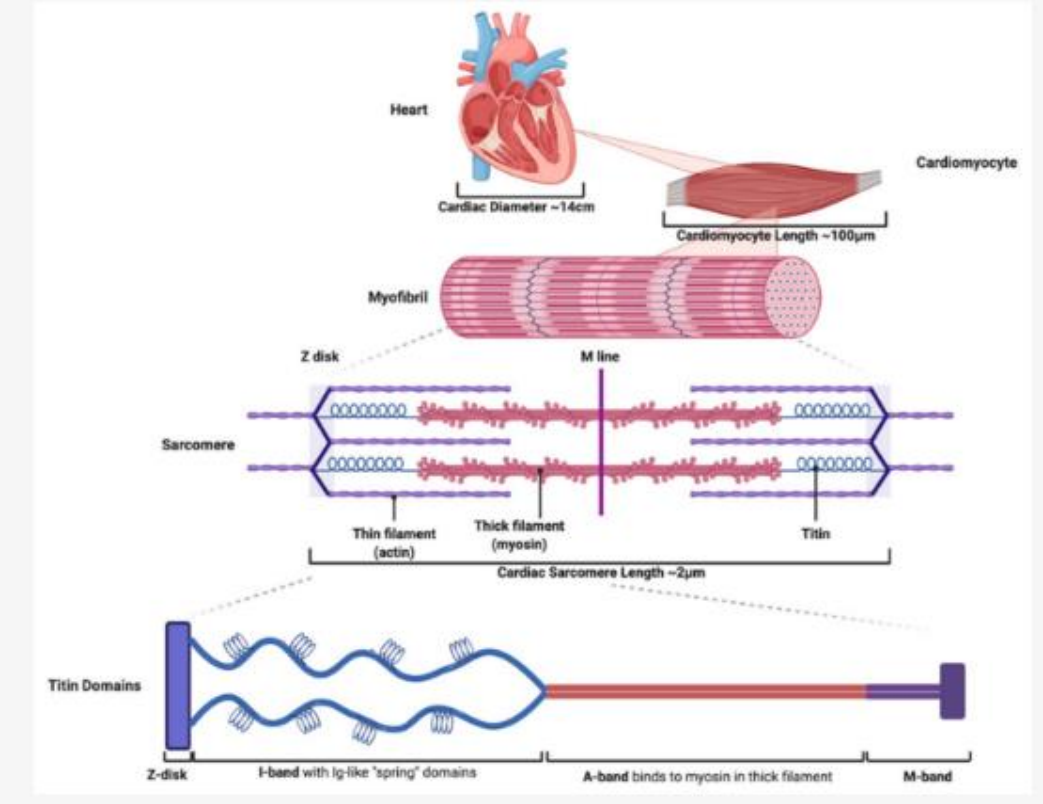
classificazione ACMG e che è presente nel database di frequenze alleliche della popolazione generale (gnomAD) con una frequenza di 0,0000855. Tuttavia è riportata nel database ClinVar come variante di incerto significato.

Il paziente che presenta questa VUS non riferiva familiarità per patologie cardiovascolari ma è stato dimesso, dopo aver eseguito una coronarografia che mostrava coronarie esenti da lesioni significative, con diagnosi di cardiomiopatia dilatativa con funzione globale di pompa severamente depressa e fibrillazione atriale. Il paziente inoltre è stato sottoposto ad impianto di ICD e successivamente upgrade CRTD. È stata anche eseguita, in attesa dell'esito genetico, una BEM con il seguente referto: "frammenti endomiocardici con nuclei ipercromici e dismorfici in miocellule prevaletemente ipertrofiche. Rari elementi linfomonocitari interstiziali (CD 20 neg. CD 3pos), il reperto depone per cardiomiopatia a pattern dilatativo.".

In un paziente, invece, che è stato dimesso con diagnosi di cardiomiopatia dilatativa ndd a coronarie sane, la RMN ha evidenziato severa dilatazione e disfunzione ventricolare sinistra a pattern non ischemico con funzione globale di pompa severamente depressa ed è stato successivamente sottoposto ad impianto di ICD.

