

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR BABEȘ”  
DIN TIMIȘOARA**

**FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL DE GENETICĂ**

**SAV OANA-RALUCA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**ABORDAREA CARDIOMIOPATIILOR PRIMARE  
DIN PERSPECTIVĂ GENETICĂ**

**– R E Z U M A T –**

Scientific Coordinator  
**CONF. UNIV. DR. ADELA CHIRIȚĂ-EMANDI**

**Timișoara  
2024**

## **1. Introducere**

Cardiomiopatia dilatativa (CMD) reprezintă o treime din toate cauzele de insuficiență cardiacă, se asociază cu o morbi-mortalitate ridicată și este una dintre cauzele frecvente de moarte subită cardiacă (SCD). CMD are o prevalență estimată de 0,036–0,400% în populația generală și reprezintă principala indicație pentru transplantul cardiac (1).

Inițial, CMD primară a fost considerată o boală idiopatică, dar accesul la testarea genetică și progresele în secvențierea de nouă generație au condus la identificarea substratului genetic și clasificarea ulterioară a CMD în forme genetice/moștenite și forme dobândite/secundare. Variante genetice patogene/probabile patogene au fost identificate în peste 30 de gene, majoritatea fiind implicate în codificarea componentelor structurale ale miocardului, cum ar fi sarcomerul sau discul Z cardiac.

Tehnica de Next-Generation Sequencing (NGS) joacă un rol important în identificarea substratului genetic în CMD și a oferit o metodologie abordabilă și aplicabilă în practica clinică. Identificarea unei variante cauzatoare de boală stabilește diagnosticul de certitudine și ghidează screeningul tîntit la rudele de gradul I ale probandului, oferind șansa unui diagnostic precoce, înainte de apariția simptomelor și al unui tratament prompt.

Scopul prezentei cercetări este de a efectua testarea genetică prin NGS a unei cohorte de pacienți adulți, diagnosticați cu CMD sporadic sau familial, dar și caracterizarea fenotipului clinic, imagistic și analiza riscului aritmic al acestor pacienți. Aceasta este prima cohortă de studiu formată din 122 de pacienți români cu diagnostic de CMD primar care au fost urmăriți în cinci Spitale Universitare din România. O analiză de subgrup s-a concentrat pe modificările ECG și pe corelația acestora cu genotipul pacienților.

## **2. Obiective specifice**

Obiective specifice ale prezentei teze de doctorat sunt:

1. Secvențierea unei cohorte de pacienți cu CMD prin noile tehnici de secvențiere (NGS) pentru identificarea variantelor genetice cauzale ale fenotipului precum și investigarea randamentului de diagnostic genetic al acestor pacienți.;
2. Screening-ul familial al subiecților cu CMD care au consimțit la participarea în studiu.
3. Analiza diferențelor dintre pacienții cu CMD și variante genetice cauzatoare de boală față de cei cu rezultate negative
4. Corelația genotipului cu fenotipul clinic al pacienților cu CMD,
5. Analiza riscului aritmic determinat de varianta genetică.
6. O analiză de subgrup s-a concentrat pe modificările ECG și corelația cu varianta genetică identificată

### **3. Metodologia generală a cercetării**

Studiul actual a fost aprobat de Comitetul de Etică al Institutului de Boli Cardiovasculare prin avizul nr. 8152/25.09.2023 și a primit avizul Comisiei de Etică 60/15.12.2017 din partea Universității de Medicină și Farmacie Victor Babes Timișoara

Participarea pacienților la studiu a fost consimțită în mod liber, fapt certificat prin semnarea formularului de consimțământ informat în vederea testării genetice- Anexa 1. Probele care fac obiectul acestei cercetări au fost colectate de la 122 pacienți evaluați între septembrie 2016-decembrie 2022 în cadrul a 5 Spitale Universitare- centre terțiare pentru diagnostic și tratament în bolile cardiovasculare: Spitalul Clinic de Urgență București, Institutul de Boli Cardiovasculare Timișoara, Cluj-Napoca, Iași și Craiova.

