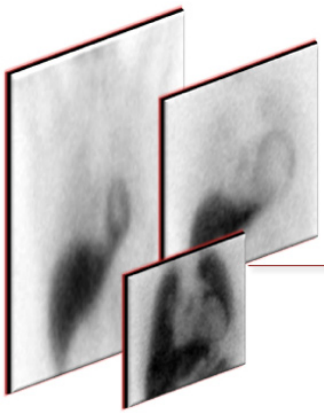


Miocardiopatia dilatada familiar

determinantes da expressão clínica

Elisabete Lousada Martins de Oliveira Bernardes

Título	Miocardiopatia Dilatada Familiar: determinantes da expressão clínica
Autor	Elisabete Bernardes
Edição	do Autor
Maquetização | Edição de texto	MEDISA - Edições e Divulgações Científicas, Lda
ISBN	978 - 989 - 20 - 1932 - 1
Ano	2010

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor,
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Artigo 48, parágrafo 3: A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação
(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto | Decreto Lei nº 19337, de 29 de Janeiro de 1931)

Professores Catedráticos da Faculdade de Medicina do Porto

Manuel Maria Paula Barbosa
Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Maria Amélia Duarte Ferreira
José Agostinho Marques Lopes
Patrício Manuel Vieira Araújo Soares Silva
Daniel Filipe Lima Moura
Alberto Manuel Barros da Silva
José Manuel Lopes Teixeira Amarante
José Henrique Dias Pinto de Barros
Maria Fátima Machado Henriques Carneiro
Isabel Maria Amorim Pereira Ramos
Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira
Maria Dulce Cordeiro Madeira
Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira
Rui Manuel Almeida Mota Cardoso
António Carlos Freitas Ribeiro Saraiva
Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar
José Luís Medina Vieira
José Carlos Neves da Cunha Areias
Manuel Jesus Falcão Pestana Vasconcelos
João Francisco Montenegro Andrade Lima Bernardes
Maria Leonor Martins Soares David
Rui Manuel Lopes Nunes
José Eduardo Torres Eckenroth Guimarães
Francisco Fernando Rocha Gonçalves
José Manuel Pereira Dias de Castro Lopes
Manuel António Caldeira Pais Clemente
Abel Vitorino Trigo Cabral

Professores Catedráticos Jubilados ou Aposentados

Abel José Sampaio da Costa Tavares
Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto
Amândio Gomes Sampaio Tavares
António Augusto Lopes Vaz
António Carvalho Almeida Coimbra
António Fernandes da Fonseca
António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
António Germano Pina Silva Leal
António José Pacheco Palha
António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Artur Manuel Giesteira de Almeida
Belmiro dos Santos Patricio
Cândido Alves Hipólito Reis
Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Cassiano Pena de Abreu e Lima
Daniel Santos Pinto Serrão
Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Ferreira
Fernando Tavarela Veloso
Francisco de Sousa Lé
Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Menezes
João Silva Carvalho
Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
José Augusto Fleming Torrinha
José Carvalho de Oliveira
José Fernando Barros Castro Correia
José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Luís Alberto Martins Gomes de Almeida
Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Manuel Machado Rodrigues Gomes

Manuel Teixeira Amarante Júnior
Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Maria Isabel Amorim de Azevedo
Mário José Cerqueira Gomes Braga
Serafim Correia Pinto Guimarães
Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso
Walter Friedrich Alfred Oswald

Ao José Miguel
Aos meus pais, Carlos e Maria Rosa
Às minhas filhas, Carolina e Leonor

Agradecimentos

Como aluna do curso de Medicina agradeço ao Professor Doutor Daniel Serrão as suas aulas sobre Ética, onde assimilei a particular exigência do conhecimento médico, e de quem recordo, repetidamente, a frase "*o médico só diagnostica aquilo que conhece*".

À Professora Doutora Clara Sambade agradeço a oportunidade que me deu em "cuidar" de células vivas, perpetuáveis, e susceptíveis de análise por técnicas "inovadoras" de biologia molecular. Este contacto foi determinante e condicionou o meu interesse pela área da genética.

A escolha da Cardiologia foi obviamente impulsionada pela transmissão teórica, mas entusiástica, dos extraordinários avanços nas intervenções diagnósticas e terapêuticas, durante o meu percurso no ensino pré-graduado, nomeadamente nas aulas de Farmacologia, pelo Professor Doutor Manuel Vaz da Silva e nas aulas de Cardiologia leccionadas pelo Professor Doutor Francisco Rocha Gonçalves, Professor Doutor Cassiano Abreu e Lima e Professora Doutora Júlia Maciel.

