



SAPIENZA

UNIVERSITA' DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE
XXXII CICLO

“Genotype in Hypertrophic Cardiomyopathy: clinical implications”

DOTTORANDO

Dott.ssa Vittoria Mastromarino

DOCENTE GUIDA

Prof. Massimo Volpe

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

INDICE

Abstract	4
Capitolo I: Introduzione	5
1.1 La cardiomiopatia ipertrofica.....	6
1.1.1 Definizione.....	6
1.1.2 Basi genetiche della cardiomiopatia ipertrofica.....	6
1.1.3 Caratteristiche anatomopatologiche e morfologiche.....	7
1.1.4 Fisiopatologia.....	8
1.1.5 Decorso clinico e principali complicanze.....	10
1.2 Correlazione genotipo-fenotipo nella cardiomiopatia ipertrofica.....	12
1.3 Il ruolo del test da sforzo cardiopolmonare nella cardiomiopatia ipertrofica	14
1.4 Obiettivi dello studio.....	14
Capitolo II: Materiali e Metodi	16
2.1 Popolazione dello studio.....	17
2.2 Definizioni.....	18
2.3 Ecocardiografia.....	18
2.4 Test da sforzo cardiopolmonare.....	19
2.5 Analisi genetica.....	20
2.6 Statistica.....	20
Capitolo III: Risultati	22
3.1 Caratteristiche cliniche della popolazione dello studio	23
3.2 Risultato dell'analisi genetica	26
3.3 Analisi di confronto fra i pazienti genotipo-positivo, genotipo-negativo e portatori di VUS	34
3.4 Analisi di confronto fra i pazienti con mutazione singola/mutazioni multiple e con mutazioni a carico dei filamenti sottili/filamenti spessi.....	37
3.5 Analisi degli end-points	40

Capitolo IV: Discussione

46

Bibliografia

51

Abstract

La cardiomiopatia ipertrofia (CMPI) è una malattia genetica del muscolo cardiaco caratterizzata da una notevole eterogeneità genetica e fenotipica.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza e il tipo di mutazioni in un'ampia popolazione di pazienti affetti da CMPI e di ricercare eventuali correlazioni fra il genotipo ed il fenotipo del paziente, valutando le caratteristiche cliniche, ecocardiografiche e soprattutto funzionali, mediante l'utilizzo del test da sforzo cardiopolmonare. Infine abbiamo valutato l'impatto prognostico dei dati genetici, clinici e funzionali nella nostra popolazione.

Abbiamo analizzato retrospettivamente i dati clinici e strumentali di 317 pazienti con diagnosi di CMPI sottoposti ad analisi genetica per la ricerca di mutazioni a carico principali geni sarcomerici coinvolti nella patogenesi della CMPI e seguiti per un tempo medio di follow-up di $5,3 \pm 4,4$ anni.

L'analisi genetica, condotta nella maggior parte dei casi con tecnica NGS su una mediana di 10 geni, ha documentato una mutazione patogenetica o probabilmente patogenetica in 182 pazienti (G+ 57,4%) ed una mutazione di incerto significato in 43 pazienti (VUS 13,5%), mentre nel 29% dei pazienti non è stato possibile identificare una mutazione (G-). A differenza dei pazienti G-, i pazienti G+ presentavano un'età inferiore alla diagnosi e alla prima visita, avevano più spesso una storia familiare positiva per CMPI e morte cardiaca improvvisa, all'ecocardiogramma presentavano valori più bassi di frazione d'eiezione e, al test cardiopolmonare, mostravano una ridotta tolleranza allo sforzo ed un minor incremento della pressione arteriosa con l'esercizio. L'analisi univariata e multivariata hanno dimostrato come il dato genetico non risulti un predittore indipendente di prognosi, a differenza dei valori di circulatory power, importante indice funzionale, che risulta un predittore indipendente sia di morte cardiaca improvvisa sia di scompenso cardiaco.

In conclusione, i pazienti affetti da CMPI portatori di una mutazione sarcomerica patogenetica o probabilmente patogenetica sono più giovani e presentano forme più aggressive di malattia, associate ad una maggior compromissione della capacità funzionale. Tuttavia il dato genetico non presenta una significativa rilevanza in termini di prognosi a differenza degli indici funzionali del singolo paziente. In particolare, è emerso come il circulatory power rappresenti un importante fattore predittivo di morte cardiaca improvvisa e di scompenso cardiaco nella CMPI.

Capitolo I

Introduzione

1.1 La cardiomiopatia ipertrofica

1.1.1 Definizione

La cardiomiopatia ipertrofia (CMPI) è una malattia genetica del muscolo cardiaco, caratterizzata da un'ipertrofia del ventricolo sinistro, tipicamente a distribuzione asimmetrica, in assenza di altre cause, cardiache o sistemiche, in grado di determinarla. È una patologia relativamente comune, che colpisce circa 1 su 500 persone nella popolazione adulta generale. Essa rappresenta inoltre una delle principali cause di morte cardiaca improvvisa giovanile [1,2].

1.1.2 Basi genetiche della cardiomiopatia ipertrofica

La CMPI è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante, a penetranza incompleta e fenotipo variabile, causata da mutazioni a carico dei geni che codificano per proteine del sarcomero. È una patologia caratterizzata da una notevole eterogeneità genetica, oltre che fenotipica: ad oggi, infatti, sono riconosciute oltre 1400 mutazioni in almeno 20 geni associati alla CMPI [1-3]. Le mutazioni più frequenti sono quelle a carico dei geni che codificano per la catena pesante della beta-miosina (MYH7) e per la proteina C legante la miosina (MYBPC3), che rappresentano circa il 70% di tutte le mutazioni [4]. Meno comuni sono le mutazioni a carico dei geni che codificano per la troponina cardiaca I e T (TNNI3, TNNT2), la catena alfa-tropomiosina (TPM1), l'alfa-actina (ACTC1), la catena essenziale leggera 1 della miosina (MYL3), la catena regolatrice leggera 2 della miosina (MYL2) [5].

Le varianti identificate sono più frequentemente 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, oppure di tipo frameshift, in questo caso l'inserzione o la delezione di uno o pochi nucleotidi determina l'alterazione di tutta la struttura della proteina a valle, o, più spesso, provoca un arresto della sintesi proteica con conseguente produzione di una proteina tronca. Per le forme di CMPI 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 CMPI deriva da effetti di dominanza negativa (cioè da un effetto "tossico" della proteina mutata) [6]. Ad oggi, tuttavia, la patogenesi della CMPI a partire dalla mutazione sarcomerica resta largamente ignota, e verosimilmente sono coinvolti più

meccanismi, come suggerito dalla marcata eterogeneità di espressione interindividuale della malattia [1,2,7].

Sebbene le mutazioni patogene siano generalmente ereditate come tratto autosomico dominante, vi sono casi sporadici dovuti a mutazioni *de novo*. Un 3-6% dei soggetti con CMPI presenta invece un genotipo complesso, caratterizzato cioè da più mutazioni coesistenti, nello stesso gene (eterozigote composto) o in geni diversi (eterozigote doppio); nell'1% dei pazienti sono addirittura descritte triple mutazioni [8].

Purtroppo, una mutazione a carico dei geni sarcomerici viene identificata in circa i due terzi dei pazienti sottoposti a screening genetico. La probabilità di trovare una mutazione causale è più alta nei pazienti con malattia familiare e più bassa nei pazienti più anziani e negli individui con caratteristiche non classiche [9]. È possibile che ancora non si conoscano tutti i geni implicati in questa malattia, ma, anche che, in alcuni casi, ci si trovi di fronte ad una “fenocopia”, ovvero ad una condizione caratterizzata da un fenotipo cardiaco simile ma da un genotipo diverso. Negli ultimi anni, infatti, è emerso come alcune forme di CMPI non siano dovute a mutazioni dei geni sarcomerici, ma a disordini metabolici (come la malattia di Anderson-Fabry o la sindrome PRKAG2), mitocondriopatie, malattie neuromuscolari (es. atassia di Friedreich), sindromi malformative (sindrome di Noonan o di LEOPARD) e malattie infiltrative (amiloidosi). La diagnosi differenziale tra la CMPI e queste “fenocopie” richiede un approccio clinico multidisciplinare, oltre che la conferma dell'alterazione genetica.

1.1.3 Caratteristiche anatomopatologiche e morfologiche

A livello microscopico, la CMPI è caratterizzata dall'ipertrofia delle cellule miocardiche con anomalie della struttura, dell'orientamento e della distribuzione miofibrillare, in un quadro di disorganizzazione istologica definito “disarray”. Il tessuto connettivo è sviluppato con aree di fibrosi, anche estese. Inoltre è spesso presente una cosiddetta “malattia dei piccoli vasi”, ovvero un ispessimento della parete delle arteriole intramiocardiche associato a riduzione del lume.

Dal punto di vista macroscopico, è evidente un aumento importante della massa miocardica, con cavità ventricolari ridotte, ed una dilatazione atriale, che riflette le elevate pressioni di riempimento ventricolare. Tuttavia, la CMPI è caratterizzata da un'estrema eterogeneità morfologica. Se nella maggioranza dei casi, l'ipertrofia è asimmetrica con prevalente coinvolgimento del setto interventricolare e della parte libera anteriore, risparmiando la parete posteriore [10,11], talvolta si

può osservare un'ipertrofia di tipo concentrico, con uguale aumento dello spessore di tutte le porzioni della parete ventricolare. In circa il 3-11% dei casi è presente invece un'ipertrofia isolata dell'apice. La forma apicale, descritta con maggiore frequenza nella popolazione giapponese, è caratterizzata dalla presenza all'elettrocardiogramma di onde T negative giganti [12]. Anche il grado di ipertrofia è piuttosto variabile: si va da forme "mild" di ipertrofia, con uno spessore parietale massimo di 13-15 mm, che possono facilmente porre problemi di diagnosi differenziale, a forme di ipertrofia "massiva" caratterizzata da uno spessore che supera i 30 mm. E' stato dimostrato che uno spessore massimo >30 mm rappresenta un fattore di rischio per la morte cardiaca improvvisa [13]. Oltre all'ipertrofia ventricolare sinistra, la CMPI è caratterizzata da alterazioni morfologiche dell'apparato valvolare mitralico: i lembi valvolari sono spesso ridondanti, pur in assenza di alterazioni istologiche o di degenerazione mixomatoide; i muscoli papillari sono spesso ipertrofici e possono avere delle inserzioni anomale direttamente sui foglietti valvolari; le corde valvolari possono essere corte e soprannumerarie [14]. Tutte queste alterazioni contribuiscono alla genesi del movimento anteriore sistolico (SAM, systolic anterior motion) del lembo anteriore o di entrambi i lembi mitralici, causa di ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro e spesso associato ad un'insufficienza funzionale della valvola mitrale [15,16]. La presenza di un gradiente al tratto di efflusso del ventricolo sinistro ≥ 30 mmHg in condizioni basali caratterizza la CMPI ostruttiva. L'ostruzione del tratto di efflusso è presente a riposo nel 20-25% dei pazienti ed è un predittore indipendente di prognosi sfavorevole [17]. Tuttavia, è stato dimostrato come l'ostruzione del tratto di efflusso, seppure non presente a riposo, si possa sviluppare in seguito a sforzi fisici o tachicardia nel 50% circa pazienti.

1.1.4 Fisiopatologia

La fisiopatologia della CMPI è complessa e vede coinvolti tre elementi principali: la disfunzione diastolica, l'ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro e l'ischemia miocardica [1].

In circa l'80% dei pazienti con CMPI sono presenti anomalie del rilasciamento e del riempimento del ventricolo sinistro, principali responsabili dei sintomi di insufficienza cardiaca. L'ipertrofia ventricolare, il disarray delle fibre miocardiche, la presenza di fibrosi interstiziale, le alterazioni del microcircolo con conseguente ischemia subendocardica e l'ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro sono i principali fattori che interferiscono con il rilasciamento e la compliance ventricolare [1]. La disfunzione diastolica determina l'aumento della pressione di riempimento ventricolare e della pressione in atrio sinistro. Questo con il tempo tenderà a dilatarsi progressivamente

predisponendo allo sviluppo di aritmie sopraventricolari, ed, in particolare, di fibrillazione atriale, che, a sua volta rappresenta uno dei principali determinanti di scompenso cardiaco.

Ma la disfunzione diastolica non è l'unico fattore alla base dello scompenso cardiaco, un ruolo importante è svolto anche dall'ostruzione al tratto di efflusso ventricolare sinistro, determinata, nella maggior parte dei casi, dal SAM del lembo anteriore o di entrambi i lembi della valvola mitrale che, a causa di una riduzione anatomica del tratto di efflusso del ventricolo sinistro, secondaria all'ipertrofia del setto interventricolare, vengono "catturati", per effetto Venturi, e spinti verso l'efflusso, causandone l'obliterazione durante la sistole. Contribuiscono allo sviluppo del SAM anche la presenza di una cavità ventricolare sinistra di piccole dimensioni e ipercontrattile, di lembi mitralici ridondanti, la posizione spesso anomala dei muscoli papillari e la presenza di corde tendinee lasse, che offrono un sostegno insufficiente alla valvola durante la sistole [1,14,15]. Il SAM si associa spesso alla perdita di coaptazione dei lembi mitralici, a cui consegue un'insufficienza valvolare funzionale, con jet di rigurgito tipicamente diretto infero-lateralmente in atrio sinistro. Essendo l'ostruzione un fenomeno classicamente dinamico, esistono una serie di condizioni che posso provocarla o accentuarla, come l'esercizio fisico, la disidratazione, lo squatting, i pasti, l'alcool e i farmaci vasodilatatori o inotropi positivi. Viceversa l'utilizzo di farmaci con effetto inotropo e cronotropo negativo, come i beta-bloccanti o i calcio-antagonisti, possono ridurre il grado di ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro. Talvolta, l'ostruzione dinamica può svilupparsi a livello medio-ventricolare, a causa di un contatto anomalo tra setto interventricolare e papillare anteriore, o, più raramente, a livello dell'efflusso ventricolare destro, in pazienti con ipertrofia del ventricolo destro, per un meccanismo a sfintere tra la parete libera del ventricolo e la cresta sopraventricolare [16]. Come già accennato, la presenza di un gradiente al tratto di efflusso ventricolare sinistro maggiore o uguale a 30 mmHg rappresenta un predittore indipendente di prognosi sfavorevole per scompenso cardiaco e mortalità [17].