#### **Criteriile de includere** au fost:

- Pacienți adulți cu diagnostic cert de CMD în absența unei cauze secundare. CMD a fost definită în conformitate cu criteriile ghidurilor actuale (2): volume sau diametre ale ventriculului stâng end-diastolic peste limita stabilită raportate la sex și indexate la aria suprafeței corporale și fracția de ejeție a ventriculului stâng  $<50\%$ , în absența condițiilor de încărcare de volum/presiune.
- Pacienții care au acceptat să participe la studiu și să efectueze testarea genetică după semnarea consimțământului informat

#### **Criterii de excludere:**

- Pacienți care asociază una sau mai multe dintre următoarele afecțiuni: valvulopatii semnificative, boli cardiace congenitale sau boală coronariană semnificativă
  - Pacienți cu istoric de tratament cardiotoxic,
  - Pacienți cu diagnostic de CMD și consum cronic de alcool
  - Pacienți cu suspiciune clinică de miocardită sau miocardită diagnosticată în imagistica RMN
  - Pacienți cu forme sindromice de DCM
- Înainte de înrolare, boala coronariană semnificativă a fost exclusă prin angiografie coronariană sau tomografie computerizată coronariană multislice, în funcție de resursele locale disponibile.

#### **3.1 Metode de evaluare**

Participanții selectați și diagnosticați cu CMD au fost evaluați astfel:

- anamneza și examinarea clinică completă;
- arbore genealogic pe 3 generații în care au fost sintetizate antecedentele familiale;

- teste de laborator: analiza NT pro BNP
  - electrocardiogramă standard în 12 derivații;
  - holter ECG/ 24h;
  - ecocardiografie transtoracica modul M si bidimensională
  - rezonanta magnetica cardiaca cu substanta de contrast
  - testare genetică prin NGS
  - implantarea unui dispozitiv cardiac după cum urmează: stimulator cardiac, cardioverter-defibrilator implantabil, terapie de resincronizare cardiacă cu defibrilator (CRTD), terapie de resincronizare cardiacă cu stimulator cardiac (CRTP);
  - complicații ale bolii: aritmii ventriculare (AV) semnificative (de exemplu, tahicardie ventriculară susținută sau nesusținută, istoric de stop cardiac resuscitat), transplant cardiac sau deces;
- Rudele de gradul I/II ale pacienților care au prezentat modificari cardiace care sa sustina diagnosticul de CMD si au consimțit la includerea în studiu în cadrul screening-ului familial, au fost evaluate folosind aceleasi investigatii.

### **3.1.2 Electrocardiograma în 12-derivații**

Fiecare dintre subiecții incluși au efectuat electrocardiogramă, la care s-au urmărit următoarele:

- unde Q patologice ( $>0,04$  s sau  $>25\%$  din unda R în aceeași derivație) sau prezența complexului QS
- anomalii de repolarizare: unde T negative în cel puțin 2 derivații contingente
- tulburări de conducere atrio-ventriculară: gradul I, II sau bloc AV complet
- anomalii de conducere interventriculară: RBBB, LBBB, QRS fracționat sau anomalie nespecifică de conducere interventriculară
- aritmii supraventriculare ca: flutterul atrial sau fibrilația atrială
- QRS microvoltat a fost definit de complexe QRS mai mici de 10 mm în derivațiile membrelor și mai puțin de 5 mm în derivațiile precordiale

### **3.1.3 Monitorizarea electrocardiogramei pe 24h**

Fiecare dintre subiecții cu CMD incluși au beneficiat cel puțin o dată- la includere de monitorizare Holter pe 24h. La monitorizarea Holter pe 24h s-au urmărit următoarele:

- tulburărilor de ritm supraventriculare (fibrilație atrială, flutter atrial);
- tulburărilor de ritm ventriculare (tahicardii ventriculare susținute și/sau nesusținute).