Como interna de especialidade, a minha aprendizagem, nomeadamente do fenómeno de remodelagem, prosseguiu com o contributo do Professor Doutor José Carlos Silva Cardoso, responsável pela consulta de Insuficiência Cardíaca e Transplante e um dos principais impulsionadores do presente trabalho de investigação.

A todos reitero os meus agradecimentos, assim como aos elementos do Serviço de Cardiologia, incluindo médicos, técnicos e enfermeiros, que directa ou indirectamente contribuíram para a concretização deste projecto, nomeadamente o Dr. Manuel Campelo, a Dr.ª Sandra Amorim, a Dr.ª Brenda Moura e a Dr.ª Teresa Pinho.

Aos elementos do Serviço de Medicina Nuclear, Dr. Jorge Pereira, Dr.ª Teresa Faria e Dr.ª Ana Oliveira, não posso deixar de agradecer a forma como acolheram este projecto.

Aos doentes, a quem devo uma parte significativa da minha aprendizagem, dedico igualmente esta dissertação e agradeço toda a sua disponibilidade.

Publicações

Ao abrigo do Art. 8.º do Decreto-Lei n.º 388/70 fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados, ou em vias de publicação:

Sob a forma de Texto Completo

1 Shönberger J, Kühler L, Martins E, Lindner TH, Silva-Cardoso J, Zimmer M. A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1. Hum Genet 2005;118:451-7.

2 Martins E, Silva-Cardoso J, Alves C, Pereira H, Soares B, Damasceno A, Abreu-Lima C, Amorim A, Rocha-Gonçalves F. Familial Dilated Cardiomyopathy with Troponin T K210del Mutation. Rev Port Cardiol 2006; 25(3):295-300.

3 Martins E, Silva-Cardoso J, Silveira F, Nadais G, Rocha-Gonçalves F. Left ventricular function in adults with muscular dystrophies: genotype-phenotype correlations. Rev Port Cardiol 2005; 24(1):23-35.

4 Martins E, Silva-Cardoso J, Campelo M, Amorim S, Moura B, Maciel MJ, Rocha-Gonçalves F. Survival of patients with familial dilated cardiomyopathies on optimal heart failure therapy. Rev Port Cardiol 2009; 28(3):263-8.

5 Martins E, Faria T, Silva-Cardoso J, Oliveira A, Campelo M, Amorim S, Moura B, Rocha-Gonçalves F, Pereira JG, Maciel MJ. I-123-MIBG cardiac uptake imaging in familial dilated cardiomyopathies. Rev Port Cardiol 2009;28(1):29-36.

6 Martins E, Oliveira A, Silva-Cardoso J, Faria T, Pinho T, Campelo M, Madureira A, Ramos I, Pereira JG, Rocha-Gonçalves F. I-123-MIBG and cardiac adrenergic activity in familial dilated cardiomyopathy. Submetido para publicação: Journal of the American College of Cardiology.

Anexo I

Martins E, Cardoso JS, Abreu-Lima C. Miocardiopatia dilatada familiar. Rev Port Cardiol 2002; 21(12):1487-503.

Anexo II

Martins E, Silva-Cardoso J, Bicho M, Bourbon M, Ceia F, Rebocho MJ, Moura B, Fonseca C, Correia MJ, Brito D, Perdigão C, Madeira H, Abreu-Lima C. Estudo Português de Miocardiopatias Dilatadas Familiares. Estudo Fatima. Rev Port Cardiol 2008; 27(9):1029-42.

Sob a forma de Resumo

1 Martins E, Silva-Cardoso J, Vaz da Silva M, Campelo M, Moura B, Amorim S, Santos F; Gavina C, Abreu-Lima C. Frequência das miocardiopatias dilatadas familiares: uma avaliação preliminar. Rev Port Cardiol 2002; 21(Supl I):83.

2 Martins E, Silva-Cardoso J, Rodrigues I, Vaz M, Abreu-Lima C. Miocardiopatia Dilatada Familiar: perfil clínico. Rev Port Cardiol 2002; 21(Supl I):83.

3 Martins E, Silva-Cardoso J, Nadais G, Silveira F, Rocha-Gonçalves F. Função ventricular esquerda em adultos com distrofia muscular: correlações genótipo-fenótipo. Rev Port Cardiol 2004; 23(Supl I):50.