All'anamnesi familiare egli non riferiva cardiopatie ma in

seguito al quadro clinico-strumentale si è ritenuto indispensabile sottoporlo ad indagine genetica. L'analisi di sequenza ha rilevato la variante **c.54016G>T in eterozigosi nel gene TTN,** che a livello proteico determina l'introduzione del codone di stop prematuro p.Gly18006Ter. La variante non è presente nel database di frequenze alleliche della popolazione generale (gnomAD), non è descritta in letteratura scientifica e può essere classificata secondo le linee guida ACMG come variante probabilmente patogenetica (classe 4). Pertanto si valuterà di ridiscutere il risultato nell'ambito di una nuova consulenza genetica clinica e di eseguire uno studio di segregazione familiare.

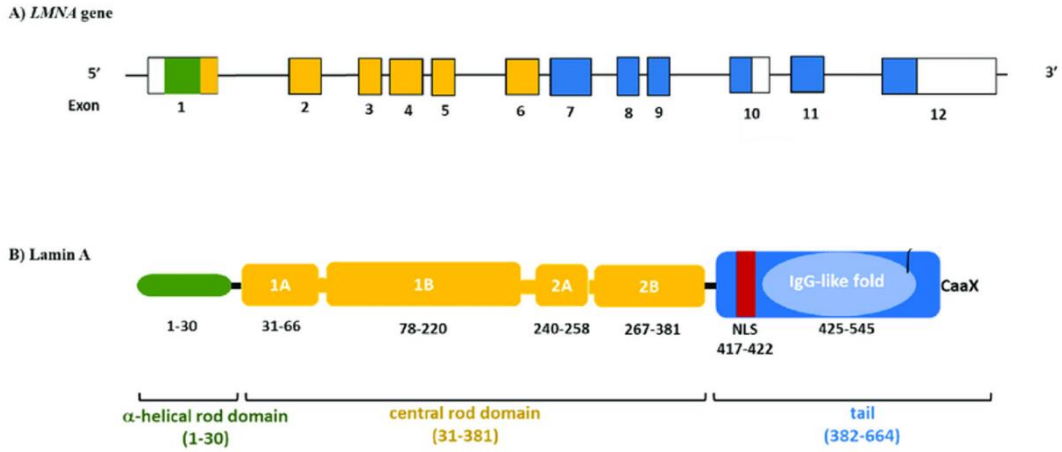


Gene della Titina

Come si evince dalle tabelle sottostanti, sono state infine anche analizzate due famiglie in seguito al risultato dell'analisi genetica dei probandi in cui vi era forte familiarità per morte cardiaca improvvisa.

La prima famiglia (Tab 1) è composta da **13 fratelli e sorelle (4 femmine e 9 maschi)**. Uno dei maschi durante un ricovero in urgenza è stato sottoposto a coronarografia con coronarie esenti da lesioni significative. È stato dimesso con diagnosi di Cardiomiopatia dilatativa ndd con funzione severamente depressa e, nonostante ottimizzazione di terapia, è stato sottoposto ad impianto di device. Ad oggi per il persistere del grave quadro clinico è in follow up clinico-strumentale e in lista per trapianto cardiaco.

Dall'esame genetico l'analisi di sequenza ha rilevato la variante **c.949G>A in eterozigosi nel gene LMNA**, che a livello proteico determina il cambio amminoacidico p.Glu317Lys (rs56816490). La variante ha una frequenza allelica pari a 0.0000319 nella popolazione generale (gnomAD), è riportata in letteratura scientifica associata con l'indicazione clinica, è annotata nel database Clin Var e può essere classificata secondo le linee guida ACMG come variante probabilmente patogenetica (classe 4).



Successivamente, per il quadro delineato, sono stati richiamati tutti i fratelli e le sorelle di primo grado.

Secondo quanto si evince dalla Tabella 1:

I genitori sono deceduti per cause non note.

Due fratelli sono deceduti in culla per cause sconosciute.

Tre fratelli del probando sono affetti da cardiomiopatia dilatativa con funzione globale di pompa depressa all'esordio clinico di tale patologia e pertanto sottoposti, uno ad impianto di ICD e due ad impianto di CRTD. All'elettrocardiogramma presentavano TVNS e BAV di I grado.