### 3.1.4 Ecocardiografia

Toți subiecții au fost evaluați prin:

- ecografie cardiacă transtoracică 2D utilizând un ecograf VIVID E9, GE Healthcare, Sau Philips cu sonda de 3.5 MHz. S-au realizat toate incidențele standard de ecocardiografie: apicale (ax lung, patru și două camere), parasternal ax lung și scurt, toate achiziționate cu 50-70 cadre pe secundă;
- ecografia modul M la nivelul inelului tricuspidian pentru evaluarea funcției sistolice longitudinale a ventriculului drept

Dimensiunile camerelor cardiace au fost măsurate conform Ghidurilor Societății Americane de Ecocardiografie (4). Măsurătorile standard ale volumului VS și ale FE VS au fost calculate folosind formula Simpson modificată. Valorile limită pentru VS dilatat au fost: un diametru telediastolic al VS > 58 mm la bărbați și > 52 mm la femei și un volum VS indexat de  $\geq 75$  mL/m<sup>2</sup> la bărbați și  $\geq 62$  mL/m<sup>2</sup> la femei și disfuncție sistolică atunci când FEVS < 50%. S-a luat în considerare disfuncția sistolică a VD dacă TAPSE < 17 mm sau/ și fracția de modificare a ariei VD < 35%, în funcție de datele disponibile (2,4)

### Evaluarea prin rezonanța magnetică cardiac (RM)

RM cardiac a fost efectuat folosind un scanner de 1,5 T (Siemens). Un protocol standardizat de examinare a fost utilizat pentru toți subiecții. Imaginile LGE au fost obținute la 10 până la 15 minute după administrarea intravenoasă a unui agent de contrast cu gadoliniu. Prezența sau absența fibrozei a fost analizată, dar nu a fost cuantificată. De asemenea, RM-ul a fost utilizat pentru analiza edemului miocardic și excluderea miocarditei.

### Clasificarea cardiomiopatiei dilatative

1. **CMD familial** a fost diagnosticat în prezența a mai mult de o rudă afectată (decedată sau în viață) cu un diagnostic cert de DCM sau MSC. Toți membrii familiei cu risc de a moșteni boala au fost supuși investigațiilor clinice constând în: o evaluare clinică, ecocardiografie transtoracică și ECG. Rudele care au fost identificate cu fenotip clinic pozitiv pentru CMD au fost incluse în studiu.
2. **CMD sporadic** a fost definit în absența unui istoric familial sugestiv de CMD sau MSC.

### Testarea genetică prin noile tehnici de secvențiere

Subiecții diagnosticați cu CMD au fost testați genetic utilizând tehnica de secvențiere prin sinteză de nouă generație (NGS) utilizând un panel de bază care a inclus 54 de gene cu asociere cu DCM (Invitae Dilated Cardiomyopathy and Left Ventricular Noncompaction Panel). La alegerea medicului prescriptor, a fost ales un panel extins (179 gene) ce a inclus o varietate mai largă de gene pentru cardiomiopatii și gene SCD: Invitae Arrhythmia Comprehensive

Panel, Invitae Dilated Cardiomyopathy and Left Ventricular Noncompaction Panel, Invitae Cardiomyopathy Comprehensive Panel sau Invitae Arrhythmia Panel Cardiohythomogenic Panel. Rudele de gradul I ale unui pacient identificat cu variant genetica patogena sau probabil patogena, au fost inclusi in screeningul familial și li s-a efectuat testare genetică pentru CMD.

O altă parte dintre pacienții cu CMD au fost supuși testării genetice în Centrul de Genomic al Universității de Medicină și Farmacie Victor Babeș Timișoara. Panoul TruSightCardio Illumina (San Diego, CA) a fost utilizat, care oferă un panou de secvențiere de 174 de gene utilizând kitul TruSight Rapid Capture (Illumina). Secvențierea s-a facut  $2 \times 150$  bp pe o platformă MiSeq (Illumina). Variantele detectate au fost adnotate folosind sistemul ANNOVAR, după cum s-a raportat anterior.

Extracția ADN-ului s-a realizat dintr-o probă de sânge venos recoltată într-un vacutainer cu EDTA.