4 Martins E, Silva-Cardoso J, Nadais G, Silveira F, Rocha-Gonçalves F. Left ventricular function in adults with muscular dystrophies: genotype-phenotype correlations. Eur J Heart Fail 2004; 3(Suppl1): 33.

5 Martins E, Silva-Cardoso J, Alves C, Soares B, Damasceno A, Abreu-Lima C, Amorim A, Rocha-Gonçalves F. Mutational analysis of fosfolamban gene in patients with familial and idiopathic dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2004; 3(Suppl1):124.

6 Martins E, Silva-Cardoso J, Alves C, Soares B, Damasceno A, Abreu-Lima C, Amorim A, Rocha-Gonçalves F. Análise mutacional do gene fosfolamban em doentes com miocardiopatia dilatada familiar e idiopática. Rev Port Cardiol 2004; 23(Supl I):139.

7 Martins E, Silva-Cardoso J, Alves C, Soares B, Damasceno A, Abreu-Lima C, Amorim A, Rocha-Gonçalves F. Mutação da troponina T numa família portuguesa com miocardiopatia dilatada. Rev Port Cardiol 2004; 23(Supl I):139.

8 Martins E, Silva-Cardoso J, Alves C, Soares B, Damasceno A, Abreu-Lima C, Amorim A, Rocha-Gonçalves F. K210del troponin T mutation in a Portuguese family with dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2004; 3(Suppl 1):85.

7 Piñon M, Leão-Teles E, Martins E, Pinho T, Pinheiro-Torres J, Campos M, Reis J, Campelo M, Silva-Cardoso J, Vilarinho L, Teixeira-Bastos P, Maciel MJ. Citopatia mitocondrial na etiologia da miocardiopatia dilatada juvenil. Rev Port Cardiol 2004; 23(Supl I):140.

8 Schoenberger J, Kuhler L, Martins E, Lindner TH, Silva-Cardoso J, Zimmer M. Uma mutação no cromossoma 7q22.3-33.1 pode causar miocardiopatia dilatada autossómica dominante. Rev Port Cardiol 2005; 25(Supl I):15.

9 Schoenberger J, Kuhler L, Martins E, Lindner TH, Silva-Cardoso J, Zimmer M. A mutation at chromosome 7q22.3-31.1 can lead to autosomal-dominant dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2005;Suppl1:25.

10 Martins E, Silva-Cardoso J, Amorim S, Campelo M, Moura B, Rocha-Gonçalves F. Miocardiopatia dilatada familiar: resultados de seguimento a longo prazo. Rev Port Cardiol 2006; 25(Supl I):160.

11 Martins E, Silva-Cardoso J, Campelo M, Amorim S, Moura B, Rocha-Gonçalves F. Familial dilated cardiomyopathy: a long term follow-up study. Eur J Heart Fail 2006;Suppl 1:146.

12 Martins E, Silva-Cardoso J, Campelo M, Amorim S, Moura B, Rocha-Gonçalves F, Maciel MJ. Frequência de casos familiares de miocardiopatia dilatada. Rev Port Cardiol 2007; 26 (Supl II): 83

13 Martins E, Silva-Cardoso J, Campelo M, Amorim S, Moura B, Rocha-Gonçalves F, Maciel MJ. Familial dilated cardiomyopathy in an outpatient heart failure clinic. Eur J Heart Fail 2007; 6(Suppl 1):51.

14 Martins E, Faria T, Silva-Cardoso J, Oliveira A, Campelo M, Amorim S, Moura B, Rocha-Gonçalves F, Pereira MG, Maciel MJ. Actividade adrenérgica cardíaca em estádios precoces de miocardiopatia dilatada familiar: resultados preliminares. Rev Port Cardiol 2007; 26(Supl II): 82

15 Martins E, Silva-Cardoso J, Faria T, Oliveira A, Pinho T, Campelo M, Amorim S, Moura B, Maciel MJ, Pereira MG, Rocha-Gonçalves F. Assessment of cardiac metaiodobenzylguanidine activity and plasma B-type natriuretic peptide in familial dilated cardiomyopathy members. Rev Port Cadiol 2009; 28(Supp I):27.