Uno dei tre all'analisi genetica presenta la stessa mutazione del probando **c.949G>A in eterozigosi nel gene LMNA (p.Glu31Lys), con persistenza della funzione globale di pompa depressa FE 25%**, mentre gli altri 2 maschi, che presentavano all'esordio della

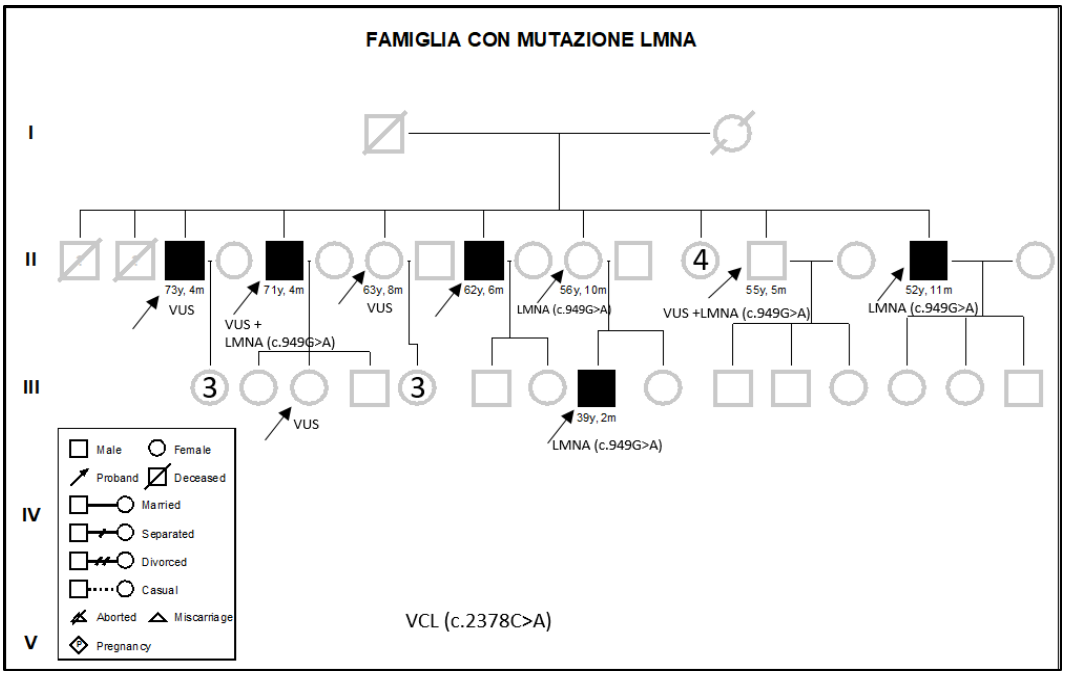
cardiomiopatia dilatativa funzione globale di pompa depressa e ad oggi hanno avuto un miglioramento clinico con **FE 40%**, presentano sia la stessa mutazione del probando **c.949G>A in eterozigosi nel gene LMNA (p.Glu31Lys) che una VUS c.836G>C in eterozigosi nel gene MYBPC3** (classe 3, ovvero con effetti funzionali e clinici non definiti ma suscettibili di subire nel tempo variazioni interpretative in rapporto all'evoluzione delle conoscenze scientifiche). E la figlia di uno di questi ultimi due, che presenta tutto il quadro cardiologico nella norma, all'esame genetico presenta solo **la VUS c.836G>C in eterozigosi nel gene MYBPC3.**

1 solo fratello di questi pazienti, completamente asintomatico e con esami cardiologici nella norma, all'esame genetico presenta sia la presenza della stessa mutazione del probando **c.949G>A in eterozigosi nel gene LMNA (p.Glu31Lys) sia una VUS c.836G>C in eterozigosi nel gene MYBPC3**.

2 sorelle del probando invece presentano un quadro clinico cardiologico nella norma ma all'esame genetico, una sorella presenta la stessa mutazione del probando **c.949G>A in eterozigosi nel gene LMNA (p.Glu31Lys)** che a sua volta ha trasmesso al figlio che, al contrario, presenta un quadro cardiologico con severa disfunzione ventricolare sinistra ed impianto di ICD. L'altra sorella, diversamente,

presenta solo all'analisi genetica **la VUS c.836G>C in eterozigosi nel gene MYBPC3**.