### **Interpretarea variantelor genetice**

Rezultatele au fost analizate și interpretate utilizand următoarele baze de date: *Genome Aggregation Database* (gnomAD versiunea 3.1; <http://gnomad.broadinstitute.org>), *VarSome* (<https://varsome.com/>)(6) și *ClinVar* ([https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar))(7). Platforma *ClinGen*, ( <https://www.clinicalgenome.org/>)(8) a fost utilizată pentru analiza corelației dintre variantele de gene identificate și CMD, pe baza unor rapoarte de relevanță clinică, realizate de o echipă de experți. Clasificarea variantei genetice ca benignă (B), probabil benignă (LB), variantă cu semnificație incertă (VUS), probabil patogenă (LP) și patogenă (P) a fost efectuată pe baza recomandarilor Colegiului American de Genetică Medicală și Genomică și Asociația de Patologie Moleculară (ACMG/AMP)(9). Rezultatele au fost definite ca pozitive (cauzatoare de boală) dacă au fost P sau LP și negative dacă B, LB sau VUS, în funcție de clasificarea variantei genetice detectate și de modul de transmitere genetica a bolii (autozomal dominant/recesiv).

### **Analiza statistica**

Variabilele continue normal distribuite au fost exprimate ca medie și deviație standard (SD), în timp ce variabilele neparametrice au fost exprimate ca mediană . Variabilele categoriale au fost raportate ca proporții sau numere. Compararea între grupurile de variabile continue a fost efectuată folosind testul t combinat cu testul Levene iar pentru compararea variabilelor neparametrice a fost utilizat testul U Mann-Whitney. Variabilele categoriale au fost comparate folosind testul chi-pătrat. Analiza ratei de supraviețuire fără intervenția ICD au fost efectuate folosind curba Kaplan Meier. Pentru comparația dintre pacienții genetici pozitivi vs negativi, bărbați versus femeii, grupul TTN față de grupul cu alte gene și grupul TTN față de grupul LMNA, valorile P au fost calculate utilizând testul Mantel-Cox. Semnificația statistică a

fost considerată la o valoare P mai mică de 0,05. Softul SPSS 12.0 (IBM SPSS Inc.) a fost utilizat pentru înregistrarea datelor și analiza statistică.

## **4. Rezultate**

### **4.1. Caracteristici clinice**

- Au fost incluși în total 122 de pacienți adulți cu CMD, predominant bărbați (66,6 %). Vârsta medie la diagnostic a fost de  $41,4 \pm 12,3$  ani. Simptomele de insuficiența cardiacă au condus la diagnostic în majoritatea cazurilor (82,8 %), în timp ce 2,4 % dintre pacienți s-au prezentat cu stop cardiac resuscitat ca primă manifestare a bolii, 6,5 % au fost diagnosticați incidental ca urmare a unei evaluări de rutină iar 8,1 % au fost diagnosticați în contextul screening-ului familial.
- Mai mult de jumătate dintre participanți (52,4%) au avut un istoric familial pozitiv de CMD sau MSC. O FEVS <35% a fost observată la 48,4% dintre pacienții cu DCM, cu o valoare medie a FEVS de  $35,3 \pm 11,1\%$  fără diferențe semnificative între cei cu variantă genetică pozitivă față de cei cu test genetic negativ. Aproape o treime (30,3%) dintre pacienții au avut antecedente de aritmie ventriculară, iar 18,8% au avut fibrilație atrială,
- O treime (33,3%) dintre pacienții cu DCM au avut anomalii de conducere reprezentate de orice formă de bloc atrioventricular (gradul I, II sau bloc AV total) sau tulburări de conducere intraventriculară reprezentate de LBBB, RBBB sau tulburarea de conducere interventriculară nespecifică
- 39,3% dintre pacienți au avut un device cardiac implantat după cum urmează: 6 (5%) au avut un stimulator cardiac, 36 (29,3%) au avut defibrilator cardiac (unicameral ICD sau triplucameral -terapie de resincronizare cardiacă CRTD) cu o vârstă medie a implantului ICD de  $40,97 \pm 13,58$  în timp ce 6 (5%) au avut CRT-P.
- 60% dintre participanți au fost investigați prin rezonanță magnetică cardiacă identificându-se o rată ridicată de captare tardivă a gadoliniului care exprimă fibroza miocardică în trei sferturi din pacienți (74%).
- Principalele caracteristici clinice și modificări imagistice ale pacienților la care s-a identificat o variantă genetică cauzatoare de boală versus pacienții cu test genetic negativ, nu au fost diferite din punct de vedere statistic, cu excepția fibrilației atriale care a fost mai frecventă la pacienții cu test genetic pozitiv.