16 Martins E, Silva-Cardoso J, Faria T, Oliveira A, Pinho T, Campelo M, Pereira JG, Rocha-Gonçalves F. Assessment of myocardial metaiodobenzylguanidine activity and plasma B-type natriuretic peptide in familial dilated cardiomyopathy members. Eur Heart J 2009; 11(Suppl B):34.

17 Pinho T, Martins E, Oliveira SM, Silva-Cardoso J, Madureira A, Ramos I, Maciel MJ. Miocardiopatia dilatada familiar: valor prognóstico da fibrose miocárdica identificada por ressonância magnética cardíaca. Rev Port Cardiol 2009; 28(Supp I):14.

18 Pinho T, Martins E, Oliveira SM, Silva-Cardoso J, Madureira A, Ramos I, Maciel MJ. Avaliação da função ventricular direita por ressonância magnética em doentes com miocardiopatia dilatada familiar. Rev Port Cardiol 2009; 28(Supp I):135.

19 Pinho T, Martins E, Oliveira SM, Silva-Cardoso J, Madureira A, Ramos I, Maciel MJ. Assessment of right ventricular function by cardiovascular magnetic resonance in patients with familial dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2009;8(Suppl).

Índice

Introdução 29

Prólogo 31

O conceito de miocardiopatia dilatada familiar 33

O reconhecimento das formas hereditárias de miocardiopatia dilatada 35

Associações fenotípicas e os primeiros *loci* identificados 39

Miocardiopatia associada a doença precoce do tecido de condução 39

Miocardiopatia associada a miopatia esquelética, com ou sem doença de tecido de condução 40

Miocardiopatia associada a surdez neuro – sensitiva 41

A heterogeneidade genética 43

A patogenicidade das mutações 47

Defeito na transmissão da força contráctil ou da mecanotransdução 48

Diminuição da geração da força contráctil 49

Alteração da expressão génica 50

Abordagem clínica da miocardiopatia dilatada familiar 53

Diagnóstico e avaliação dos familiares 53

Aconselhamento aos familiares assintomáticos 55

Questões actuais 57

Objectivo 61

Material e Métodos 65

População 67

Casos familiares de miocardiopatia dilatada 68

Doentes com distrofias musculares (com e sem manifestações cardíacas) 70

Métodos 71

Caracterização molecular da miocardiopatia dilatada genética 71

Caracterização clínica e identificação de marcadores de risco nos casos familiares de miocardiopatia dilatada 72

Resultados 75

Caracteristicas gerais da população incluída nos trabalhos publicados 77

Publicações 79

A novel locus for autosomal - dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22-31 83

Familial Dilated cardiomyopathy with Troponin K210del mutation 91

Left ventricular function in adults with muscular dystrophies: genotype - fenotype correlations 99

Survival of patients with familial dilated cardiomyopathy on optimal heart failure theraphy 115

123-I-MIBG cardiac uptake imaging in familial dilated cardiomyopathy 123

123-I-MIBG and cardiac adrenergic activity in familial dilated cardiomyopathy 133

Discussão dos resultados 143

Aproximações à caracterização molecular da miocardiopatia dilatada familiar 147

Aproximações à caracterização clínica da miocardiopatia dilatada familiar 149

Prognóstico das familias afectadas 149

Identificação de factores de risco de progressão da doença 150

Importância das alterações sub-clínicas entre os familiares assintomáticos 155

Interpretação fisiopatológica 157

História natural da miocardiopatia dilatada familiar 157

Integração no modelo de remodelagem da insuficiência cardíaca 159

Contributo da investigação das miocardiopatias dilatadas familiares para o modelo molecular de remodelagem ventricular 171

Resumo e conclusões 173

Summary and Conclusions 179

Anexos I e II 185

Bibliografia 221

"Não me considero especialista nem em ciência nem em filosofia. Tenho, contudo, tentado com afinco, durante toda a minha vida, compreender alguma coisa acerca do mundo em que vivemos. O conhecimento científico e a racionalidade humana que o produz são, em meu entender, sempre falíveis ou sujeitos a erro. Mas são também, creio, o orgulho da humanidade. Pois o homem é, tanto quanto sei, a única coisa no universo que tenta entendê-lo. Espero que continuemos a fazê-lo e que estejamos também cientes das severas limitações das nossas intervenções."