I restanti fratelli sono ancora in fase di follow up.



Tab 1

La seconda famiglia (Tab 2) è stata sottoposta a follow up clinico-strumentale cardiologico e successivamente ad analisi genetica per i numerosi eventi riferiti di morte cardiaca improvvisa nei parenti di I grado.

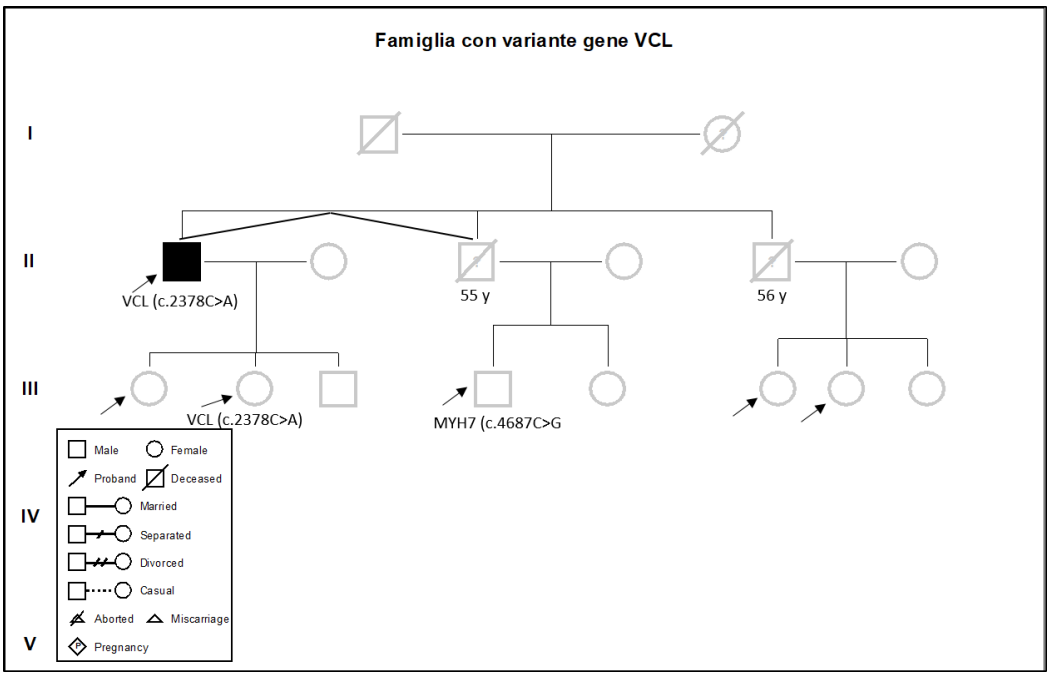
Il probando è un uomo di circa 60 anni a cui, in seguito a un ricovero, è stata fatta diagnosi di cardiomiopatia dilatativa con coronarie esenti e funzione globale di pompa severamente depressa. Durante l'anamnesi familiare aveva riferito due casi di morte cardiaca

improvvisa di due fratelli (uno suo gemello, di 56 anni, e uno di 55 anni). Pertanto è stato sottoposto ad analisi genetica che mostrava riscontro di **variante c.2378C>A in eterozigosi nel gene VCL, classificata come VUS (classe 3).**

Successivamente sono stati chiamati i figli (due femmine e un maschio) per controlli cardiologici e consulenza genetica. Le due figlie femmine non presentano problemi cardiologici agli esami clinico-strumentali e all'esame genetico solo in una figlia vi è la presenza della stessa variante del padre **variante c.2378C>A in eterozigosi nel gene VCL, classificata come VUS (classe 3).** In entrambe però vi è la mutazione in eterozigosi del gene BRCA 2, classe 5, incidental finding, in quanto non richiesto dal test genetico ma segnalato perché correlato a rischio di cancro ereditario.