#### 4.2. Caracterizarea genetica

- 122 de pacienti adulti cu CMD au fost spusi testarii genetice. La 49.2% intre participantii, testarea genetica s-a facut folosind paneluri cu numar variabil de gene de la 54 la 179, alese de cardiologul curant sau de medicul genetician (Invitae) in functie de disponibilitatea locala. 15/122 (12,3%) din populatia de studiu au fost supuse screening-ului familial pe baza secventierii genelor tinta gasite in ruda de gradul I afectata (Invitae). Ceilalti pacienti cu CMD, 47/122 (38,5%) au fost supusi testarii genetice folosind kitul Tru Sight Cardio Illumina, un panel de 174 de gene, test efectuat in Centrul de Genomic al Universitatii de Medicina si Farmacie „Victor Babes” Timisoara.
- Secventierea genetica a identificat variante cauzatoare de boala, patogene sau probabil patogene, la 62/122 (50,8%) participantii, dintre care 66,1% barbati, in timp ce 30,3% au fost identificati cu variante de semnificatie necunoscuta (VUS)
- Variante cauzatoare de boala in 14 gene au fost identificate la pacientii cu CMD, in urmatoarele gene: *TTN*, (MIM 118840), *LMNA*, (MIM 150330), *DSP* (MIM 125647), *TNNT2* (MIM 191045), *RBM20* (MIM 613171), *PLN* (MIM 172405), *DMD* (MIM 300377), *ACTC1* (MIM 102540), *TMEM43* (MIM 612048), *MYO6* (MIM 600970), *MYH7* (MIM 160760), *MYBPC3* (MIM 600958), *CRYAB* (MIM 123590), and *BAG3* (MIM 603883).
- Variantele in *TTN*, *LMNA* si *DSP* au reprezentat 75% din mutatiile genetice pentru CMD. Caracterizarea variantelor cauzatoare identificate: 18 mutatii au fost missense, 20 au fost non-sens, 2 au fost splice-site si 25 au fost frameshift indel.
- Toate cele 32 de variante detectate in gena *TTN* au fost variante trunchiante: 18 variante au fost frame-shift, 13 au fost stop-gain/non-sens si 1 a fost splice-site. In ceea ce priveste gena *LMNA*, 4 dintre variantele identificate au fost trunchiante (2 frameshift, 2 nonsens), in timp ce 5 variante au fost missense.

#### 4.3. Corelatia genotip-fenotip

- Au fost comparati pacientii cu variante cauzatoare de boala in gena *TTN* vs *LMNA*. Grupul cu variante in gena *LMNA* a fost alcatuit predominant de pacienti de sex feminin,. Acestia au prezentat semnificativ mai multe anomalile de conducere cardiaca, fibrilatie atriala si au necesitat mai frecvent implantarea unui device cardiac. Toti pacientii (8/8) cu variante in gena *LMNA* care au efectuat CMR, au prezentat fibroza miocardica, comparativ cu 76,2% (16/21) din pacientii cu mutatie in gena *TTN*. Totusi aceste diferente nu au atins semnificatia statistica.



- Nivelul de BNP (peptide natriuretice de tip brain) au fost semnificativ mai mici la pacienții cu variante în gena TTN, comparativ cu alte gene; Cu toate acestea, procentul de pacienți testați este prea mic pentru a asigura o interpretare corectă
- Comparatie între curbele de supraviețuire fără intervenția device-ului cardiac a fost semnificativ mai mică la pacienții cu variante cauzatoare de boală în gena LMNA versus pacienți cu variante patogene în gena TTN.