Un ruolo centrale nella fisiopatologia della CMPI è svolto inoltre dall'ischemia miocardica. La riserva coronarica nei pazienti affetti da CMPI è ridotta, a causa delle alterazioni strutturali del microcircolo coronarico, con riduzione del lume dei piccoli vasi e riduzione della densità capillare, mentre l'aumento della massa miocardica comporta un aumento delle richieste di ossigeno. Ne consegue lo sviluppo di ischemia miocardica, che è alla base della progressiva sostituzione fibrosa e del rimodellamento ventricolare che caratterizza le forme "end stage" di malattia, ma che può anche rappresentare il trigger nella genesi delle aritmie ventricolari.

1.1.5 Decorso clinico e principali complicanze

La storia naturale della CMPI è estremamente variabile, sia l'età di esordio che l'evoluzione della malattia possono essere molto differenti. Per quanto riguarda l'età di esordio, seppure vi siano forme di malattia più aggressive in cui l'ipertrofia si sviluppa precocemente, subito dopo la nascita o durante l'infanzia, nella maggior parte dei casi il rimodellamento ventricolare in senso ipertrofico si realizza durante l'adolescenza, in correlazione con la fase di crescita e maturazione corporea, raggiungendo la completa espressione morfologica intorno ai 17-18 anni [18]. Negli ultimi anni, tuttavia, è emerso come vi siano alcuni casi in cui la malattia si manifesta più tardivamente, anche dopo i 65 anni [19,20,21].

Per quanto riguarda il decorso clinico della malattia (Figura 1), seppure la maggior parte dei pazienti rimanga stabile per lungo di tempo e, in particolare se la malattia si sviluppa dopo i 60 anni, presenti un'aspettativa di vita simile a quella della popolazione generale [22,23], una piccola percentuale di pazienti può andare incontro a complicanze anche gravi. Il tasso di mortalità della CMPI è inferiore all'1% annuo e le principali cause di morte sono rappresentate dalla morte cardiaca improvvisa, lo scompenso cardiaco e la tromboembolia [1,24].

La morte cardiaca improvvisa rappresenta sicuramente la complicanza più devastante e meno prevedibile della malattia. Colpisce prevalentemente soggetti giovani, spesso asintomatici o paucisintomatici, anche se può presentarsi, con minor frequenza, in tutte le decadi di vita, ed è generalmente dovuta ad aritmie ventricolari complesse. Il substrato aritmogenico è dovuto alla fibrosi e al disarray dei cardiomiociti, mentre il trigger per le aritmie ventricolari maggiori può essere dovuto a fenomeni ischemici o all'ostruzione nel tratto di efflusso. Non esistono farmaci antiaritmici in grado di proteggere dalla morte improvvisa, l'unico strumento efficace nella prevenzione di questo evento fatale è il defibrillatore impiantabile (ICD, implantable cardioverter device). La stratificazione del rischio aritmico e l'identificazione dei pazienti da candidare a impianto di defibrillatore rappresentano pertanto tappe ineludibili nella valutazione e nel trattamento dei pazienti con CMPI.

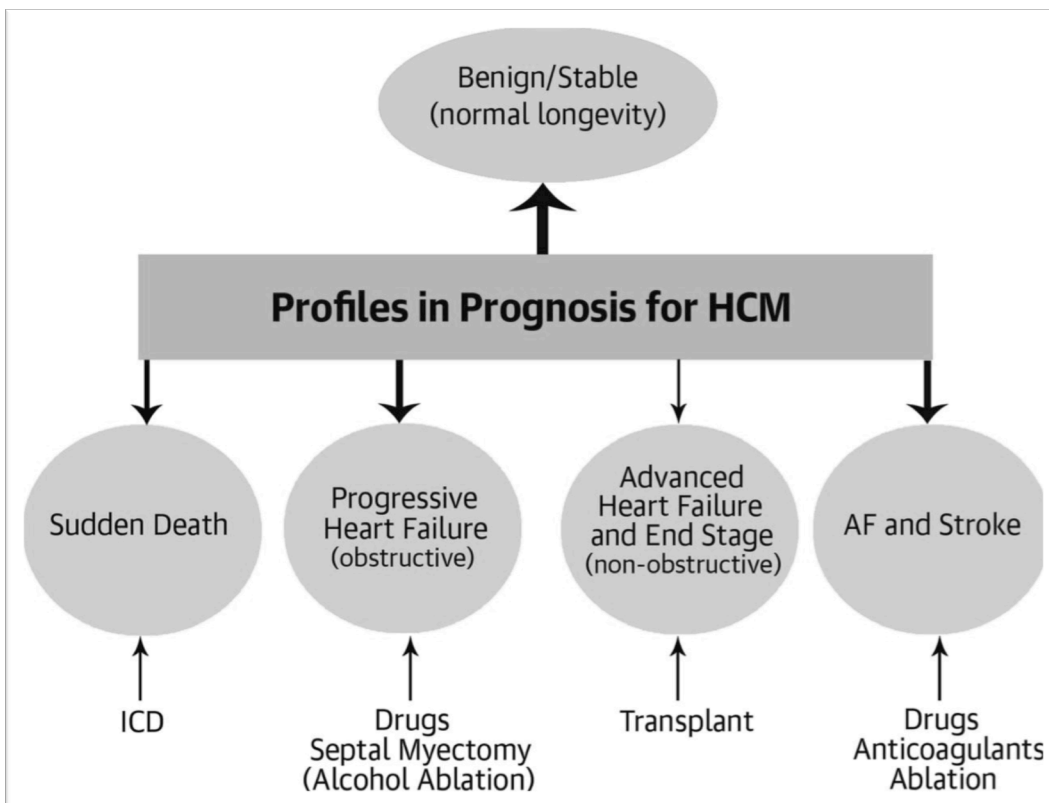
Molto più frequente è invece il rischio di sviluppare un'insufficienza cardiaca. Circa un terzo dei pazienti sviluppa sintomi di insufficienza cardiaca in presenza di funzione sistolica conservata. In questo caso, i principali determinanti dell'insufficienza cardiaca sono rappresentati dalla disfunzione diastolica, dall'ostruzione all'efflusso ventricolare sinistro e dall'insufficienza mitralica. Quando compaiono i sintomi dell'insufficienza cardiaca nei pazienti con CMPI ostruttiva, il primo trattamento è di tipo farmacologico e consiste nell'utilizzo di beta-bloccanti e/o calcio

antagonisti non diidropiridinici, a cui si può aggiungere anche la disopiramide. In caso i sintomi persistano nonostante una terapia medica ottimale, è indicata la correzione non farmacologica dell'ostruzione mediante intervento chirurgico di miotomia/miectomia secondo Morrow o, in alternativa, mediante ablazione alcolica del setto interventricolare effettuata per via percutanea [25].

Una piccola minoranza dei pazienti (circa il 5%), invece, nel corso degli anni sviluppa una disfunzione sistolica del ventricolo sinistro con riduzione degli spessori parietali del ventricolo sinistro, della frazione di eiezione, che scende sotto il 50%, e con la dilatazione della cavità. Questa evoluzione dilatativo-ipocinetica della malattia, definita come evoluzione "end-stage", è una condizione che s'instaura lentamente, a causa della progressiva sostituzione fibrotica del miocardio, probabilmente secondaria all'ischemia miocardica, ma che può progredire rapidamente verso lo scompenso cardiaco severo, portando spesso alla necessità di trapianto cardiaco [26].

Infine, circa il 20% dei pazienti con CMPI sviluppa la fibrillazione atriale [27], con un rischio che è 4 volte superiore rispetto a quello della popolazione generale. Il rischio di fibrillazione atriale è legato soprattutto all'età, alla funzione diastolica e alla dilatazione dell'atrio sinistro, mentre i dati sul ruolo dell'ostruzione all'efflusso sullo sviluppo dell'aritmia sono contrastanti [17]. La fibrillazione atriale è un fattore prognostico negativo che influenza la qualità di vita dei pazienti e aumenta il rischio di mortalità e morbidità: i pazienti con CMPI che sviluppano fibrillazione atriale presentano infatti un aumentato rischio di ictus, di scompenso cardiaco e morte [28,29].

Figura 1. Decorso clinico e possibili complicanze della cardiomiopatia ipertrofica.



1.2 Correlazione genotipo-fenotipo nella cardiomiopatia ipertrofica

Essendo la CMPI caratterizzata da una grande eterogeneità genetica, fenotipica e clinica, dal momento in cui è emersa la natura genetica di questa malattia, ci si è subito chiesti se il dato genetico potesse essere correlato al fenotipo clinico e, soprattutto, se potesse avere un impatto in termini di prognosi [30,31].

Correlazioni genotipo-fenotipo sono state ricercate attivamente in passato, e i primi studi avevano prodotto risultati incoraggianti: le mutazioni nel gene MYH7 erano state associate ad una malattia ad insorgenza precoce, con elevata penetranza ed un'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 favorevole [32,33]. 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" [34]. 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 condotti su grandi casistiche, solo di

probandi, hanno contraddetto tali assunti [35].

Tuttavia, la genetica ha dimostrato di avere un peso in termini prognostici: numerosi studi hanno infatti dimostrato come i pazienti portatori di una mutazione sarcomerica presentino un maggior rischio di eventi avversi rispetto a pazienti “genotipo-negativi” [36,37,38]. Di recente anche lo studio SHARE condotto su un’ampia popolazione di pazienti affetti da CMPI (2763 pazienti seguiti per un tempo mediano di 2,9 anni [IQR 0,3-7,9]) ha chiaramente dimostrato come la presenza di una mutazione sarcomerica e l’età di insorgenza della malattia rappresentino due elementi predittori di eventi avversi [39]. Come già accennato, i pazienti negativi al test genetico rappresentano un gruppo composito, in cui è possibile che la malattia sia causata da geni non ancora identificati, ma è possibile anche che si tratti di pazienti con forme di ipertrofia ad eziologia non genetica.

Negli anni sono emerse numerose evidenze anche a favore del cosiddetto “gene dosage effect”: la presenza di multiple mutazioni a carico dei geni sarcomerici, condizione che interessa circa il 5% degli individui, correla con una malattia ad esordio più precoce e decorso più sfavorevole con aumentato rischio di morte cardiaca improvvisa o scompenso cardiaco [8,40,41,42].

Tuttavia, due studi indipendenti entrambi condotti su pazienti affetti dalla forma end-stage di CMPI non hanno riscontrato differenze significative per quanto riguarda la prevalenza e il tipo di mutazioni sarcomeriche identificate in questi pazienti, se non una maggiore prevalenza di mutazioni multiple [43,44]. Questi risultati hanno portato gli autori a concludere che non potesse essere solo la genetica a determinare il fenotipo, ma un intreccio di fattori genetici, epigenetici ed ambientali, teoria che è stata largamente supportata da studi successivi [7,35].

Recentemente, il gruppo di Olivetto ha rivalutato la possibilità che mutazioni a carico dei geni che codificano per proteine dei filamenti sottili del sarcomero (TNNI3, TNNT2, ACTC, TMP1) o dei filamenti spessi (MYBPC3, MYH7, MYL2) possano influenzare il fenotipo e la prognosi. Dal loro studio emerge come i pazienti con mutazioni dei geni TNNI3, TTN2 e ACTC presentano un fenotipo caratterizzato da spessori parietali inferiori, un’ipertrofia più spesso di tipo concentrico o apicale, un più severo grado di fibrosi miocardica ed una più severa disfunzione diastolica, inoltre questi pazienti presentano un maggior rischio di evoluzione end-stage e scompenso cardiaco rispetto al gruppo portatore di mutazioni a carico di geni che codificano per proteine dei filamenti pesanti [45].

1.3 Il ruolo del test da sforzo cardiopolmonare nella CMPI

Le ricerche su una possibile correlazione fra genotipo e fenotipo sono continuamente in evoluzione, anche grazie alle nuove tecniche diagnostiche come la risonanza magnetica cardiaca [46].

In tale contesto, il test da sforzo cardiopolmonare ha acquisito negli ultimi anni un ruolo centrale nella gestione dei pazienti affetti da CMPI [47]. Si tratta di un test che permette non solo di valutare oggettivamente la capacità funzionale dei pazienti e di identificare il meccanismo alla base della limitazione funzionale, ma fornisce anche informazioni importanti da un punto di vista prognostico. La fisiopatologia della limitazione funzionale nella CMPI è complessa: diversi sono i determinanti della limitazione all'esercizio, tra cui l'ipertrofia ventricolare sinistra, l'ostruzione del tratto di efflusso ventricolare sinistro, la disfunzione diastolica, il "disarray" delle fibre miocardiche, l'ischemia microvascolare e la fibrosi interstiziale, l'incompetenza cronotropa e il decondizionamento. Poiché questi fattori sono anche i principali determinanti coinvolti nello sviluppo e nella progressione dell'insufficienza cardiaca, nonché nella genesi delle aritmie, la capacità funzionale assume anche un importante significato prognostico [38,48]

Difatti, diversi studi hanno dimostrato come sia il consumo di ossigeno (VO_2), indice della capacità funzionale, sia il VE/VCO_2 slope, indice di impegno vascolare polmonare, siano predittori di morte per scompenso cardiaco e morte improvvisa cardiaca [49,50,51].

Recentemente, in uno studio condotto su una popolazione di 620 pazienti affetti da CMPI, il nostro gruppo ha inoltre dimostrato che il "circulatory power", dato dal prodotto fra il VO_2 di picco (espresso come percentuale del predetto per età, sesso e altezza) e la pressione arteriosa sistolica massima, il VE/VCO_2 slope e il diametro atriale sinistro sono predittori indipendenti per un endpoint composito di morte per scompenso cardiaco, trapianto di cuore, ospedalizzazione per scompenso cardiaco e progressione delle classe funzionale a NYHA III-IV, e possono essere combinati in uno score di rischio utile al fine di una più precoce identificazione dei pazienti a rischio di scompenso cardiaco [52].

1.4 Obiettivi dello studio

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza e il tipo di mutazioni in un'ampia popolazione non selezionata di pazienti affetti da CMPI, sottoposti ad analisi genetica per la ricerca di mutazioni a carico dei principali geni sarcomerici coinvolti nella patogenesi della CMPI.

Abbiamo inoltre ricercato eventuali correlazioni fra il genotipo ed il fenotipo clinico del paziente,

valutando le caratteristiche cliniche, ecocardiografiche e soprattutto funzionali, mediante lo studio della capacità di esercizio con il test cardiopolmonare.

Infine abbiamo valutato l'impatto prognostico dei dati genetici, clinici e funzionali nella nostra popolazione.