Karl Popper

Introdução

Prólogo

No ano de 1999 iniciei o meu internato complementar de Cardiologia no Hospital de São João. O interesse pela miocardiopatia dilatada familiar, tema de reflexão e dos trabalhos de investigação expostos nesta dissertação, surgiu após a minha integração no trabalho assistencial de uma consulta específica do Serviço de Cardiologia, onde, sob o incentivo e a disponibilidade do Professor Doutor Silva Cardoso, foi possível identificar alguns casos familiares da doença.

O trabalho que foi desenvolvido em torno desta temática pode subdividir-se em duas fases, temporalmente distintas. Numa primeira etapa, coincidente com a divulgação dos resultados da investigação molecular na miocardiopatia hipertrófica, o interesse incidiu sobre a pesquisa de mutações patogénicas. O diagnóstico molecular, nos casos-índex, foi inicialmente realizado por mim, no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, partilhando o laboratório e as doutas opiniões do Professor Doutor António Amorim e suas colaboradoras. Posteriormente, em cooperação com o Professor Jost Shönberger, da Universidade de Würzburg, disponibilizámos as amostras ADN de vários elementos de uma família numerosa, para estudo de *linkage*, com o objectivo de identificar o *locus* e posteriormente o gene relacionado com a doença.

Ao longo do tempo fomos sendo confrontados com a divulgação de uma enorme diversidade de genes associados à miocardiopatia dilatada familiar e às frugais correlações genótipo-fenótipo, o que nos levou a questionar as futuras implicações clínicas do diagnóstico molecular nesta identidade clínica.

Neste contexto, e numa segunda fase do projecto, que coincidiu com a minha formação específica em cardiologia nuclear, o estudo das famílias sofreu uma inflexão, no sentido de pesquisar marcadores clínicos, com valor prognóstico, em diferentes fases evolutivas da doença. A avaliação efectuada, que incluiu a realização de cintigrafias cardíacas com metaiodobenzilguanidina, só foi possível graças à receptividade do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital de São João e à excepcional colaboração da sua equipa, liderada pelo Dr. Jorge Pereira.

Resta referir que este projecto contou com o apoio financeiro da Fundação Calouste Gulbenkian, da Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde e da Sociedade Portuguesa de Cardiologia.

O conceito de miocardiopatia dilatada familiar

No modelo de classificação das miocardiopatias, recentemente proposto pela Sociedade Europeia de Cardiologia, a miocardiopatia dilatada constitui uma doença do músculo cardíaco caracterizada pela dilatação e disfunção sistólica de um ou de ambos os ventrículos, na ausência de condições de sobrecarga (hipertensão, doença valvular, cardiopatia congénita) ou doença coronária, suficientes, por si só, para causar o compromisso global da função ventricular [1].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tinha definido previamente os critérios morfo-funcionais desta entidade clínica, pela presença de dimensões telediastólicas do ventrículo esquerdo superiores a 2,7 cm/m^2 e fracção de ejecção e/ou fracção de encurtamento inferiores a 40% e 25%, respectivamente [2-3].

A miocardiopatia dilatada pode ter diversas etiologias, nomeadamente a exposição a factores, como fármacos (ex. antraciclinas) ou agentes infecciosos (ex. vírus), doenças metabólicas (ex. glicogenoses), infiltrativas (ex. amiloidose), endócrinas (ex. hipotiroidismo) ou auto-imunes (ex. Lúpus Eritematoso Sistémico) [4]. Quando não é possível identificar uma etiologia específica é designada como idiopática, tendo, nesta circunstância, uma prevalência estimada em 1:2500 na população geral [5].

Se a miocardiopatia ou outra característica fenotípica atribuída a uma alteração genética estiverem presentes noutro elemento familiar, ou se no doente for identificada uma mutação "*de novo*", passa então a denominar-se como familiar, hereditária ou genética [1]. Estas terminologias são utilizadas algo indiferentemente, embora o termo familiar esteja geralmente reservado às situações em que existe um reconhecimento clínico da transmissão hereditária da doença, através da pesquisa de antecedentes patológicos ou observação dos parentes do caso-índex. Um caso esporádico será obviamente susceptível de transmissão hereditária, se a mutação "*de novo*", estiver presente ao nível das células germinativas.

Em 1999, a Sociedade Europeia de Cardiologia explicitou os critérios a ter em conta na identificação dos casos familiares, numa perspectiva de incremento da sua identificação na prática clínica [6]. Mesmo na ausência de qualquer um dos critérios *major* apresentados no Quadro 1, é possível designar a miocardiopatia como hereditária se, após a observação dos elementos da família, algum deles reunir critérios para ser considerado afectado pela doença.