I figli (una femmina e un maschio) del fratello gemello del probando, che è deceduto improvvisamente a 56 anni, non presentano problemi cardiologici agli esami clinico-strumentali e all'esame genetico a cui al momento si è sottoposto solo il figlio, risulta negativo per geni e/o varianti patogenetiche ma presenta una variante classificata come **VUS nel gene MYH7: c.4687C>G (p.Leu1563Val) in eterozigosi (classe 3) e una variante secondaria del gene BRCA2 in eterozigosi (classe 5).**

Il terzo fratello del probando è deceduto improvvisamente all'età di 55 anni e le due figlie femmine , asintomatiche per problemi cardiologici, dopo essere state sottoposte a test genetico sono risultate negative per varianti classificate come patogenetiche e/o probabilmente patogenetiche nei geni analizzati.



Tab 2

8. DISCUSSIONE

Il 33% dei pazienti ha eseguito il pannello genetico delle cardiomiopatie.

Di questi pazienti il 36% è risultato negativo per le varianti analizzate nel pannello genetico.

Alla luce della presenza della mutazione **c.949G>A nel gene LMNA** in eterozigosi con trasmissione autosomica dominante riscontrata in un probando che presentava un quadro clinico cardiologico di cardiomiopatia dilatativa con funzione di pompa severamente depressa FE 25%, abbiamo sottoposto la famiglia a studio genetico per la ricerca della variante familiare. Abbiamo analizzato 9 componenti di questa famiglia che compongono il 27% del nostro campione Un fratello presentava all'esame genetico la stessa mutazione **c.949 G>A nel gene LMNA** con funzione globale di pompa depressa FE 25%. Mentre altri due fratelli oltre alla presenza della mutazione nel gene LMNA presentavano la variante **c.836G>C in eterozigosi nel gene MYBPC3** classificata come variante ad incerto significato (VUS). Questi ultimi due in cui è stata rilevata la presenza sia della variante patogenetica sul gene LMNA che la variante classificata come VUS del gene MYBPC3, presentavano al controllo un miglioramento del quadro clinico e della funzione globale

di pompa (da FE 20% a FE 40 %). Inoltre un quarto fratello in cui sono state rilevate entrambe le mutazioni, ossia quella nel gene LMNA e la variante VUS nel gene MYBPC3 si presenta completamente asintomatico con quadro cardiologico nella norma.

Sono state, inoltre, sottoposte ad analisi genetica, due sorelle del paziente con mutazione nel gene LMNA in atto asintomatiche. Il test ha evidenziato in una delle due la presenza della mutazione familiare nel gene LMNA che ha trasmesso a sua volta ad un figlio maschio affetto da cardiomiopatia dilatativa con funzione globale di pompa gravemente depressa FE 25% ed impianto di ICD, e nell'altra la presenza della variante VUS nel gene MYBPC3.

Pertanto potremmo ipotizzare un'influenza fenotipica di tale variante sull'espressione clinica della patologia presa in esame.

In uno dei pazienti analizzati, che non riferisce familiarità per patologie cardiovascolari o morti improvvise, abbiamo riscontrato la variante c.54016G>T in eterozigosi sul gene TTN, che a livello proteico determina l'introduzione del codone di stop prematuro p.Gly18006Ter. Tale variante non è presente nel database di frequenze alleliche della popolazione generale gnomAD, non è descritta in letteratura scientifica e può essere classificata secondo le linee guida ACMG come variante probabilmente patogenetica (classe 4). Per tale motivo nonostante la familiarità riferita negativa, è nostra intenzione

avviare uno studio di segregazione allargando l'esame alla famiglia del paziente.

Il restante 33% del nostro campione presenta varianti ad incerto significato e pertanto non è possibile attribuire loro un chiaro ruolo funzionale né escluderne un ruolo di concausa nel quadro clinico. Inoltre il loro significato potrebbe cambiare sulla base di aggiornamenti della sequenza di riferimento e di nuove evidenze scientifiche. Vogliamo però soffermarci a descrivere uno di questi pazienti in quanto, anche se la variante riscontrata (c. 2359C>T - p.Arg787Cys) è riportata nel database ClinVar come variante di incerto significato, la stessa viene citata in VarSome come probabilmente patogenetica secondo la classificazione ACMG. Inoltre il paziente clinicamente presenta un quadro clinico grave con FE 25% e referto di biopsia endomiocardica (BEM) con evidenza di cardiomiopatia a pattern dilatativo. Pertanto, alla luce di quanto detto sarebbe opportuno rivalutare il paziente a distanza e avviare uno studio di segregazione per verificare la correlazione genotipo\fenotipo in altri familiari affetti.