- 

#### **4.4. Analiza ECG**

- Modificările ECG au fost analizate în grupul de pacienți cu CMD identificându-se următoarele aspecte: 8,8% din pacienți au prezentat unde Q patologice, 19% au avut complexe QRS microvoltate, în 35% din cazuri s-a identificat un complex QRS >120 msec, 43% au prezentat un complex QRS morfologic anormal și aproximativ jumătate din pacienți (49,4 %) au avut unde T negative.
- O comparație a modificărilor ECG între grupul de pacienți cu variante genetice cauzatoare de boală versus rezultatul negativ la testarea genetică a fost efectuată
- Un complex QRS mai larg de 120 msec a fost mai frecvent identificat la pacienții cu test genetic negativ.
- morfologie anormală a complexului QRS care a inclus: bloc de ramură stângă, bloc de ramură dreaptă, QRS fragmentat sau anomalie de conducere interventriculară nespecifică fost găsită predominant la pacienții cu rezultat genetic negativ în comparație cu cei cu variante genetice pozitive ( $p=0,05$ ), un rezultat la limita semnificației statistice.
- Nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește prezența aritmiilor supraventriculare sau ventriculare, bloc AV de grad I, unde Q patologice, complex QRS microvoltat în derivațiile membrelor sau în derivațiile precordiale) sau unde T negative între pacienții cu CMD cu variante genetice cauzatoare de boală versus test genetic negativ.

#### **5. Contribuții personale și perspective**

În cadrul studiului de față a fost secvențiată pentru prima dată în România o cohortă de pacienți cu cardiomiopatie dilatativă primară, formă familială sau sporadică, prin tehnici de secvențiere de nouă generație folosind un panel (54-179) de gene cunoscute în literatura ca fiind asociate cu această patologie.

Randamentul diagnosticului testării genetice a fost de 50,8%. Variante cauzatoare de boală (clasificate ca patogene și probabil patogene) au fost identificate în următoarele 14 gene: TTN, LMNA, DSP, TNNT2, RBM20, PLN, DMD, ACTC1, TMEM43, MYO6, MYH7,

MYBPC3, CRYAB și BAG3. 75% din cauzele genetice pentru DCM au fost identificate în genele TTN, LMNA și DSP. Nu a fost identificată nicio corelație statistică semnificativă între varianta genetică care determină boala și fenotipul clinico-imagistic al pacienților. Această legătură genotip-fenotip ar fi putut contribui la o potențială selecție de gene cu prevalență mai mare în populația românească pentru o testare genetică țintită și optimă din punct de vedere al cost-eficienței.

Acest studiu oferă date preliminare pentru background-ul genetic al CMD în Europa de Sud-Est, unde există puține date legate de prevalența anumitor mutații comparativ cu Europa de Vest sau de Nord, de unde provin cele mai multe date legate de incidența a mutațiilor în CMD. În perspectivă, se va lărgi lotul de studiu prin includerea unui număr mai mare de subiecți ce va permite o posibilă analiză diferențiată în funcție de genotip.

Grupul cu variante în gena LMNA a prezentat semnificativ mai multe anomalii de conducere atrio-ventriculară, implantare de dispozitiv și fibrilație atrială precum și fibroză miocardică versus grupul cu variante în gena TTN. Persoanele cu variante TTN au avut o rată mai mică de fibroză la evaluare RMN cardiac, niveluri mai scăzute de BNP și o rată de supraviețuire mai mare fără necesitatea intervenției dispozitivului cardiac în comparație cu grupul LMNA. Cu toate acestea, niciuna dintre aceste diferențe în ceea ce privește manifestarea clinică sau fenotipul nu a atins semnificație statistică, susținând că nu putem anticipa prezența unei variante genetice cauzale doar pe baza tabloului clinico-imagistic al pacienților.

Am descris cele mai frecvente anomalii ECG care pot fi întâlnite în cardiomiopatia dilativă non-ischemică. În plus, ne-am propus să analizăm corelația genă-fenotip la pacienții români cu DCM, pentru a oferi date pentru îmbunătățirea managementului clinic. Nu am observat nicio relație semnificativă între parametrii electrocardiografici și genotip. În schimb am observat o tendință către un risc mai mare de aritmii ventriculare la pacienții cu QRS larg, care alături de disfuncția de VS asociază și disfuncție de ventricul drept, sugerând că aceste modificări asociate unui anumit genotip ar putea conduce la indicația de implantare a unui ICD în prevenție primară a morții subite cardiace.

Studiile viitoare incluzând loturi mai mari de pacienți cu CMD ar trebui să se concentreze pe valoarea genotipului din punct de vedere prognostic și corelarea acestuia cu riscul aritmic și evoluția cardiomiopatiei dilatative.