Capitolo II

Materiali e Metodi

2.1 Popolazione dello studio

Dal gennaio 2000 al gennaio 2019, 450 pazienti consecutivi con una diagnosi di CMPI sono stati valutati e periodicamente seguiti presso il Centro dedicato alle Cardiomiopatie del nostro Ospedale (Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Università Sapienza di Roma). La diagnosi di CMPI è stata effettuata sulla base del riscontro ecocardiografico di un'ipertrofia cardiaca, con uno spessore parietale massimo ≥ 15 mm negli adulti, in assenza di altre cause cardiache o sistemiche in grado di determinarla, oppure in presenza di uno spessore parietale massimo ≥ 13 mm in pazienti con familiari di I grado affetti, in accordo con le linee guida [22].

Effettuando un'analisi retrospettiva, sono stati selezionati i pazienti che avevano eseguito l'analisi genetica per la ricerca di mutazioni sarcomeriche su almeno 4 geni (MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3). I pazienti con una forma non sarcomerica di CMPI, come forme da accumulo, metaboliche o sindromiche (i.e., amiloidosi, malattia di Fabry, sindrome di Leopard o Noonan) sono stati esclusi dallo studio.

Alla prima visita, tutti i pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione cardiologica completa, comprensiva dell'anamnesi familiare e della valutazione della classe funzionale NYHA, ad un elettrocardiogramma, un ecocardiogramma e un ECG Holter delle 24 ore al fine di ricercare eventuali eventi aritmici di rilievo. Qualora non presenti eventuali controindicazioni, tutti i pazienti hanno eseguito un test da sforzo cardiopolmonare per la valutazione della capacità funzionale ed una risonanza magnetica cardiaca per la valutazione della presenza di fibrosi miocardica (late gadolinium enhancement, LGE).

La stratificazione del rischio di morte improvvisa è stata effettuata alla prima visita e quindi periodicamente rivalutata durante il follow-up [53,54]. In particolare, sono stati valutati i cinque fattori di rischio predittivi di morte cardiaca improvvisa di seguito riportati:

- familiarità per morte cardiaca improvvisa, definita come morte cardiaca improvvisa correlata alla CMPI in almeno un familiare di I grado di età ≤ 50 anni;
- ipertrofia massiva, definita dalla presenza di uno spessore parietale massimo ≥ 30 mm;
- tachicardia ventricolare non sostenuta: presenza di una sequenza di 3 o più battiti ventricolari consecutivi ad una frequenza ≥ 120 bpm e della durata inferiore a 30 secondi, registrata all'ECG Holter delle 24 ore;
- recente episodio sincopale (avvenuto negli ultimi 6 mesi), non spiegato, ovvero con

caratteristiche non compatibili con una sincope di natura vasovagale o neurogena;

- scarso incremento della pressione arteriosa sistolica durante lo sforzo (≤ 20 mmHg), o caduta della pressione arteriosa sistolica all'apice dello sforzo ≥ 20 mmHg.

Tutti i pazienti hanno acconsentito all'utilizzo dei dati clinico-strumentali in forma anonima.

2.2 Definizioni

La CMPI è stata definita "end-stage" in presenza di una frazione d'eiezione ventricolare sinistra $< 50\%$ in condizioni basali [55].

La morte cardiaca improvvisa (sudden cardiac death, SCD) è stata definita come un evento naturale dovuto a cause cardiache, preceduto da un'improvvisa perdita di coscienza verificatasi entro un'ora dall'inizio della sintomatologia acuta, oppure come morte occorsa inaspettatamente, anche se non testimoniata, come durante la notte [56].

La morte per scompenso cardiaco è stata definita come una morte sopravvenuta nel contesto di uno scompenso cardiaco cronico secondario alla progressione della malattia nell'anno precedente, con lo sviluppo di edema polmonare o l'evoluzione verso una forma end-stage [10].

Gli interventi appropriati del defibrillatore in forma di shock o anti-tachycardia pacing su fibrillazione ventricolare o tachicardia ventricolare rapida (FC > 180 bpm) sono stati considerati equivalenti di morte cardiaca improvvisa [57].

Il trapianto cardiaco è stato considerato un equivalente di morte per scompenso cardiaco.

2.3 Ecocardiografia

La valutazione ecocardiografica è stata effettuata con macchinari disponibili in commercio. In tutti i pazienti, sono state eseguite le seguenti misure secondo le attuali linee guida: diametro telediastolico ventricolare sinistro (LVEDd, left ventricle end-diastolic diameter), spessore parietale massimo (MWT, maximal wall thickness), diametro telesistolico atriale sinistro (LAd, left atrial diameter) e la frazione d'eiezione ventricolare sinistra (LVEF, left ventricular ejection fraction) [58]. L'ostruzione al tratto di efflusso ventricolare sinistro (LVOTO, left ventricle outflow tract obstruction) in condizioni basali è stata considerata presente quando è stato registrato un gradiente

di picco ≥ 30 mm Hg allo studio mediante Doppler continuo [59].

2.4 Test da sforzo cardiopolmonare

Tutti i test da sforzo cardiopolmonari (cardiopulmonary exercise test, CPET) sono stati eseguiti utilizzando un cicloergometro dotato di un carrello metabolico che permette la registrazione, respiro per respiro, dei flussi e della concentrazione dei gas espirati. I pazienti sono stati sottoposti ad un protocollo a rampa personalizzato, al fine di svolgere un esercizio della durata di 10 ± 2 minuti [60].

L'esercizio è stato preceduto da due di minuti di riposo con monitoraggio dello scambio di gas respiro per respiro e da 3 minuti di riscaldamento senza carico (warm-up). In assenza di eventi clinici, il CPET è stato interrotto quando il paziente ha raggiunto il massimo sforzo. Lo sforzo è stato considerato massimale solo quando il quoziente respiratorio era superiore a 1.05. Durante la prova da sforzo sono stati registrati un ECG a 12-derivazioni e la pressione arteriosa sistolica (systolic blood pressure, SBP) e diastolica, al fine di ottenere i seguenti parametri: la frequenza cardiaca (heart rate, HR) a riposo, il picco di frequenza cardiaca (peak HR), la percentuale di picco della frequenza cardiaca rispetto al predetto in base all'età, ovvero "peak HR, %" ($[\text{peak HR}/(220 - \text{età})] \times 100$), e l'incremento della pressione arteriosa sistolica con lo sforzo ($\Delta\text{SBP} = \text{peak SBP} - \text{SBP a riposo}$). E' stata inoltre effettuata un'analisi respiro per respiro dei gas espiratori e della ventilazione (VE), il cui valore di picco è stato misurato negli ultimi 20 secondi dell'esercizio.

Il picco del consumo di ossigeno (VO_2) predetto è stato calcolato utilizzando formule sulla base dell'età, dell'altezza e del sesso [61]. Il "circulatory power", dato dal prodotto del VO_2 picco e della pressione arteriosa sistolica massima ($\text{CP} = \text{peak } \text{VO}_2 \times \text{SBP}$), è stato calcolato considerando il valore di VO_2 in termini di ml/kg/min (CP) e come percentuale del predetto (CP%) [62].

Il rapporto VO_2 /carico di lavoro (workload, WR) è stato misurato durante l'intero esercizio. Il calcolo della soglia anaerobica (AT, anaerobic threshold) è stato eseguito attraverso l'analisi V-slope del VO_2 and VCO_2 , e confermato attraverso lo studio degli equivalenti ventilatori e la pressione parziale di fine espirazione di CO_2 e O_2 (PetCO_2 e PetO_2). La fine del periodo isocapnico è stata identificata quando il rapporto VE/VCO_2 aumenta e la pressione di fine espirazione della CO_2 diminuisce. Il rapporto VE/VCO_2 è stato calcolato come la pendenza della relazione lineare fra la ventilazione e l'eliminazione di CO_2 (VCO_2) dopo il primo minuto dall'inizio dell'esercizio alla fine del periodo isocapnico. [63]

2.5 Analisi genetica

L'analisi genetica è stata effettuata principalmente presso il laboratorio del dipartimento di Genetica dell'Ospedale Sant'Andrea. Tuttavia, abbiamo preso in considerazione per il nostro studio anche i risultati di analisi genetiche condotte in altri centri e con differenti piattaforme. Sebbene negli ultimi anni l'analisi genetica sia stata eseguita con la tecnica "next generation sequencing" (NGS), in passato si utilizzava il metodo Sanger: per il nostro studio sono stati utilizzati risultati dell'analisi genetica condotta con entrambe le metodiche. Tutti i risultati sono stati rivisti e le varianti identificate sono state classificate, in accordo con le più recenti linee guida dell'American College of Medical Genetics, in patogenetiche, probabilmente patogenetiche, di incerto significato (o VUS, variance of unknown significance), probabilmente benigne e benigne [64]. Al fine di stabilire il significato di una variante, sono stati utilizzati i dati di minor allele frequency (MAF) derivati dal "Exome Aggregation Consortium and the Exome Variant Server"; per l'analisi di predizione degli effetti della variante sulla proteina sono stati utilizzati i software PolyPhen2, SIFT, and MutationTaster; infine, abbiamo utilizzato i dati di cosegregazione nelle famiglie, fonti delle letteratura e dati pubblicati sul database ClinVar.

I pazienti portatori di una variante patogenetica o probabilmente patogenetica sono stati classificati come "genotipo positivo (G+)", i pazienti con mutazioni di incerto significato sono stati classificati come "VUS" e i pazienti portatori di una mutazione benigna, probabilmente benigna o non portatori di una mutazione sono stati identificati come "genotipo negativo (G-)".

I pazienti con mutazioni patogenetiche o probabilmente patogenetiche dei geni LAMP2, GLA e PRKAG2 sono stati esclusi, mentre pazienti con una mutazione sarcomerica patogenetica o probabilmente patogenetica e una seconda variante di incerto significato a carico di questi geni sono stati inclusi.

2.6 Statistica

I dati continui sono espressi come media \pm deviazione standard. I dati categorici sono espressi come numero di pazienti e percentuale sul numero totale. Le differenze fra le variabili continue sono state calcolate utilizzando lo Student's t-test. Le variabili categoriche sono state confrontate utilizzando il chi-square test o il test di Fisher. La durata media del follow-up è stata calcolata dalla prima visita effettuata presso il nostro centro all'ultima valutazione o alla comparsa di un evento (SCD o intervento appropriato del defibrillatore, morte per scompenso cardiaco o trapianto), se

sopravvenuto.

Abbiamo quindi valutato il raggiungimento dei seguenti end-points:

- 1) l'end-point "morte cardiaca improvvisa" (o sudden cardiac death, SCD), comprendente la morte cardiaca improvvisa e suoi equivalenti, come un arresto cardiaco rianimato o interventi appropriati del defibrillatore (definiti come interventi su fibrillazione ventricolare o tachicardia ventricolare rapida con FC >180 bpm);
- 2) l'end-point "scompenso cardiaco" che comprende la morte per scompenso cardiaco, il trapianto cardiaco, l'inserimento in lista per trapianto di cuore, lo sviluppo di una forma end-stage di CMPI, il ricovero per scompenso cardiaco, la progressione dei sintomi alla classe funzionale NYHA III-IV, l'intervento di miectomia, qualora guidato dalla progressione dei sintomi;
- 3) un end-point combinato dei due.

Al fine di stabilire il ruolo di caratteristiche cliniche, ecocardiografiche, funzionali e genetiche sulla prognosi sono state effettuate l'analisi univariata e l'analisi multivariata a regressione di Cox per i tre differenti end-points. Le variabili non significativamente associate con l'outcome sono state rimosse dall'analisi multivariata utilizzando una procedura "step-down" basata sul rapporto di verosimiglianza.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software statistico SPSS.

E' stato considerato statisticamente significativo un valore della $p \leq 0.05$.

Capitolo III

Risultati

3.1 Caratteristiche generali della popolazione di studio

Trecentodiciassette pazienti rientravano nei criteri di studio. Duecentocinquantotto pazienti erano dei probandi (81,3%), mentre 59 pazienti (18,6%) erano familiari in cui la diagnosi di CMPI è stata effettuata nell'ambito di uno screening familiare.

Le caratteristiche cliniche della popolazione di studio alla prima valutazione sono rappresentate nella tabella 1. I pazienti, prevalentemente di sesso maschile (62,5%), presentavano un'età media alla diagnosi di 40 ± 20 anni ed un'età media alla prima valutazione di 49 ± 18 anni. La maggior parte dei pazienti aveva una classe funzionale NYHA I-II alla prima valutazione, mentre solo il 7,3% dei pazienti si presentava in classe funzionale NYHA III. Ventitré pazienti (7,3%) presentavano la forma apicale di CMPI, mentre il 31,5% dei pazienti presentava la forma ostruttiva della malattia. Tredici pazienti (4,1%) erano già stati sottoposti ad intervento chirurgico di miotomia-miectomia. Trenta pazienti (9,5%) presentavano, già alla prima valutazione, una forma end-stage della malattia e 37 (11,5%) erano già portatori di un defibrillatore.

Circa la metà dei pazienti presentava una storia familiare di CMPI (51,3%), mentre solo il 14,2 % dei pazienti presentava familiarità per SCD. Alla prima valutazione ventiquattro pazienti (7,6%) presentavano un'ipertrofia massiva, il 34% aveva storia di TVNS, e il 15,8% aveva avuto un episodio sincope. Le principali comorbidità erano rappresentate dall'ipertensione arteriosa, presente nel 28,4% dei pazienti, dal diabete mellito (5%), dalla fibrillazione atriale (3,5%) e dalla malattia coronarica (3,8%). La maggior parte dei pazienti era in terapia con farmaci beta-bloccanti (60,5%). Solo 218 (68,7%) pazienti hanno effettuato la risonanza magnetica cardiaca, ma di questi il 67,9% presentava LGE suggestivo di fibrosi miocardica. Il CPET è stato eseguito in 241 pazienti (76%) e ha documentato uno scarso incremento della pressione arteriosa sistolica durante l'esercizio in 55 pazienti (22,9%). I dati del CPET sono mostrati in Tabella 2.

Tabella 1. Caratteristiche generali della popolazione di studio alla prima valutazione.