9. CONCLUSIONI

Da questo studio quindi si evince come le forme genetiche di cardiomiopatie dilatative possono essere considerate malattie a bassa incidenza.

La caratterizzazione molecolare di queste patologie è utile al clinico ai fini prognostici e per lo studio dell'andamento della storia naturale dei pazienti con cardiomiopatie.

Tali dati preliminari necessitano di ulteriori approfondimenti scientifici sia dal punto di vista clinico che diagnostico.

BIBLIOGRAFIA

1) *Elliott P, Andersson B, Arbustini E et al.* Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* (2008); 29:270-276

2) *Blankerhorn MA, Gall EA.* Myocarditis and myocardosis: a clinico-pathologic appraisal. *Circulation* (1956); 13:217-223

3) *Brigden W.* Uncommon myocardial diseases; the non-coronary cardiomyopathies. *Lancet* (1957); 273:1179-84

4) *Goodwin J. F., Oakley C. M.* The cardiomyopathies. Br Heart J 1972; 34:545-552

5) Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* (1980); 44:672-673

6) *Richardson P., McKenna W., Bristow M., et al.* Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* (1996); 93:841-842

7) *Maron B. J , Towbin J. A., Thiene G., et al.* Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* (2006); 113:1807-16

8) *Arbustini E., Narula N., Dec W. G., et al.* The MOGE(S) Classification for a Phenotype–Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy. Endorsed by the World Heart Federation. *JACC* (2013); 62:2046-72

9) *Arbustini E., Narula N., Tavazzi L., et al.* The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2014); 64:304-18

10) *Seferovic P. M., Polovina M., Bauersachs J., Arad M., Ben Gal T., Lund L. H., Felix S. B., Eloisa Arbustini E., et al.*, Heart failure in cardiomyopathies: a position paper from the Heart Failure Association

of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure* (2019): 1-24 *European Society of Cardiology*

11) *Rapezzi C., Arbustini E., Caforio A. L. P., Charron P., Gimeno-Blanes J., Heliö T., Linhart A., Mogensen J., Pinto Y., Ristic A., Seggewiss H., Sinagra G., Tavazzi L., Elliot P. M.,* Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal* (2013); 34: 1148-1458

12) *Pinto Y. M., Elliott P. M., Arbustini E., et al.* Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J.* 2016; 37(23):1850-8.

13) *Bondue A., Arbustini E., Bianco A., et al.* Complex Roads from Genotype to Phenotype in Dilated Cardiomyopathy: Scientific update from the Working Group of Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* (2018 May 23).

14) *Arbustini E., Pilotto A., Repetto A., Grasso M., Negri A., Diegoli M., Campana C., Scelsi L., Baldini E., Gavazzi A. Tavazzi L.*, Autosoman dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease. *J. Am. Coll. Cardiol* (2002); 39, 981-990.

15) *van Rijsingen I. A., Arbustini E., Elliot P. M., Mogensen J., Hermans-van Ast J. F., van der Kooi A. J., van Tintelen J. P., van den Berg M. P., Pilott A., Pasotti M., Jenkins S., Rowland C., Aslam U., Wildw A.A., Perrot A., Pankuweit S., Zwinderman A. H., Charron P., Pinto Y. M.*, Risk factors for malignant ventricular arrhythmias in lamin a/c mutation carriers a European cohort study. *J. Am. Coll. Cardiol*. (2012); 59: 493-500.

16) *DiMauro S., Schon E. A.*, Mitochondrial respiratory-chain disease. *N. Engl. J. Med.* (2003); 348: 2656-2668.

17) *Santorelli F. M., Tessa A., D'amati G., Casali C.*, The emerging concept of mitochondrial cardiomyopathies *Am. Heart J.* (2001); 141: 1 ss.