A condição de *afectado* é definida pela presença de 3 critérios *minor*, ou de 1 critério *minor* e diâmetro telediastólico do ventrículo esquerdo superior a 117% do previsto, segundo a equação de Henry [7].

Independentemente da etiologia, a miocardiopatia dilatada manifesta-se clinicamente por sinais e sintomas resultantes da diminuição do débito cardíaco e da retenção hídrica, sendo frequentes as queixas de fadiga, dispneia, ortopneia, bem como a presença de edemas e de estase pulmonar [8]. Quando existem estas manifestações de insuficiência cardíaca o prognóstico é muitas vezes grave, com uma mortalidade que pode atingir os 25-50%, aos 5 anos, apesar da terapêutica farmacológica actual [9-10]. A miocardiopatia dilatada constitui um dos principais motivos de transplantação cardíaca [11].

As arritmias e as anomalias do sistema de condução são comuns no quadro clínico referido, e a sua presença associa-se ao risco de morte súbita e de tromboembolismo. O facto das perturbações de ritmo cardíaco poderem expressar-se isoladamente, traduzindo uma anomalia estrutural do miocárdio, embora a um nível subcelular, conduziu a Sociedade Americana de Cardiologia a conceptualizar uma definição mais abrangente de miocardiopatia [12]. Segundo esta Sociedade Científica, as doenças arritmogénicas de causa genética, mesmo na ausência de disfunção ou dilatação cardíacas, são também classificadas como miocardiopatias.

Esta última nomenclatura exacerba o entendimento actual sobre a origem genética destas doenças cardíacas e afasta-se vertiginosamente da definição de miocardiopatia proposta em 1980 pela OMS como "*heart muscle disease of unknown cause*" [2].

Quadro 1 | Critérios de diagnóstico da miocardiopatia dilatada familiar.

Critérios *major* de Miocardiopatia Dilatada Familiar
Miocardiopatia dilatada "idiopática" em 2 ou mais indivíduos da mesma família.
Miocardiopatia dilatada "idiopática" e história de morte súbita inexplicada, antes dos 35 anos de idade, num familiar em 1º grau.
Critérios *minor* de Miocardiopatia Dilatada Familiar
Taquiarritmias supraventriculares ou ventriculares inexplicadas, antes dos 50 anos de idade.
Perturbações da condução inexplicadas (bloqueio auriculoventricular do 2º ou 3º grau, bloqueio completo de ramo esquerdo, doença do nó sinusal).
Dilatação isolada do ventrículo esquerdo, definida por diâmetro telediastólico superior a 112% do previsto, segundo a equação de Henry.
Disfunção sistólica, definida pela fracção de ejecção inferior a 50% e/ou fracção de encurtamento inferior a 28%.
Morte súbita ou acidente vascular cerebral, inexplicados, antes dos 50 anos de idade.
Alterações da contractilidade segmentar, na ausência de perturbações da condução intraventricular.

O reconhecimento das formas hereditárias de miocardiopatia dilatada

Até aos anos 80, considerava-se que a miocardiopatia dilatada era uma doença multifactorial, em que os factores genéticos raramente estavam implicados na sua etiopatogenia. Durante vários anos, a impossibilidade de diferenciar imagiologicamente as diferentes miocardiopatias *in vivo* (dilatadas, hipertróficas, restritivas) e a dificuldade de efectuar o seu diagnóstico entre os familiares assintomáticos, contribuiu para que se subestimasse o papel dos factores hereditários.

Embora as primeiras descrições de miocardiopatia dilatada familiar sejam reportáveis aos anos 60 [13-14], foi a partir do final da década de 80, que se assistiu à crescente divulgação de casos hereditários da doença [15-18].

Alguns autores salientaram a agregação familiar da miocardiopatia aparentemente secundária a infecções víricas ou à gravidez, colocando a hipótese de existirem factores genéticos de susceptibilidade a estes agentes ou estados fisiológicos [19-22]. A associação da miocardiopatia à presença de arritmias malignas ou doença precoce do tecido de condução e/ou miopatia esquelética, a possibilidade de se manifestar na forma de "*mildly dilated cardiomyopathy*" ou por alterações segmentares da contractilidade do ventrículo esquerdo, foram características igualmente destacadas nos relatos iniciais [23-27].