Caratteristiche generali	Popolazione totale (n: 317)
Età alla diagnosi, anni	40±20
Età alla prima visita, anni	49±18
Sesso maschile, n (%)	198 (62,5)
BMI, kg/m ²	26±8
BSA, m ²	1,8±0,22
Familiarità per CMPI, n (%)	162 (51,3)
NYHA, n (%):	
I	135 (42,6)
II	159 (50,2)
III	23 (7,3)
LVOTO, n (%)	100 (31,5)
CMPI apicale, n (%)	23 (7,3)
End-stage, n (%)	30 (9,5)
ICD, n (%)	37 (11,7)
Pregressa miectomia, n (%)	13 (4,1)
Fibrillazione atriale, n (%)	11 (3,5)
Ipertensione, n (%)	90 (28,4)
Diabete, n (%)	16 (5)
CAD, n (%)	12 (3,8)
Fattori di rischio per SCD	
TVNS, n (%)	107 (34)
Familiarità per SCD, n (%)	45 (14,2)
MWT > 30 mm, n (%)	24 (7,6)
Sincope, n (%)	50 (15,8)
ABPRE, n (%)	55 (22,9)
LGE, n (%)	148/218 (67,9)
Ecocardiogramma	
MWT, mm	20±5

LVEDd, mm	45,5±5
LAd, mm	43,5±7
LVOTG _{max} , mm Hg	24±28
LVEF, %	61±6
Terapia	
Beta-bloccanti, n (%)	192 (60,6)
Calcio-antagonisti, n (%)	28 (8,9)
Diuretici, n (%)	98 (30,9)
ACEI/ARBs, n (%)	66 (20,8)
Disopiramide, n (%)	10 (3,2)
Amiodarone, n (%)	27 (8,5)

I dati sono espressi come media ± deviazione standard, o come numero di pazienti e percentuale sul numero totale. Abbreviazioni: BMI: indice di massa corporea; BSA: superficie corporea; CMPI: cardiomiopatia ipertrofica; NYHA: New York Heart Association; LVOTO: ostruzione al tratto di efflusso ventricolare sinistro; ICD: defibrillatore impiantabile; CAD: malattia coronarica; TVNS: tachicardie ventricolari non sostenute; SCD: morte cardiaca improvvisa; MWT: spessore parietale massimo; ABPRE: scarso incremento pressorio durante sforzo; LGE: late gadolinium enhancement; LVEDd: diametro telediastolico del ventricolo sinistro; LAd: diametro atriale sinistro; LVOTG: gradiente al tratto di efflusso ventricolare sinistro; LVEF: frazione d'eiezione del ventricolo sinistro; ACEI: inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina; ARBs: antagonisti dei recettori per l'angiotensina II.

Tabella 2. Risultati del test cardiopolmonare nella nostra popolazione di studio.

CPET	Popolazione totale (n: 241)
Peak WR, Watts	123±50
Peak SBP, mmHg	163±27
ΔSBP, mm Hg	44±23
Peak HR, bpm	136±26
Peak HR, %	83±15
AT VO ₂ , ml/kg	15,2±4
Peak VO ₂ , ml/kg/min	23,3±7
Peak VO ₂ , %	77±19

CP, ml/kg/min*mm Hg	3841±1449
CP%, %*mm Hg	12824±4459
VO ₂ /WR slope, ml/watt	10,7±1,6
VE/VCO ₂ slope	29±6

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. Abbreviazioni: CPET: test da sforzo cardiopolmonare; WR: carico di lavoro; SBP: pressione arteriosa sistolica; HR: frequenza cardiaca; AT: soglia anaerobica; VO₂: consumo di ossigeno; CP: circulatory power; VE: ventilazione; VCO₂: eliminazione di CO₂.

3.2 Risultato dell'analisi genetica

L'analisi genetica, condotta nella maggior parte dei casi con tecnica NGS su una media di 13 geni ed una mediana di 10 geni [IQR 5-10], ha documentato una mutazione patogenetica o probabilmente patogenetica in 182 pazienti (G+ 57,4%); 43 pazienti sono risultati portatori di una mutazione di incerto significato (VUS 13,5%), mentre nel 29% dei pazienti non è stato possibile identificare una mutazione (G-). Dodici pazienti (6.5%) sono risultati portatori di due o più mutazioni, entrambe di significato patogenetico o probabilmente patogenetico (Figura 2).

In totale sono state identificate 162 mutazioni, di cui 95 di significato patogenetico o probabilmente patogenetico (58,6%) e 67 VUS (41,3%). In accordo con i dati della letteratura, nella maggior parte dei casi le mutazioni coinvolgevano i geni MYBPC3 and MYH7 (rispettivamente 40% e 23%), mentre le mutazioni dei geni ACTC1, TNNI3, TNNT2, MYL2, MYL3 e MYH6 insieme rappresentavano il 21% del totale, un restante 16% delle mutazioni interessava diversi geni quali AKAP9, CAV3, DES, DSP, FBN1, FHL1, FLNC, GAA, GLA, KCNQ1, LDB3, LMNA, PKP2, PRKAG2, RBM20, SCN5A, SGCD, TMP1, VLC (Figura 3).

La maggior parte delle mutazioni era di tipo missenso (59%), 13 erano mutazioni non-senso, 8 frameshift, 14 mutazioni del sito di splicing (Figura 4).

La percentuale di positività al test genetico è risultata molto maggiore nei familiari rispetto ai probandi: sono state identificati infatti 52 mutazioni di significato patogenetico/probabilmente patogenetico nei 59 familiari (detection rate 88%), mentre dei probandi solo il 50% è risultato "genotipo-positivo".

L'elenco completo delle mutazioni identificate è riportato in Tabella 3.

Figura 2. Risultato dell'analisi genetica.

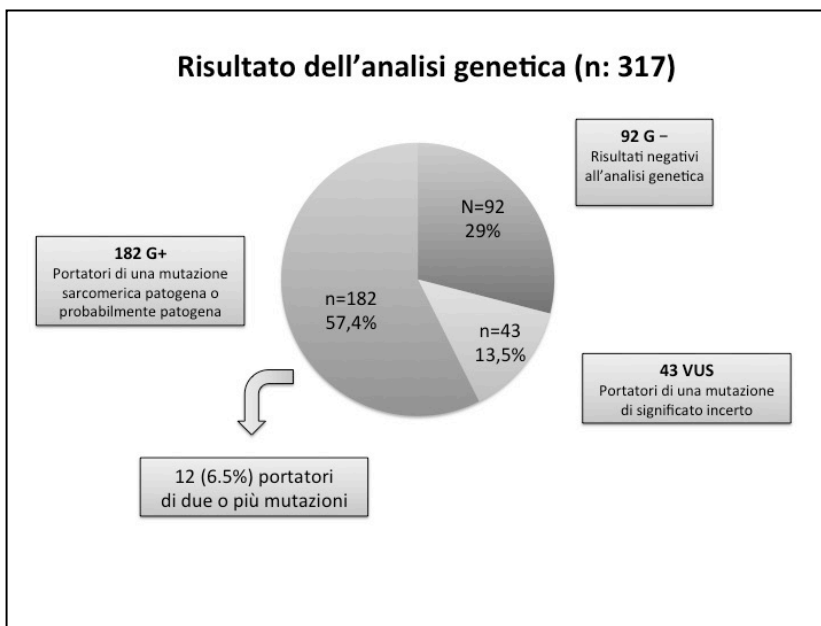


Figura 3. Rappresentazione schematica dei geni interessati dalle mutazioni nella nostra popolazione.

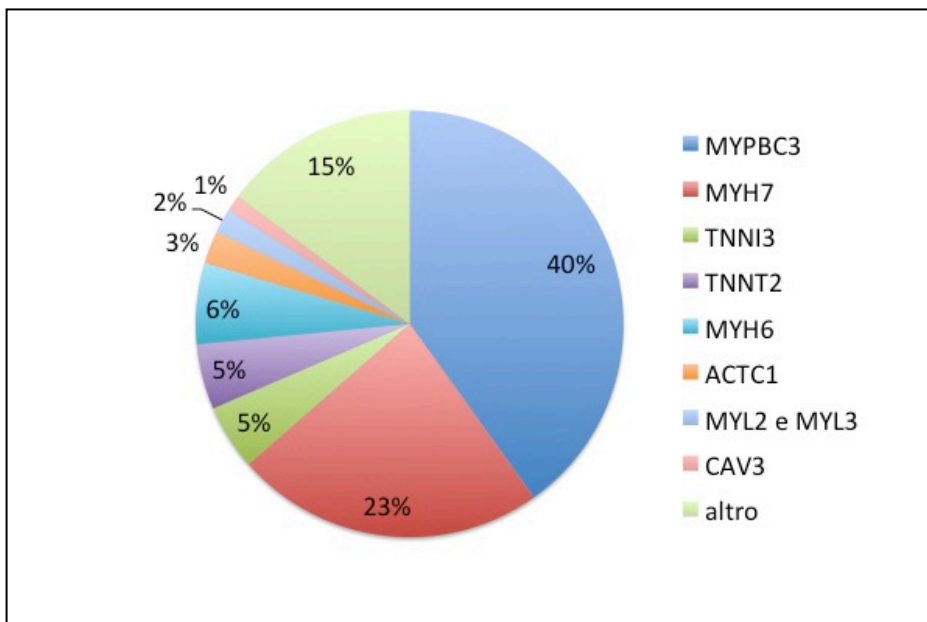


Figura 4. Classificazione delle mutazioni riscontrate in base all'effetto.

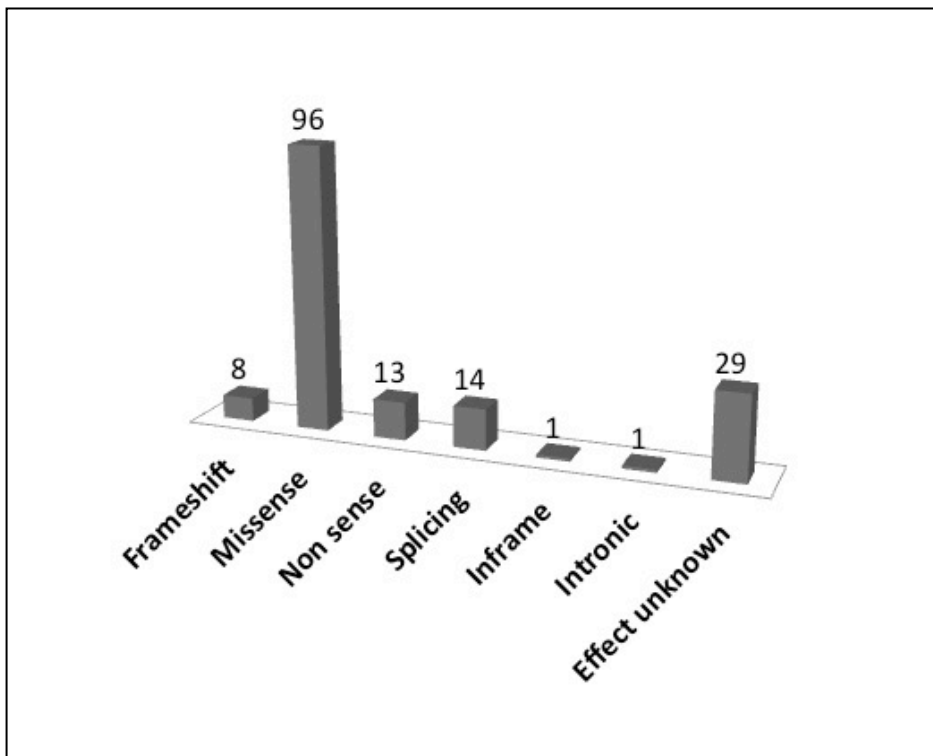


Tabella 3. Mutazioni sarcomeriche identificate nella nostra popolazione di studio.

GENE	Mutazione (c.)	Effetto (p.)	Classificazione [^]	Frequenza
ACTC1	c.285G>T	p.Glu95Asp	3	1
ACTC1	c.854T>C	p.Met285Thr	3	3
ACTC1	c.855G>C	p.Met285Ile	3	1
AKAP9	c.7582C>G	p.Gln2528Glu	3	1
CAV3	c.233C>T	p.Thr78Met	3	4
CAV3	c.216C>G	p.Cys72Trp	3	2
DES	c.639+4A>G		3	1
DES	c.638C>T	p.Ala213Val	3	1
DSP	c.4961T>C	p.Leu1654Pro	4	1
FBN1	c.6823A>G	p.Ile2275Val	3	2
FHL1	c.195C>G	p.Cys65Trp	4	2
FLNC	c.4301G>A	p.Arg1434His	3	1

GAA	c.2320G>A	p.Asp774Asn	3	2
GLA	c.937G>T	p.Asp313Tyr	3	3
KCNQ1				2
LDB3	c.690-4A>G		2-3	1
LDB3	c.549-4A>G		3	1
LMNA	c.1640T>C	p.Val547Ala	3	1
LMNA	c.810+4C>A		3	1
LMNA	c.494T>G	p.Leu165Arg	3	2
MYBPC3	c.1664T>C	p.Met555Thr	3	1
MYBPC3	c.2002C>T	p.Arg668Cys	4	1
MYBPC3	c.2309-2A>G		4-5	1
MYBPC3	c.2654 C>T	p.Thr885Met	3	1
MYBPC3	IVS12+1G>A		4	1
MYBPC3	IVS28+1 G>A		4	1
MYBPC3	c.1090G>A	p.Ala364Thr	3	1
MYBPC3	c.1112C>G	p.Pro371Arg	4	4
MYBPC3	c.1119C>G	p.Tyr373*	5	1
MYBPC3	c.1321G>A	p.Glu441Lys	3	2
MYBPC3	c.1373G>A	p.Arg458His	4	1
MYBPC3	c.1409G>A	p.Arg470Gln	3	1
MYBPC3	c.1458-1G>A		5	1
MYBPC3	c.1483C>T	p.Arg495Trp	3	1
MYBPC3	c.1505G>A	p.Arg502Gln	5	9
MYBPC3	c.1591G>C	p.Gly531Arg	3-4	6
MYBPC3	c.1624+4A>T		4	1
MYBPC3	c.1624G>C	p.Glu542Gln	4	2
MYBPC3	c.1813G>C	p.Lys605His	3	3
MYBPC3	c.194C>T	p.Thr65Met	3	1
MYBPC3	c.2030C>T	p.Pro677Leu	4	1
MYBPC3	c.2182G>T	p.Glu728*	5	1
MYBPC3	c.2198G>A	p.Arg733His	3	1
MYBPC3	c.2258dupT	p.Lys754Glu*79	5	2