18) *Ikari Y., Kuwako K., Yamaguchi T.*, Fabry's disease with complete atrioventricular block: histological evidence of involvement of the conduction system. *Br. Heart J.* (1992); 68: 323-325

19) *Rapezzi C., Merlini G., Quarta C.C., Riva L., Longhi S., Leone O., Salvi F., Ciliberti P., Pastorelli F., Biagini E., Coccolo F., Cooke R. M., Bacchi-Reggiani L., Sangiorgi D., Ferlini A., Cavo M., Zamagni E., Fonte M. L., Palladini G., Salinaro F., Musca F., Obici L., Branzi A., Perlini S.,* Systemic cardiac amyloidoses: disease profiles and clinical courses of the 3 main types. *Circulation* (2009); 120: 1203-1212.

20) *Hajjar R. J., Kradin R. L.,* Case records of the Massachussetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 17-2002. A 55-year-old man with second-degree atrioventricular block and chest pain. *N. Engl. J. Med.* (2002); 346: 1732-1738

21) *Okura Y., Dec G. W., Hare J. M., Kodama M., Berry G. J., Tazelaar H. D., Bailey K. R,, Cooper L. T.,* A clinical and histopathologic comparison of cardiac sarcoidosis and idiopathic gigant cell myocarditis. *J. Am. Coll. Cardiol*. (2003); 41: 322-329.

22) *Arad M., Maron B. J., Gorham J. M., Johnson WH Jr., Saul J.P., Perez-Atayde AR, Spirito P., Wright G B, Kanter R J., Seidman C. E., Seidman J. G.,* Glicogen storage disease presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med*. (2005); 352: 362-372.

23) *Maron B. J., Roberts W. C., Arad M., Haas T. S., Spirito P., Wright G.B., Almquist A. K., Baffa J. M., Saul J. P., Ho C. Y., Seidman J. Seidman C. E.*, Clinical outcome and phenotypic expression in LAMP2 cardiomyopathy. *JAMA* (2009); 301: 1253-1259.

24) *Katzin L. W., Amato A. A.*, Pompe disease: a review of the current diagnosis and treatment recommendations in the era of enzyme replacement therapy. *J. Clin. Neuromusc. Dis*. (2008); 9: 421-431.

25) *Gollob M. H., Seger J. J., Gollob T. N., Tapscott T., Gonzales O., Bachinski L., Roberts R.*, Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy. *Circulation* (2001); 104: 3030-3033.

26) *Schapira A. H. V*. Mitochondrial disease. *Lancet* (2006); 368: 70-82

27) *DiMauro S., Schon E. A*. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med*, (2003); 348: 2656 - 2668

28) *Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, et al.*, Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J* (2010); 34: 806-14

29) *Falk R.H.*, Diagnosis and management of the cardiac amyloidosis. *Circulation* (2005); 112: 2047-2060.

30*) Rapezzi C., Quarta C. C., Guidalotti P. L., Longhi S., Pettinato C., Leone O., Ferlini A., Salvi F., Gallo P., Gagliardi C., Branzi A.*, Usefulness and limitations of 99mTc-3,3-diphosphono-1,2-propanodicarboxylic acid scintigraphy in the aetiological diagnosis of amyloidotic cardiomyopathy. *Eur. J. Nud Med Mal Imaging* (2011); 38: 470-478.

31) *Quarta C. C., Guidalotti P. L., Longhi L., Pettinato C., Leone O., Ferlini A., Biagini E., Grigioni F., Lorenzini M., Milandri A., Bacchi-Reggiani M. L., Branzi A., Rapezzi C.*, Defining the diagnosis in echocardiographically-suspected senile systemic amyloidosis. *JACC Cardiovasc. Imaging* (2012); 5: 755-758.

32) *Diegoli M., Grasso M., Favalli V. et al.* Diagnostic work-up and risk stratification in X-linked dilated cardiomyopathies caused by dystrophin defects. *J. Am. Coll. Cardiol* (2011); 58: 925-934

33) *Charron P., Arad M., Arbustini E., et al.* Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* (2010); 3: 2715-2726

34) *Metzker M. L.*, Sequencing technologis-the next generetion. *Nat. Rev. Genet*. (2010); 11: 31-46.

35) *Meder B., Haas J, Keller A, Heid C., Just S., Borries A., Boisguerin V., Scharfenberger-Schmeer M., Stähler P., Beier M., Weichenhan D., Strom T. M., Pfeufer A., Korn B., Katus H. A., Rottbauer W.,* Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies. *Circ. Cardiovasc. Genet.* (2011); 4: 110-122.