MYBPC3	c.2308G>A	p.Asp770Asn	4-5	5
MYBPC3	c.2309-2A>G		4-5	9
MYBPC3	c.2311 G>A	p.Val771Met	4	1
MYBPC3	c.2429G>A	p.Arg810His	4-5	3
MYBPC3	c.2435G>A	p.Tyr818*	5	1
MYBPC3	c.2459G>A	p. Arg820Gln	4	2
MYBPC3	c.2689_2690insCCTG GCTCTGGCTACAG CA	p.Gly897Alafs*160	4	1
MYBPC3	c.2717T>G	p.Val906Gly	5	1
MYBPC3	c.275_276	p.Leu92Glnfs*20	4	1
MYBPC3	c.2827C>T	p.Arg943*	5	1
MYBPC3	c.2846dup	p.Met949lfs*102	4	2
MYBPC3	c.2870C>G	p.Thr957Ser	3	1
MYBPC3	c.2905+1G>A		4	1
MYBPC3	c.2905C>T	p.Gln969*	5	1
MYBPC3	c.3034C>T	p.Gln1012*	5	4
MYBPC3	c.3192dupC	p.Lys1065Glnfs*12	5	8
MYBPC3	c.3251 T>C	p.Leu1084Pro	4	2
MYBPC3	c.3284C>T	p.Thr1095Met	3	1
MYBPC3	c.3357C>A	p.Tyr1119*	4	1
MYBPC3	c.3364A>T	p.Thr112Ser	4	1
MYBPC3	c.3450_3451delAG	p.Arg1150Serfs*18	4	2
MYBPC3	c.3535G>A	p.Glu1179Lys	3	1
MYBPC3	c.3614G>C	p.Arg1205Pro	3	1
MYBPC3	c.3617delG	p.Gly1206Valfs*31	5	1
MYBPC3	c.3636T>G	p.Ile1212Met	4	1
MYBPC3	c.3697C>T	p.Gln1233*	4-5	1
MYBPC3	c.3775C>T	p.Gln1259*	5	2
MYBPC3	c.442G>A	p.Gly148Arg	3	3
MYBPC3	c.553A>T	p.Lys185*	5	1
MYBPC3	c.565G>A	p.Val189Ile	3	4
MYBPC3	c.659_662del	p.Tyr220Cysfs*79	5	1

MYBPC3	c.67G>A	p.Ala23Thr	3	1
MYBPC3	c.772G>A	p.Glu258Lys	5	6
MYBPC3	c.787G>A	p.Gly263Arg	4	1
MYBPC3	c.821+1G>A		5	1
MYBPC3	c.906-7G>T		3	1
MYBPC3	c.913_914del	p.Phe305Profs*27	5	1
MYBPC3	IVS17-2G>A		4	1
MYBPC3	IVS23-2A>G		4	3
MYBPC3		p.Ala898Leufs*159	4	2
MYBPC3		p.His64Arg	3	2
MYH6	c.611G>A	p.Arg204His	3	1
MYH6	c.3541G>A	p.Glu1181Lys	4	1
MYH6	c.4650+10G>T		3	1
MYH6	c.5407G>C	p.Glu1803Gln	4	1
MYH6	c.3872G>A	p.Arg1291Gln	3	1
MYH6	c.2425C>T	p.Arg809Cys	4	1
MYH6	c.1763A>C	p.Asp588Ala	3	1
MYH6	c.2430-14C>T		3	1
MYH6	c.5645G>A	p.Arg1882His	3	1
MYH6	c.2039G>A	p.Arg680Glu	3	1
MYH7	c.3274G>A	p.Ala1092Thr	3	1
MYH7	c.428G>A	p.Arg143Gln	5	2
MYH7	c.1987 C>T	p.Arg663Cys	5	1
MYH7	c.1231A>G	p.Asn444Ser	4	1
MYH7	c.1376T>C	p.Val459Ala	3	1
MYH7	c.1549C>A	p.Leu517Met	3	4
MYH7	c.1615A>C	p.Met539Leu	4	4
MYH7	c.161G>A	p.Arg54Gln	4	1
MYH7	c.1816G>A	p.Val606Met	5	5
MYH7	c.1987C>A	p.Arg663Ser	5	1
MYH7	c.1988G>A	p.Arg663His	5	3
MYH7	c.2081G>A	p.Arg694His	3-4	2

MYH7	c.2146G>A	p.Gly716Arg	5	3
MYH7	c.2155C>T	p.Arg719Trp	5	2
MYH7	c.2156G>A	p.Arg719Gln	5	2
MYH7	c.2167C>T	p.Arg723Cys	5	4
MYH7	c.2207T>C	p.Ile736Thr	4	2
MYH7	c.2389G>A	p.Ala797Thr	4	2
MYH7	c.2539_2541delAAG	p.Lys847del	5	2
MYH7	c.2606G>A	p.Arg869His	4	3
MYH7	c.2650A>T	p.Lys884*	4	1
MYH7	c.2779G>A	p.Glu927Lys	4	1
MYH7	c.2788G>C	p.Glu930Gln	4	2
MYH7	c.2795T>A	p.Met932Lys	3	1
MYH7	c.2804A>T	p.Glu935Val	4	1
MYH7	c.2828T>C	p.Leu943Pro	3	1
MYH7	c.2923-5G>A		3	1
MYH7	c.3133C>T	p.Arg1045Cys	4	2
MYH7	c.3301G>A	p.Gly1101Ser	3	1
MYH7	c.3367G>C	p.Glu1123Gln	4	1
MYH7	c.3973G>A	p.Ala1325Thr	4	1
MYH7	c.4066G>A	p.Glu1356Lys	4	1
MYH7	c.4259G>A	p.Arg1420Gln	4	2
MYH7	c.4402G>A	p.Glu1468Lys	4	1
MYH7	c.4954 G>T	p.Asp1652Tyr	4	1
MYH7	c.676G>A	p.Ala226Thr	4	1
MYH7	c.925G>A	p.Asp309Asn	4	1
MYH7		p.Glu846Lys	4	3
MYL2	c.401A>C	p.Glu134Ala	4	2
MYL3	c.170C>A	p.Ala57Asp	3	1
MYL3	c.532G>A	p.Asp178Asn	4	1
PKP2	c.1759G>A	p.Val587Ile	3	1
PRKAG2	c.1471G>C	p.Asp491His	3	1
RBM20	c.3373G>A	p.Glu1125Lys	3	1

RBM20	c.680G>T	p.Gly227Val	3	1
SCN5A	c.125G>A	p.Ser42Asn	3	1
SCN5A	c.3539C>T	p.Ala1180Val	3	1
SCN5A	c.2077C>T	p.Arg693Cys	3	1
SGCD	c.290G>A	p.Arg97Gln	3	2
TMP1	c.82G>C	p.Asp28His	3	1
TNNI3	c.-8G>A		3	1
TNNI3	c.386C>G	p.Thr129Ser	3	1
TNNI3	c.428C>A	p.Thr143Asn	3	2
TNNI3	c.431T>A	p.Leu144Gln	5	6
TNNI3	c.549G>T	p.Lys183Asn	4	6
TNNI3	c.557G>A	p.Arg186Gln	5	3
TNNI3	c.592C>G	p.Leu198Val	4	4
TNNT2	c.251G>C	p.Arg84Thr	4	2
TNNT2	c.330T>G	p.Phe120Leu	3	1
TNNT2	c.52+12C>T		3	1
TNNT2	c.785A>T	p.Asn262Ile	3	1
TNNT2	c.794A>T	p.Lys265Ile	4	1
TNNT2	c.832C>T	p.Arg278Cys	3	1
TNNT2	c.83C>T	p.Ala28Val	3	1
TNNT2	c.853C>T	p.Arg285Cys	4	1
VCL	c.136G>A	p.Ala46Thr	4	2

^Classificazione: 1 mutazione benigna, 2 mutazione probabilmente benigna, 3 mutazione di incerto significato, 4 mutazione probabilmente patogenetica, 5 mutazione patogenetica.

3.3 Analisi di confronto fra i pazienti genotipo-positivo, genotipo-negativo e portatori di VUS

L'analisi di confronto fra i pazienti "genotipo negativo" (G-, n= 92), i pazienti "genotipo positivo" (G+, n=182) e i pazienti portatori di una mutazione di incerto significato (VUS, n= 43) è illustrata nella tabella 4.

Come si nota, i pazienti G+ presentavano un'età inferiore sia alla diagnosi ($p<0.001$), sia alla prima visita ($p=0.000$), e avevano più spesso una storia familiare positiva per CMPI ($p<0.001$) e morte cardiaca improvvisa ($p=0.037$). Questi pazienti erano più spesso portatori di defibrillatore già alla prima valutazione ($p=0.049$) e vi era una tendenza verso una maggiore prevalenza di forme end-stage ($p=0.08$). Viceversa, i pazienti G- alla prima visita presentavano un'età più avanzata, maggiori comorbidità, come ipertensione arteriosa ($p<0.001$) e diabete mellito ($p=0.002$), e proprio per questo erano più spesso in terapia con ACE-inibitori o sartani. Nel gruppo G- si nota inoltre una maggiore prevalenza di forme ostruttive ($p=0.001$) e di CMPI apicale ($p=0.0018$).

Dal punto di vista ecocardiografico, non sono state evidenziate differenze in termini di spessore parietale massimo fra i tre gruppi, mentre si nota che i pazienti G+ tendono ad avere una frazione d'eiezione inferiore ($p=0.025$) e i pazienti G- avevano invece valori di gradiente all'efflusso ventricolare sinistro più alti ($p<0.001$), dato che appare in linea con la maggior prevalenza di forme ostruttive in questo gruppo.

Per quanto riguarda la capacità funzionale, i pazienti G+ presentavano una ridotta tolleranza allo sforzo come documentato da valori inferiori di peak $VO_2\%$ e $CP\%*mmHg$, inoltre presentavano un minor incremento della pressione arteriosa con l'esercizio sia in termini di SBP di picco sia di ΔSBP . Non è stata riscontrata una differenza significativa fra i tre gruppi nei valori di VE/VCO_2 , ma è importante sottolineare come i pazienti G+ fossero significativamente più giovani rispetto a quelli portatori di VUS o G-, pertanto i valori di VE/VCO_2 nei pazienti G+ sarebbero dovuti essere più bassi, ciò a sottolineare come anche in termini di efficienza ventilatoria questo gruppo sia più compromesso.

Il gruppo di pazienti portatori di VUS presentavano caratteristiche intermedie fra i gruppi G+ e G-.

Tabella 4. Confronto fra i pazienti G+, G- e portatori di VUS

Caratteristiche generali	Mutazione Sarcomerica			P (G+ vs G-)	P (VUS vs G-)	P
	G+ (n: 182)	G- (n: 92)	VUS (n:43)			
Età alla diagnosi, anni	34±18	50±20	42 ±19	0.000	0.026	<0.001
Età alla prima visita, anni	45±17	56±17	50±16	0.000	0.014	0.000
Sesso maschile, n (%)	113 (62,1)	58 (63)	27 (62,8)	0.877	0.977	0.987
BMI, kg/m2	25±4	27±14	26±4	0.022	0.50	0.073
BSA, m2	1,8±0,2	1,9±0,2	1,89±0.22	0.154	0.851	0.302
Familiarità per CMPI, n (%)	128 (70,3)	14 (15,4)	20 (46,5)	0.000	0.000	<0.001
NYHA, n (%):						
I	81 (44,5)	35 (38)	19 (44,2)	0.587		0.286
II	86(47,3)	49 (53)	24 (55,8)			
III	15 (8,2)	8 (8,7)	0 (0)			
NYHA III/IV, n (%):	15 (8,2)	8 (8,7)	0 (0)	0.898	0.055	0.142
LVOTO, n (%)	42 (23,1)	41 (44,6)	17 (39,5)	0.000	0.582	0.001
CMPI apicale, n (%)	7 (3,8)	12 (13)	4 (9,3)	0.005	0.531	0.018
End-stage, n (%)	23 (12,6)	5 (5,4)	2 (4,7)	0.063	1	0.08
ICD, n (%)	28 (15,5)	7 (7,6)	2 (4,7)	0.066	0.718	0.049
Pregressa miectomia, n (%)	9 (4,9)	2 (2,2)	2 (4,7)	0.345	0.592	0.540
Fibrillazione atriale, n (%)	8 (4,4)	1 (1,1)	2 (4,7)	0.280	0.238	0.563
Ipertensione, n (%)	26 (14,3)	48 (52,2)	16 (37,2)	0.000	0.105	<0.001
Diabete, n (%)	4 (2,2)	11 (12)	1 (2,3)	0.001	0.103	0.002
CAD, n (%)	6 (3,3)	6 (6,5)	0 (0)	0.218	0.176	0.157
Fattori di rischio per SCD						
TVNS, n (%)	66 (36,3)	30 (33,3)	11 (25,6)	0.634	0.365	0.408
Familiarità per SCD, n (%)	33 (18,1)	6 (6,6)	6 (14,0)	0.010	0.199	0.037
MWT > 30 mm, n (%)	15 (8,2)	6 (6,5)	3 (7)	0.613	0.921	0.868
Sincope, n (%)	27 (14,8)	13 (14,1)	10 (23,3)	0.876	0.189	0.347
ABPRE, n (%)	38/145 (26,2)	11/61 (18)	6 (17,6)	0.208	0.962	0.325
LGE, n (%)	95/131 (72,5)	36/58 (62,1)	17/29 (58,6)	0.151	0.756	0.189

Ecocardiogramma						
MWT, mm	20±5	19±4	20,4±6	0.228	0.474	0.277
LVEDd, mm	45±5	46±4	45,5± 5	0.260	0.571	0.691
LAd, mm	43±7	44±6	43.6±8	0.127	0.616	0.545
LVOTG _{max} , mm Hg	18±24	32±31	29±32	0.000	0.804	<0.001
LVEF, %	60±6	62±4	62±4	0.055	0.753	0.025
Terapia						
Beta-bloccanti, n (%)	112 (61,5)	56 (60,9)	24 (55,8)	0.915	0.578	0.786
Calcio-antagonisti, n (%)	16 (8,8)	9 (9,9)	3 (7)	0.767	0.751	0.857
Diuretici, n (%)	39 (21,4)	21 (22,8)	6 (14)	0.792	0.230	0.473
ACEI/ARBs, n (%)	47 (25,8)	36 (39,1)	15 (34,9)	0.024	0.635	0.066
Disopiramide, n (%)	4 (2,2)	3 (3,3)	3 (7,0)	0.598	0.383	0.272
Amiodarone, n (%)	15 (8,2)	9 (9,8)	3 (7)	0.670	0.752	0.845

I dati sono espressi come media ± deviazione standard, o come numero di pazienti e percentuale sul numero totale. Per le abbreviazioni vedi Tabella 1.