36) *Fairley E. A, Riddell A., Ellis J. A., Kendrick-Jones J*. The cell cycle dependent mislocalisation of emerin may contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *J. Cell. Sci* (2002); 115: 341–354.

37) *Hutchison C. J., Alvarez-Reyes M., Vaughan O. A.* Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J. Cell. Sci* (2001); 114: 9–19

38) *Krohne G, Benvente R*. The nuclear lamins: a multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp. Cell. Res*. (1986); 162: 1–10

39) *Crisp M., Liu Q., Roux K., et al*. Coupling of the nucleus and Cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* (2006); 172: 41–53.

40) *Dechat T., Pfleghaar K., Sengupta K, et al.* Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* (2008); 22: 832–853.

41) *Vlcek S., Dechat T., Foisner R.* Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *Cell. Mol. Life Sci* (2001); 58: 1758–1765.

42) *Charron P., Arbustini E., Bonne G*., What Should the Cardiologist know about Lamin Disease? *Arrhythmia & Electrophysiology Review* (2012); 1: 22–28.

43) *Verga L., Monica Concardi M.,·Andrea Pilotto A., Bellini O.,·Pasotti M., Repetto A., Tavazzi L.,·Arbustini E.,* Loss of lamin A/C expression revealed by immuno-electron microscopy in dilated cardiomyopathy with atrioventricular block caused by LMNA gene defects. *Virchows Arch* (2003); 443: 664–671

44) *Shemer Y., Mekies L. N., Ben Jehuda R., Baskin P., Shulman R., Eisen B., Regev Danielle, Arbustini E., Gerull B., Gherghiceanu M., Gottlieb E.*, Investigating LMNA-Related Dilated Cardiomyophathy Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, *International Journal of Molecular Sciences* (2021); 22: 1-24.

45) *Arbustini E., Giuliani L., Di Toro A., Favalli V.* Inherited cardiac muscle disease: Dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Genetics and Genomics: Principles and Clinical Practice* (January 2018); 17: 319-366

46) *Arbustini E., Pilotto A., Repetto A., et al*. Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease. *J Am Coll Cardiol*. (2002); 39(6): 981-990.

47) *Brodt C., Siegfried J. D, Hofmeyer M. et al*. Temporal relationship of conduction system disease and ventricular dysfunction in LMNA cardiomyopathy. *J Card Fail*. (2013); 19(4): 233-239.

48) *Arbustini E., Favalli V., Narula N.* LMNA Mutations Associated With Mild and Late-Onset Phenotype: The Case of the Dutch Founder Mutation p.(Arg331Gln). *Circ Cardiovasc Genet*. (2017 Aug); 10(4). pii: e001816. PubMed PMID: 28790155.

49) *Pasotti M., Klersy C., Pilotto A., et al.* Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiolaminopathies. *J Am Coll Cardiol.* (2008); 52(15): 1250-1260.

50) *Captur G., Arbustini E., Bonne G., et al.* Lamin and the heart. *Heart.* (2018); 104(6): 468-479.

51) *Heidi L Rehm, Sherri J Bale, Pinar Bayrak-Toydemir, Jonathan S Berg, Kerry K Brown,Joshua L Deignan, Michael J Frienz, Birgit H Funke, Madhuri R Hedge, Elaine Lyon*, Working group of the American college of medical genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* (2013 Jul 25); 15 (9): 733-747.

52) *Matthijs G., Souche E., Alders M., Corveleyn A., Eck S., Feenstra I., Race V., Sistermans E., Sturm M., Weiss M., Yntema H., Bakker E., Scheffer H., Bauer P.* Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. EuroGentest; European Society of Human Genetics. *Eur J Hum. Genet.* (2016 Jan.); 24 (1): 2-5.

53) *Miller D. T., Kristy L., Gordon A. S., Amendola L. M., Adelman K., J-bale S., Kchung W., Gollob M., Harrison S., et al.*. Recommendatios for reporting of secondary findings in clinical exome and genome

sequencing 2021 update: a policy statement of the American College of Medical Genetic and Genomics. *Genet Med* (2021 Aug.); 23 (8): 1391-1398.