Tabella 5. Confronto fra i pazienti G+, G- e portatori di VUS relativamente al CPET.

	Mutazione Sarcomerica			P (G+ vs G-)	P (VUS vs G-)	P
	G+ (n: 147)	G- (n: 59)	VUS (n:35)			
CPET						
Peak WR, Watts	123±49	124±53	122±47	0.930	0.972	0.969
Peak SBP, mmHg	156±25	175±25	169±29	0.000	0.359	<0.001
ΔSBP, mm Hg	40±21	50±24	48±23	0.014	0.712	0.013
Peak HR, bpm	138±25	132±27	134±27	0.126	0.775	0.330
Peak HR, %	83±16	82±14	82±13	0.722	0.975	0.855
AT VO ₂ , ml/kg	15,3±4	15±4	14,9±4	0.634	0.907	0.876
Peak VO ₂ , ml/kg/min	23,3±7	23,4±7	23.2±7.2	0.937	0.931	0.991
Peak VO ₂ , %	75±19	83±19	78±18	0.005	0.273	0.015
CP, ml/kg/min*mm Hg	3699± 1434	4145± 1482	3924± 1413	0.056	0.529	0.127
CP%, % *mm Hg	11903± 4227	14806±4604	13353± 4087	0.000	0.103	<0.001

VO ₂ /WR slope, ml/watt	10,6±1,5	11±1,4	11±1	0.067	0.734	0.166
VE/VCO ₂ slope	29±6	28±4	28.6±4.4	0.941	0.587	0.806

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. Per le abbreviazioni vedi Tabella 2.

3.4 Analisi di confronto fra i pazienti con mutazione singola/mutazioni multiple e con mutazioni a carico dei filamenti sottili/filamenti spessi

L'analisi di confronto fra pazienti portatori di una singola mutazione e quelli portatori di due o più mutazioni non ha evidenziato differenze significative fra i due gruppi, probabilmente a causa della scarsa numerosità campionaria del secondo gruppo (dati non mostrati).

Abbiamo poi confrontato i pazienti con mutazioni a carico di geni che codificano per i filamenti spessi del sarcomero (MYBPC3, MHY7, MYL2) e quelli con mutazioni a carico di geni che codificano per i filamenti sottili (TNNT3, TNNT2, ACTC1, TMP1) (Tabella 6). In linea con quanto già riportato dal gruppo di Olivotto, i pazienti portatori di mutazioni a carico dei filamenti sottili presentavano una forma di CMPI caratterizzata da minori spessori, un atrio sinistro più grande e minore FE. In questo gruppo, in cui si nota una prevalenza del sesso femminile, i pazienti presentavano più spesso una storia familiare di CMPI e morte cardiaca improvvisa. Inoltre, i pazienti con mutazioni dei filamenti sottili presentavano più spesso una forma end-stage di malattia, sintomi avanzati di scompenso cardiaco (classe NYHA III/IV) e fibrillazione atriale, ed erano più spesso in trattamento con farmaci calcio-antagonisti, amiodarone e diuretici. Nel gruppo di pazienti con mutazioni dei geni MYBPC3, MHY7, MYL2, invece, i pazienti presentavano una forma di CMPI con maggiori spessori parietali, vi era una maggiore prevalenza di forme massive e ostruttive di CMPI ed i pazienti presentavano più frequentemente episodi di TVNS. Dall'analisi della capacità funzionale al CPET non sono emerse differenze significative fra i due gruppi, anche se si nota una tendenza del gruppo di pazienti con mutazioni dei filamenti sottili a presentare uno scarso incremento pressorio durante sforzo (Tabella 7).

Tabella 6. Confronto fra pazienti con mutazioni a carico di geni che codificano per i filamenti spessi del sarcomero (MYBPC3, MHY7, MYL2) e quelli con mutazioni a carico di geni che codificano per i filamenti sottili (TNNT2, TNNT3, ACTC1, TMP1).

Caratteristiche generali	Mutazione Sarcomerica		P
	Filamenti spessi (n: 153)	Filamenti sottili (n: 24)	
Età alla diagnosi, anni	34,7±18	27,8±15	0.075
Età alla prima visita, anni	45,8±17	40,2±15	0.101
Sesso maschile, n (%)	103 (67,3)	10 (41,7)	0.015
BMI, kg/m ²	25,6±4,3	23,2±3	0.01
BSA, m ²	1,8±0,2	1,7±0,2	0.023
Familiarità per CMPI, n (%)	102 (66,7)	23 (95,8)	0.004
NYHA III/IV, n (%):	9 (5,9)	6 (25)	0.007
LVOTO, n (%)	40 (26,1)	1 (4,2)	0.018
CMPI apicale, n (%)	5 (3,3)	1 (4,2)	0.588
End-stage, n (%)	14 (9,2)	8 (33,3)	0.003
ICD, n (%)	23 (15)	4 (16,7)	0.786
Pregressa miectomia, n (%)	9 (5,9)	0	0.612
Fibrillazione atriale, n (%)	5 (3,3)	3 (12,5)	0.078
Ipertensione, n (%)	24 (15,7)	0	0.048
Diabete, n (%)	4 (2,6)	0	1.00
CAD, n (%)	6(3,9)	0	1.00
Fattori di rischio per SCD			
TVNS, n (%)	61 (40)	4 (16,7)	0.039
Familiarità per SCD, n (%)	21 (13,7)	10 (41,7)	0.002
MWT > 30 mm, n (%)	15 (9,8)	0	0.228
Sincope, n (%)	22 (14,4)	4 (16,7)	0.759
ABPRE, n (%)	29 (23,2)	8 (47,1)	0.073
LGE, n (%)	85/114 (74,6)	10/15 (66,7)	0.539
Ecocardiogramma			
MWT, mm	20,8±5	17,2±4	0.001
LVEDd, mm	45,2±6	46,6±5	0.275

LAd, mm	43,2±6	44,5±8,7	0.881
LVOTG _{max} , mm Hg	20±25	6±2	0.001
LVEF, %	61±6	58±6	0.01
Terapia			
Beta-bloccanti, n (%)	99 (64,7)	11 (45,8)	0.076
Calcio-antagonisti, n (%)	12 (7,8)	4 (16,7)	0.240
ACEI/ARBs, n (%)	41 (26,8)	3 (12,5)	0.132
Diuretici, n (%)	28 (18,3)	9 (37,5)	0.032
Disopiramide, n (%)	4 (2,6)	0	1.00
Amiodarone, n (%)	10 (6,5)	5 (20,8)	0.035

I dati sono espressi come media ± deviazione standard, o come numero di pazienti e percentuale sul numero totale. Per le abbreviazioni vedi Tabella 1.

Tabella 7. Confronto fra pazienti con mutazioni a carico di geni che codificano per i filamenti spessi del sarcomero (MYBPC3, MHY7, MYL2) e quelli con mutazioni a carico di geni che codificano per i filamenti sottili (TNNT2, TNNT3, ACTC1, TMP1) relativamente al CPET.

CPET	Mutazione Sarcomerica		P value
	Filamenti spessi (n: 128)	Filamenti sottili (n: 16)	
Peak WR, Watts	124±47	120±63	0.753
Peak VO ₂ , ml/kg/min	23,3±7	23,9±9	0.773
Peak VO ₂ , %	75±19	73±20	0.587
CP, ml/kg/min*mm Hg	3731±1387	3560±1882	0.309
CP%, % *mm Hg	12053±4226	10886±4250	0.283
VE/VCO ₂ slope	29±6	30±7	0.707
Peak HR, bpm	137±26	143±24	0.407
Peak HR, %	83±17	83±12	0.434
Peak SBP, mmHg	158±24	145±31	0.06
ΔSBP, mm Hg	42±21	35±26	0.261
VO ₂ /WR slope, ml/watt	10,6±1,5	10,4±1,9	0.623

I dati sono espressi come media ± deviazione standard. Per le abbreviazioni vedi Tabella 2.

3.4 Analisi degli end-points

I pazienti sono stati seguiti per un tempo medio di 5,3±4,4 anni con una mediana di 5,1 anni [IQR 1,7-7,7]. Nel corso del follow-up 43 pazienti hanno raggiunto l'end-point "scompenso cardiaco": in particolare, due pazienti sono deceduti per scompenso cardiaco, 7 pazienti sono stati sottoposti a trapianto cardiaco, un paziente è stato inserito in lista per trapianto di cuore, 11 pazienti hanno presentato un'evoluzione end-stage della malattia, 4 pazienti sono stati sottoposti a miectomia per progressione dei sintomi e 18 pazienti sono stati ricoverati per scompenso cardiaco. Diciannove pazienti hanno raggiunto l'end-point "morte cardiaca improvvisa": in particolare si sono verificati 3 decessi per morte cardiaca improvvisa, un arresto cardiaco rianimato e 15 interventi appropriati del defibrillatore (di cui 8 anti-tachycardia pacing e 7 shock appropriati su fibrillazione ventricolare o tachicardia ventricolare rapida con FC >180 bpm). Considerando l'end-point combinato, questo è stato raggiunto da 53 pazienti (16,5% della popolazione di studio).

Ad un prima analisi di confronto, il gruppo G+ presentava una maggiore prevalenza di SCD e end-point combinato rispetto al gruppo G- (rispettivamente p=0.017 e p=0.044), mentre non vi era una differenza statisticamente significativa fra i tre gruppi o fra i paziente G+ e quelli G- per l'end-point scompenso cardiaco (Tabella 8). Non abbiamo riscontrato differenze significative in termini di outcome fra i pazienti portatori di mutazioni a carico dei filamenti sottili o dei filamenti spessi.

Tabella 8. Dati clinici di follow-up nella popolazione di studio, suddivisa in base al genotipo

End-points	Popolazione totale (n: 317)	Mutazione Sarcomerica			P (G+ vs G-)	P (VUS vs G-)	P
		G+ (n: 182)	G- (n: 92)	VUS (n:43)			
Scompenso cardiaco, n (%)	43 (13,5)	27 (14,8)	8 (8,7)	8 (18,6)	0.150	0.097	0.218
SCD o equivalenti, n (%)	19 (5,9)	15 (8,2)	1 (1,1)	3 (7)	0.017	0.095	0.060
End-point combinato, n (%)	53 (16,7)	35 (19,2)	9 (9,8)	9 (20,9)	0.044	0.076	0.103

Tabella 8. Analisi univariata per l'end-point "scompenso cardiaco".

	End-point scompenso cardiaco (n: 43)		
	H.R. (95% C.I.)	P	C-index
Sesso maschile	0.684 (0.371-1.261)	0.224	0.605
Età alla diagnosi	1.013 (0.997-1.029)	0.111	0.581
Età alla prima visita	1.026 (1.007-1.046)	0.007	0.613
FH-CMPI	1.281 (0.632-2.593)	0.492	0.536
FH-SCD	1.48 (0.765-2.862)	0.244	0.539
Sincope	1.49 (0.748-2.992)	0.263	0.525
TVNS	1.486 (0.789-2.768)	0.211	0.530
ABPRE	^{oo} 2.337 (1.109-4.924)	0.025	0.639
MWT > 30 mm	0.409 (0.125-1.333)	0.138	0.550
LVOTO	1.551 (0.808-2.977)	0.187	0.527
NYHA III/IV	2.23 (0.870-5.729)	0.095	0.572
End-stage	2.884 (0.997-8.341)	0.051	
MWT, mm	0.996 (0.946-1.049)	0.892	0.498
LVEDd, mm	1.094 (1.031-1.161)	0.003	0.598
LVEF, %	0.906 (0.871-0.943)	0.000	0.641
LAd, mm	1.093 (1.048-1.141)	0.000	0.719
LVOTG _{max} , mmHg	1.007 (0.997-1.018)	0.152	0.508

^{oo} su 30 eventi. Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza; FH: storia familiare; per le altre vedi Tabella 1.

Tabella 9. Analisi univariata per l'end-point "scompenso cardiaco" relativamente alle variabili ottenute al CPET.

	End-point scompenso cardiaco (n: 26)		
	H.R. (95% C.I.)	P	C-index
Peak VO ₂ , ml/min	0.9988 (0.998-0.9996)	0.004	0.732
Peak VO ₂ , ml/kg/min	0.862 (0.795-0.936)	0.000	0.738
Peak VO ₂ , %	0.963 (0.939-0.988)	0.004	0.680
CP%, %*mmHg	0.9998 (0.9997-0.9999)	0.001	0.734
CP, ml/kg/min*mmHg	0.9991 (0.9986-0.9996)	0.000	0.786
Peak HR, bpm	0.979 (0.964-0.995)	0.011	0.677
VE/VCO ₂ slope	1.08 (1.031-1.131)	0.001	0.704
SBP peak, mmHg	0.984 (0.971-997)	0.015	0.725
ΔSBP, mmHg	0.973 (0.956-0.991)	0.003	0.735

Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza, per le altre vedi Tabella 2.

Tabella 10. Analisi univariata per l'end-point “morte cardiaca improvvisa”.

	End-point SCD (n: 19)		
	H.R. (95% C.I.)	P	C-index
Sesso maschile	1.193 (0.460-3.093)	0.717	0.484
Età alla diagnosi	0.963 (0.933-0.994)	0.021	0.686
Età alla prima visita	0.987 (0.960-1.015)	0.370	0.592
FH-HCM	2.437 (0.695-8.532)	0.164	0.623
FH-SCD	1.49 (0.547-4.056)	0.435	0.542
Sincope	1.228 (0.394-3.828)	0.723	0.456
TVNS	1.594 (0.604-4.202)	0.346	0.503
ABPRE	#0.72 (0.200-2.593)	0.616	0.515
MWT > 30 mm	2.153 (0.746-6.212)	0.156	0.508
LVOTO	0.628 (0.180-2.191)	0.466	0.572
NYHA III/IV	2.12 (0.482-9,252)	0.321	0.547
End-stage	4.573 (2.343-8.926)	0.000	
MWT, mm	1.074 (1-1.153)	0.049	0.569
LVEDd, mm	0.948 (0.866-1.038)	0.25	0.572
LVEF, %	0.951 (0.878-1.031)	0.223	0.497
LAd, mm	1.051 (0.985-1.121)	0.134	0.556
LVOTG _{max} , mm Hg	0.989 (0.963-1.015)	0.408	0.556

su 14 eventi. Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza; FH: storia familiare; per le altre vedi Tabella 1.

Tabella 11. Analisi univariata per l'end-point “morte cardiaca improvvisa” relativamente alle variabili ottenute al CPET.

	End-point SCD (n: 14)		
	H.R. (95% C.I.)	P	C-index
Peak VO ₂ , ml/min	0.9998 (0.9988-1.001)	0.599	0.509
Peak VO ₂ , ml/kg/min	0.942 (0.862-1.029)	0.188	0.547
Peak VO ₂ , %	0.959 (0.925-0.995)	0.026	0.658
CP%, %*mmHg	0.9998 (0.9996-1)	0.015	0.689
CP, ml/kg/min* mmHg	0.9995 (0.999-1)	0.062	0.624
Peak HR, bpm	0.993 (0.973-1.013)	0.494	0.531
VE/VCO ₂ slope	1.031 (0.954-1.114)	0.435	0.578
SBP peak, mmHg	0.985 (0.967-1.003)	0.1	0.640
ΔSBP, mmHg	0.987 (0.965-1.011)	0.282	0.600

Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza, per le altre vedi Tabella 2

Tabella 12. Analisi univariata per l'end-point combinato.

	End-point combinato (n: 53)		
	H.R. (95% C.I.)	P	C-index
Sesso maschile	0.693 (0.400-1.2)	0.191	0.591
Età alla diagnosi	1.003 (0.989-1.018)	0.660	0.512
Età alla prima visita	1.015 (0.998-1.032)	0.079	0.557
FH-HCM	1.407 (0.741-2.671)	0.296	0.558
FH-SCD	1.466 (0.808-2.656)	0.208	0.531
Sincope	1.16 (0.591-2.276)	0.665	0.500
TVNS	1.413 (0.811-2.462)	0.223	0.519
ABPRE	*1.943 (0.998-3.779)	0.05	0.598
MWT > 30 mm	0.834 (0.373-1.868)	0.66	0.529
LVOTO	1.24 (0.676-2.275)	0.487	0.500
NYHA III/IV	2,55 (1.142-5.960)	0.022	0.576
End-stage	3.524 (1.906-6.519)	0.000	
MWT, mm	1.027 (0.983-1.073)	0.224	0.539
LVEDd, mm	1.051 (0.996-1.11)	0.069	0.554
LVEF, %	0.919 (0.884-0.954)	0.000	0.586
LAd, mm	1.064 (1.025-1.105)	0.001	0.643
LVOTG _{max} , mm Hg	1.004 (0.994-1.014)	0.398	0.484

* su 38 eventi. Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza; FH: storia familiare; per le altre vedi Tabella 1.

Tabella 13. Analisi univariata per l'end-point combinato relativamente alle variabili ottenute al CPET.

	End-point combinato (n: 34)		
	H.R. (95% C.I.)	P	C-index
peakVO ₂ , ml/min	0.9991 (0.9984-0.9997)	0.005	0.667
Peak VO ₂ , ml/kg/min	0.890 (0.833-0.951)	0.000	0.677
Peak VO ₂ , %	0.964 (0.943-0.986)	0.001	0.664
CP%, %*mmHg	0.9998 (0.9997-0.9999)	0.000	0.718
CP, ml/kg/min* mm Hg	0.9992 (0.9988-0.9996)	0.000	0.735
Peak HR, bpm	0.983 (0.969-0.996)	0.013	0.628
VE/VCO ₂ slope	1.064 (1.02-1.11)	0.003	0.654
SBP peak, mmHg	0.983 (0.972-0.995)	0.004	0.707
ΔSBP, mmHg	0.976 (0.961-0.992)	0.003	0.698

Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza, per le altre vedi Tabella 2.

L'analisi univariata per la ricerca delle variabili associate all'end-point "scompenso cardiaco", (Tabelle 8 e 9), ha dimostrato che l'età alla prima valutazione, la frazione d'eiezione, il diametro atriale sinistro e il diametro telediastolico del ventricolo sinistro correlano con l'outcome, così come la maggior parte delle variabili ottenute dal CPET. All'analisi univariata per la ricerca delle variabili associate all'end-point "morte cardiaca improvvisa" (Tabelle 11 e 12), invece, le variabili che correlavano con questo end-point sono state l'età alla diagnosi, la presenza di una forma end-stage di CMPI, lo spessore massimo espresso come variabile quantitativa, il picco di VO2% e il CP%. Infine, l'analisi univariata per la ricerca delle variabili associate all'end-point "combinato" (Tabelle 13 e 14) ha dimostrato che la classe funzionale NYHAIII/IV, la presenza di una forma end-stage di malattia, la frazione d'eiezione, il diametro atriale sinistro, lo scarso incremento pressorio da sforzo e tutti i parametri ottenuti dal CPET correlano con l'end-point combinato.

Tabella 15. Analisi multivariata per i tre end-points relativamente al dato genetico.

	End-point scompenso cardiaco (n: 43)			End-point SCD (n: 19)			End-point combinato (n: 53)		
	H.R. (95% C.I.)	P	C- index	H.R. (95% C.I.)	P	C- index	H.R. (95% C.I.)	P	C-index
G+	0.843 (0.377-1.883)	0.677	0.488	3.670 (0.478-28.13)	0.211	0.585	0.993 (0.472-2.087)	0.986	0.481
VUS	1.422 (0.531-3.813)	0.483		4.183 (0.434-40.32)	0.216		1.415 (0.559-3.583)	0.463	
Mutazione singola	0.994 (0.450-2.197)	0.989	0.482	4.203 (0.551-32.05)	0.166	0.604	1.114 (0.532-2.331)	0.774	0.530
Mutazioni multiple	0.717 (0.233-2.207)	0.562		2.164 (0.195-23.93)	0.529		0.866 (0.321-2.339)	0.778	
Mutazioni filamenti sottili	§ 0.442 (0.195- 0.998)	0.049	0.574	*0.977 (0.218-4.375)	0.976	0.527	**0.585 (0.266-1.286)	0.182	0.546

§ su 33 eventi; * su 16 eventi; ** su 40 eventi. Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza.

All'analisi multivariata, la presenza di una mutazione di significato patogenetico o probabilmente patogenetico non è risultata un fattore indipendente di eventi avversi (SCD, scompenso cardiaco o end-point combinato), così come la presenza di mutazioni multiple (Tabella 15). Una debole correlazione è emersa fra la presenza di una mutazione a carico di filamenti sottili ed il rischio di scompenso cardiaco (Tabella 15), ma va considerato che nel gruppo di pazienti con mutazioni dei filamenti sottili vi era una maggiore prevalenza di forme end-stage, il che può ovviamente influire su tale risultato.

L'analisi multivariata con la valutazione di variabili cliniche e funzionali ha invece dimostrato una forte correlazione del CP% con tutti e tre gli end-points. Per quanto riguarda l'end-point scompenso cardiaco anche l'età alla prima valutazione rimane significativamente associata all'end-point (Tabella 16).

Tabella 15. Analisi multivariata per i tre end-points relativamente ai dati clinici e strumentali.

	Multivariate Cox Proportional Survival Analysis			Proportional Hazards Assumption Test	
	H.R. (95% C.I.)	P values	C-index	χ^2	P values
End-point scompenso cardiaco (n: 26)					
Età alla prima valutazione, anni	1.056	0.003		0.609	0.435
LAd, mm	1.033	0.337		0.060	0.806
LVEF, %	1.004	0.989		0.286	0.593
CP%, % of predicted*mm Hg	0.999	0.000	0.795	0.033	0.854
End-point SCD (n: 14)					
Età alla diagnosi, anni	1.003	0.903		1.240	0.266
MWT, mm	1.033	0.499		0.71	0.400
CP%, % of predicted*mm Hg	0.999	0.048	0.696	1.25	0.263
End-point combinato (n: 34)					
NYHA III/IV	1.254	0.672		2.861	0.091
LAd, mm	1.047	0.059		0.817	0.366
LVEF, %	0.983	0.601		0.000	0.990
CP%, % of predicted*mm Hg	0.999	0.002	0.731	0.032	0.858

Abbreviazioni: H.R.: hazard ratio; C.I. : intervallo di confidenza, per le altre vedi Tabelle 1 e 2.

Capitolo IV

Discussione

Il nostro studio dimostra che i pazienti affetti da CMPI portatori di una mutazione sarcomerica patogenetica o probabilmente patogenetica sono più giovani e presentano forme più aggressive di malattia, associate ad una maggiore compromissione della capacità funzionale. Inoltre, la presenza di una mutazione a carico dei filamenti sottili si associa ad un fenotipo caratteristico, differente rispetto a quello dei pazienti portatori di mutazioni a carico dei filamenti spessi. Tuttavia, il genotipo non presenta una significativa rilevanza in termini di prognosi, a differenza dei dati clinici e soprattutto funzionali del singolo paziente. In particolare, dalla nostra analisi è emersa l'importanza del circulatory power come predittore di morte cardiaca improvvisa e scompenso cardiaco in questa categoria di pazienti.

La CMPI è una malattia caratterizzata da un'estrema variabilità genotipica, fenotipica e di decorso clinico. Se in molti casi la malattia ha un decorso benigno con un'aspettativa di vita pari a quella della popolazione generale [1,22-24], una piccola percentuale di pazienti può andare incontro a complicanze gravi come la morte cardiaca improvvisa e lo scompenso cardiaco. Negli ultimi anni, molti studi si sono concentrati sulla ricerca di variabili cliniche, strumentali e genetiche che potessero identificare quei pazienti a rischio di eventi avversi, aritmici e non, così da poter mettere in atto strategie di prevenzione mirate.

Ad oggi, sappiamo che alcune variabili cliniche come la storia familiare di morte cardiaca improvvisa, un episodio sincopale, la presenza di TVNS, un'ipertrofia massiva, lo scarso incremento della pressione arteriosa con lo sforzo, l'ostruzione al tratto di efflusso ventricolare sinistro e il diametro dell'atrio sinistro sono importanti fattori prognostici in questa malattia [53-54], ma c'è ancora molto da fare per quanto riguarda la stratificazione del rischio.

Molti studi hanno indagato il ruolo della genetica nella determinazione del fenotipo clinico ed, in particolare, il suo impatto sulla prognosi, tuttavia, ad oggi, non è stato possibile identificare una chiara correlazione fra genotipo e fenotipo.

Il nostro studio mostra la presenza di una mutazione patogenetica o probabilmente patogenetica nel 57,4% della nostra popolazione, mentre in un 13,5% dei pazienti è stata identificata una VUS. Come atteso, la percentuale di positività al test genetico è risultata molto maggiore nei familiari rispetto ai probandi (88% vs 50%). Nella maggior parte dei casi le mutazioni interessavano i geni MYBPC3 and MYH7. Dodici pazienti (6.5%) sono risultati portatori di due o più mutazioni. Questi dati sono in linea con la letteratura, è noto come, ancora oggi, nonostante l'avanzamento delle tecniche diagnostiche e del numero di geni studiati, circa un terzo dei pazienti sottoposti all'analisi genetica risulti negativo. Ciò può dipendere dal fatto che vi siano altri geni implicati in questa

malattia, non ancora noti, ma anche dalla possibilità che vi siano delle forme non genetiche di ipertrofia.

Dal punto di vista fenotipico, i pazienti G+ erano più giovani, avevano più spesso una storia familiare di CMPI e morte cardiaca improvvisa, e presentavano un fenotipo di malattia più aggressivo con una maggiore prevalenza di forme end-stage e un maggior numero di defibrillatori impiantati. Dal punto di vista funzionale, i pazienti G+, rispetto ai pazienti G-, nonostante fossero più giovani, presentavano una ridotta tolleranza allo sforzo e un minor incremento della pressione arteriosa con l'esercizio. Inoltre, nonostante la differenza di età con i pazienti G- e VUS, i valori di VE/VCO₂ risultavano simili fra i tre gruppi, il che vuol dire che anche in termini di efficienza ventilatoria i pazienti G+ erano più compromessi. Viceversa, i pazienti G- presentavano un'età più avanzata, erano più spesso affetti da comorbidità, come ipertensione arteriosa e diabete mellito, inoltre in questo gruppo vi era una maggiore prevalenza di forme ostruttive e di CMPI apicale. E' possibile che alcuni di questi pazienti siano affetti da forme di cardiopatia ipertrofico-ipertensiva, condizione che può porre spesso problemi di diagnosi differenziale con la CMPI sarcomerica [65,66]. Questa ipotesi potrebbe spiegare anche il dato della capacità funzionale: lo sforzo potrebbe infatti slantizzare i limiti di un miocardio "malato" caratterizzato dal disarray, dalla fibrosi e dalla malattia dei piccoli vasi nei pazienti con CMPI associata a mutazioni del sarcomero, mentre nei pazienti in cui l'ipertrofia sia legata a cause non genetiche, come ad esempio l'ipertensione, la capacità d'esercizio potrebbe risultare conservata nonostante un'età più avanzata.

I pazienti portatori di VUS presentavano invece caratteristiche intermedie fra i gruppi G+ e G-, il che può dipendere dal fatto che alcune di quelle mutazioni attualmente considerate di incerto significato sono realmente patogene, mentre altre verosimilmente sono benigne.

Probabilmente a causa della scarsa numerosità campionaria, non abbiamo riscontrato differenze significative fra i pazienti portatori di una singola mutazione e quelli portatori di due o più mutazioni. Mentre in linea con quanto già descritto in letteratura [45], i pazienti portatori di mutazioni a carico dei filamenti sottili presentavano una forma di CMPI caratterizzata da minori spessori, un atrio sinistro più grande, espressione di una più severa disfunzione diastolica, ed una frazione d'eiezione più bassa. Questi pazienti presentavano più spesso una forma end-stage di malattia, sintomi avanzati di scompenso cardiaco e fibrillazione atriale. Non sono emerse differenze significative fra i due gruppi in termini di capacità funzionale, ma è possibile che questo dato sia influenzato ancora una volta dalla scarsa numerosità del campione.

I nostri risultati, in linea con precedenti studi [35-37], supportano quindi l'ipotesi di una

correlazione fra genotipo e fenotipo, e per la prima volta abbiamo dimostrato come il genotipo influenzi in modo importante anche la capacità funzionale dei pazienti. Tuttavia all'analisi univariata e multivariata il dato genetico non correla in modo significativo con il rischio di morte cardiaca improvvisa e scompenso cardiaco. Ciò potrebbe dipendere dalle dimensioni del nostro campione e dal basso numero di eventi avversi riportati, ma anche dal fatto che il genotipo non è l'unico fattore in grado di influenzare il rischio di morte cardiaca improvvisa e scompenso cardiaco: come sappiamo la CMPI è una malattia a carattere evolutivo, ed è possibile che nel determinare l'evoluzione della malattia possano essere coinvolti anche fattori ambientali, ormonali, epigenetici e l'effetto di alcuni geni "modificatori" come quelli del sistema renina-angiotensina [35].

Ciò che emerge invece dalla nostra analisi è l'importanza del dato funzionale: il circulatory power risulta infatti un forte predittore indipendente di morte cardiaca improvvisa e di scompenso cardiaco. Il circulatory power è un indice dato dal prodotto del VO₂ di picco, espresso come percentuale del predetto per età, sesso e altezza, e della pressione arteriosa sistolica di picco [$CP\% = \text{peak VO}_2 (\% \text{ del predetto}) * \text{peak SBP (mmHg)}$]. Il VO₂ di picco, dato dal prodotto della massima differenza artero-venosa di ossigeno e della gittata cardiaca, è un indice che esprime la capacità funzionale del paziente e può essere espresso come ml/kg/min o come percentuale del predetto per età, sesso e altezza. In assenza di una patologia muscolare grave e/o in assenza di una marcata ipossiemia, si può assumere che la capacità di estrazione di ossigeno da parte del muscolo metabolicamente attivo sia relativamente costante e che quindi il VO₂ sia determinato principalmente dalla gittata cardiaca. Questo è il motivo per cui il VO₂ ha un indubbio valore prognostico in molte patologie cardiache, riflettendo in maniera diretta la riserva cardiovascolare del singolo paziente. Negli ultimi anni sono emerse numerose evidenze riguardo al ruolo prognostico del VO₂ di picco anche nella CMPI [50-51]. Per quanto riguarda la risposta pressoria durante l'esercizio, lo scarso incremento della pressione arteriosa con lo sforzo (definita come l'incapacità di aumentare la pressione arteriosa sistolica di almeno 20 mmHg durante lo sforzo o una caduta dei valori pressori di 20 mmHg all'apice dello sforzo) è tra i fattori che vengono valutati per la stratificazione del rischio aritmico nella CMPI [25,53-54]. Lo scarso incremento pressorio è infatti espressione di un calo inappropriato delle resistenze vascolari sistemiche o di un'incapacità ad incrementare la gittata cardiaca, che si può osservare nei pazienti con severa disfunzione diastolica [67].

Il circulatory power, racchiudendo entrambi questi fattori, acquista così un significativo potere predittivo sia per quanto riguarda il rischio di scompenso cardiaco sia riguardo al rischio di eventi aritmici. Il nostro gruppo aveva già dimostrato il ruolo predittivo del CP%, insieme al VE/VCO₂

slope e al diametro atriale sinistro, per un end-point composito di morte per scompenso cardiaco, trapianto di cuore, ospedalizzazione per scompenso cardiaco e progressione della classe funzionale a NYHA III-IV[52], mentre non era mai stata dimostrata la sua importanza nel predire il rischio di eventi aritmici.

Infine, occorre sottolineare come l'età alla prima valutazione risulti significativa nel predire il rischio di scompenso cardiaco. Molti studi già avevano dimostrato l'importanza dell'età nella stratificazione del rischio sia di morte cardiaca improvvisa che di scompenso cardiaco [39,56] ed è facile comprendere come una malattia con un esordio più precoce possa associarsi ad un più elevato tasso di complicanze.

Limiti dello studio

Il nostro è uno studio retrospettivo osservazionale monocentrico, con le inerenti limitazioni. Il numero relativamente piccolo di pazienti arruolati e lo scarso numero di eventi rappresentano un'ovvia limitazione. L'analisi genetica è stata condotta su una media di 13 geni, ma potrebbe essere estesa ad un pannello più ampio. Inoltre, non tutti i pazienti hanno potuto eseguire il CPET e la risonanza magnetica, riducendo ulteriormente il numero dei casi valutati per alcune analisi.

Conclusioni

In conclusione, dai dati del nostro studio emerge che i pazienti affetti da CMPI portatori di una mutazione sarcomerica patogenetica o probabilmente patogenetica, rispetto ai pazienti genotipo-negativo, sono più giovani e presentano forme più aggressive di malattia, associate ad una maggior compromissione della capacità funzionale. La presenza di una mutazione a carico dei filamenti sottili si associa ad un fenotipo caratteristico. Tuttavia, il genotipo non presenta una significativa rilevanza in termini di prognosi, a differenza dei dati clinici e soprattutto funzionali del singolo paziente. In particolare, è emerso come il circulatory power rappresenti un importante fattore predittivo di morte cardiaca improvvisa e di scompenso cardiaco.

Il nostro studio sottolinea l'importanza di una valutazione della capacità funzionale mediante test da sforzo cardiopolmonare in tutti i pazienti affetti da CMPI.

Saranno necessari ulteriori studi, su un campione più ampio di pazienti, per confermare i nostri risultati, e poter quindi implementare con il circulatory power le strategie di stratificazione del rischio aritmico e di scompenso cardiaco nei pazienti affetti da CMPI.

Bibliografia

- [1] Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2013;381:242-55.
- [2] Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004; 363: 1881-1891.
- [3] Ho CY, Charron P, Richiard P, et al. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: State of the art. *Cardiovasc. Res.* 2015; 105:397–408.
- [4] Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: Clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60:705–715.
- [5] Ho CY. Genetics and Clinical Destiny: Improving Care in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 2010;122;2430-2440
- [6] Girolami F, Bardi S, Berti L. Rilevanza clinica del test genetico nella cardiomiopatia ipertrofica. *Recenti Prog Med* 2011; 102: 486-493
- [7] Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 2011;9(2):91-100.
- [8] 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.
- [9] Rubattu S, Bozzao C, Pennacchini E et al. A Next-Generation Sequencing Approach to Identify Gene Mutations in Early- and Late-Onset Hypertrophic Cardiomyopathy Patients of an Italian Cohort. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8).
- [10] Klues HG, Schiff ers A, Maron BJ. Phenotypic spectrum and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: morphologic observations and significance as assessed by two-dimensional echocardiography in 600 patients. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1699–708.
- [11] Maron MS, Maron BJ, Harrigan C, et al. Hypertrophic cardiomyopathy phenotype revisited after 50 years with cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 220–28.
- [12] Kitaoka H, Doi Y, Casey SA, et al. Comparison of prevalence of apical hypertrophic cardiomyopathy in Japan and the United States. *Am J Cardiol.* 2003; 92(10):1183-6.
- [13] Spirito P, Bellone P, Harris KM, et al. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1778–85.
- [14] Klues HG, Maron BJ, Dolla AL, Roberts WC. Diversity of structural mitral valve alterations in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1992; 85: 1651–60.
- [15] Yacoub MH, El-Hamamsy I, Said K, et al. The left ventricular outflow in hypertrophic cardiomyopathy: from structure to function. *J Cardiovasc Transl Res* 2009;2:510-7.

-
- [16] Olivotto I, Rossi A, Stefano P. La valutazione dell'ostruzione del tratto di efflusso alla luce delle nuove linee guida europee sulla cardiomiopatia ipertrofica. *G Ital Cardiol* 2015;16(3):134-137
- [17] Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003; 348: 295 – 303.
- [18] Maron BJ, Spirito P, Wesley Y, Arce J. Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1986; 315: 610–14.
- [19] Maron BJ, Rowin EJ, Casey SA, et al. Risk stratification and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy \geq 60 years of age. *Circulation* 2013; 127:585-93.
- [20] Gupta RM, Weiner RB, Baggish AL, et al. Still a kid at heart: hypertrophic cardiomyopathy in the elderly. *Circulation* 2011;124:857–63.
- [21] Maron BJ, Casey SA, Haas TS, et al. Hypertrophic cardiomyopathy with longevity to 90 years or older. *Am J Cardiol* 2012;109:1341–7.
- [22] Maron BJ, Rowin EJ, Casey SA, et al. Risk stratification and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy \geq 60 years of age. *Circulation* 2013; 127:585-93.
- [23] Maron BJ, Casey SA, Haas TS, et al. Hypertrophic cardiomyopathy with longevity to 90 years or older. *Am J Cardiol* 2012;109:1341–7.
- [24] Maron BJ, Rowin EJ, Casey SA, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy in Adulthood Associated With Low Cardiovascular Mortality With Contemporary Management Strategies. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(18):1915-28.
- [25] Authors/Task Force Members Elliott PM, Anastakis A, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2014;35:2733–79.
- [26] Melacini P, Basso C, Angelini A, et al. Clinicopathological profiles of progressive heart failure in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2010;31(17):2111-23.
- [27] Guttman OP, Rahman MS, O'Mahony C, Anastakis A, Elliott PM. Atrial fibrillation and thromboembolism in patients with hypertrophic cardiomyopathy: systematic review. *Heart*. 2014;100(6):465-72.
- [28] Olivotto I, Cecchi F, Casey SA, et al. Impact of atrial fibrillation on the clinical course of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2001;104:2517–2524.
- [29] Siontis KC, Geske JB, Ong K, et al. Atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, clinical correlations, and mortality in a large high-risk population. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):e001002.

-
- [30] Landstrom AP, Ackerman MJ. Mutation Type Is Not Clinically Useful in Predicting Prognosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 2010;122;2441-2450
- [31] Ho CY. Genetics and Clinical Destiny: Improving Care in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 2010;122;2430-2440
- [32] Maron BJ. Hypertrophic Cardiomyopathy. A systematic review. *JAMA* 2002; 287: 1308-20.
- [33] Watkins H1, 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(16):1058-64.
- [34] 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. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 2042-8.
- [35] Ho CY, Charron P, Richard P, et al. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovascular Research* 2015; 105, 397–408
- [36] Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ, et al. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:630e638.
- [37] Li Q, Gruner C, Chan RH, et al. Genotype-Positive Status in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy Is Associated With Higher Rates of Heart Failure Events. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7:416-422
- [38] van Velzen HG, Vriesendorp PA, Oldenburg RA, et al. Value of Genetic Testing for the Prediction of Long-Term Outcome in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2016;118(6):881-7.
- [39] Ho CY, Day SM, Ashley EA et al. Genotype and Lifetime Burden of Disease in Hypertrophic Cardiomyopathy: Insights from the Sarcomeric Human Cardiomyopathy Registry (SHaRe). *Circulation*. 2018;138(14):1387-1398.
- [40] Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet*. 2005;42:e59.
- [41] Girolami F1, 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(14):1444-53.
- [42] Kelly M, Semsarian C. Multiple Mutations in Genetic Cardiovascular Disease : A Marker of Disease Severity? *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2;182-190.
- [43] Garcia-Pavia P, Va'zquez ME, Segovia J, et al. Genetic basis of end-stage hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(11):1193-201.

-
- [44] Biagini E, Olivotto I, Iascone M, et al. Significance of sarcomere gene mutations analysis in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2014;114(5):769-76.
- [45] Coppini R, Ho CY, Ashley E, et al. Clinical Phenotype and Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy Associate With Thin-Filament Gene Mutations. *Am Coll Cardiol* 2014;64:2589–600
- [46] Miller RJH, Heidary S, Pavlovic A, et al. Defining genotype-phenotype relationships in patients with hypertrophic cardiomyopathy using cardiovascular magnetic resonance imaging. *PLoS One.* 2019;14(6):e0217612.
- [47] Magri D1, Santolamazza C1. Cardiopulmonary Exercise Test in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Ann Am Thorac Soc.* 2017 Jul;14(Supplement_1):S102-S109.
- [48] Patel V, Critoph CH, Elliott PM. Mechanisms and medical management of exercise intolerance in hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Pharm Des* 2015;21(4):466-72.
- [49] Magri D, Limongelli G, Re F, et al. Cardiopulmonary exercise test and sudden cardiac death risk in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2016;102(8):602-9.
- [50] Masri A, Pierson LM, Smedira NG, Agarwal S, Lytle BW, Naji P, Thamilarsan M, Lever HM, Cho LS, Desai MY. Predictors of longterm outcomes in patients with hypertrophic cardiomyopathy undergoing cardiopulmonary stress testing and echocardiography. *Am Heart J* 2015;169:684–692.e1.
- [51] Coats CJ, Rantell K, Bartnik A, Patel A, Mist B, McKenna WJ, Elliott PM. Cardiopulmonary exercise testing and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2015;8:1022–1031.
- [52] Magri D1, Re F, Limongelli G, et al. Heart Failure Progression in Hypertrophic Cardiomyopathy - Possible Insights From Cardiopulmonary Exercise Testing. *Circ J.* 2016;80(10):2204-11.
- [53] Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO, et al. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2011; 124:2761-96.
- [54] Maron BJ. Contemporary insights and strategies for risk stratification and prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2010; 121:445-56.
- [55] Harris KM, Spirito P, Maron MS, et al. Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2006; 114:216–25.
- [56] Spirito P, Autore C, Rapezzi C, et al. Syncope and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2009; 119:1703-10.

-
- [57] Maron BJ, Spirito P, Shen WK, et al. Implantable cardioverter-defibrillators and prevention of sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. *JAMA* 2007; 298: 405-12.
- [58] Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:1440–63.
- [59] Autore C, Bernabò P, Barilla S, Bruzzi P, Spirito P. The prognostic importance of left ventricular outflow obstruction in hypertrophic cardiomyopathy varies in relation to the severity of symptoms. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1076-80.
- [60] Agostoni P, Bianchi M, Moraschi A, et al. Work-rate affects cardiopulmonary exercise test results in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2005;7:498–504.
- 61 Wasserman K, Hansen JE, Sue DY, et al. Principles of exercise testing and interpretation. 4th edn. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 10–65.
- [62] Corrà U, Mezzani A, Giordano A, et al. Exercise haemodynamic variables rather than ventilatory efficiency indexes contribute to risk assessment in chronic heart failure patients treated with carvedilol. *Eur Heart J* 2009;30:3000–6.
- [63] Balady GJ, Arena R, Sietsema K, et al. Clinician's Guide to cardiopulmonary exercise testing in adults: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2010;122:191–225.
- [64] Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405–424
- [65] Canepa M, Pozios I, Vianello PF, et al. Distinguishing ventricular septal bulge versus hypertrophic cardiomyopathy in the elderly. *Heart* 2016;0:1–8.
- [66] Rodrigues JC, Amadu AM, Dastidar AG, et al. Prevalence and predictors of asymmetric hypertensive heart disease: insights from cardiac and aortic function with cardiovascular magnetic resonance *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2016;17(12):1405-1413.
- [67] Frenneaux MP, Counihan PJ, Caforio AL, Chikamori T, McKenna WJ. Abnormal blood pressure response during exercise in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1990;82:1995–2002.