Em simultâneo com as descrições destas famílias, numerosos trabalhos foram efectuados com o objectivo de avaliar a frequência dos casos hereditários (Quadro 2). As diferentes metodologias utilizadas, a dimensão e as características das amostras analisadas reflectiram-se necessariamente nas diferentes percentagens obtidas. De uma forma geral, a proporção de casos familiares aumentou quando a avaliação dos indivíduos assintomáticos incluiu a utilização de métodos imagiológicos, como a ecocardiografia.

Como exemplo, refira-se o trabalho de Fuster, baseado na história familiar de doentes da clínica Mayo, entre 1960 e 1973, no qual a frequência de casos considerados hereditários foi de apenas 2% [28]. Já com recurso à ecocardiografia, efectuada a familiares dos casos-index, Michels, Fragola e Zachara encontraram percentagens significativamente superiores, de 20%, 33% e 13%, respectivamente [29-31].

Keeling identificou 11% de casos hereditários, após a avaliação de 236 parentes de 40 famílias [32]. Nesta amostra, a dilatação (18%) e a redução da fracção de encurtamento (4%), encaradas como alterações isoladas do ventrículo esquerdo, foram significativamente mais frequentes entre os familiares dos doentes, comparativamente a uma população controlo, de 239 indivíduos saudáveis.

Em Heidelberg, Grunig avaliou uma amostra muito significativa de doentes (n=445) e respectivos familiares (n=970) [33]. Determinou uma percentagem de 35% de casos hereditários e diagnosticou 38 novos casos de miocardiopatia dilatada. Entre os casos familiares, os doentes eram mais jovens e as alterações electrocardiográficas mais frequentes, embora inespecíficas. Alguns doentes apresentavam associações fenotípicas particulares, nomeadamente a miocardiopatia associada a surdez neuro-sensitiva.

Utilizando critérios meramente clínicos, McKenna estabeleceu o diagnóstico definitivo de doença familiar em 25% e. possivelmente familiar, em 45% dos casos de miocardiopatia dilatada [34].

Uma percentagem de 65% foi obtida por Mestroni e colaboradores, que observaram 281 parentes de 60 casos-index [35]. Neste trabalho é de destacar a frequência elevada (72%) de auto-anticorpos anti-miocárdio, presente num subgrupo de doentes, e a documentação de alterações miopáticas, em algumas biópsias musculares esqueléticas, de carácter subclínico.

Em populações de doentes submetidos a transplante cardíaco, Valentine reportou 6% de casos hereditários em Stanford e Monserrat 7,5% no centro espanhol de Juan Canalejo [36-37].

Em resumo, com base nos trabalhos publicados maioritariamente na década de 90, que incluíram o rastreio ecocardiográfico da doença entre os familiares assintomáticos, estima-se uma frequência de casos familiares, entre aqueles considerados *a priori* como "idiopáticos", superior a 25%. Esta percentagem enquadra-se na prevalência das doenças consideradas raras na população geral, isto é, com frequências inferiores a 1:2000, no entanto, este valor está muito provavelmente subestimado, atendendo à actual ausência de marcadores etiológicos específicos, nomeadamente de ordem genética ou molecular.

Convém referir que, nas séries analisadas, existe a possibilidade de terem sido incluídos doentes com miocardiopatia hipertrófica *ad initium*, que evoluiu para a dilatação e disfunção sistólica, a forma designada "*burn-out hypertrophic cardiomyopathy*". Esta hipótese deve ser particularmente considerada nas famílias em que os diferentes membros manifestam cardiopatias distintas, sendo que a dilatação ventricular pode dever-se, por exemplo, à presença simultânea, no mesmo indivíduo, de duas mutações patogénicas [38].

Por outro lado, o facto da maioria dos trabalhos não incluir doentes com cardiopatias aparentemente secundárias à exposição a vírus ou outros agentes, não significa que os factores genéticos não possam contribuir significativamente para a expressão clínica destas situações.

Quadro 2 | Frequência da miocardiopatia dilatada familiar.

Ano da Publicação/ Autor	Metodologia	Nº casos index/nº familiares observados	% de MCDF	Ref.
1981, Fuster V.	Avaliação da história familiar nos registos clínicos.	104/NA	2%	39
1985, Michels V.	Envio de questionários a doentes com MCD idiopática, diagnosticada antes dos 50 anos. Não excluíram os casos atribuídos ao álcool ou a miocardite não confirmada.	169/NA	6 %	40
1988, Fragola P.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma em familiares de 1º grau de doentes com MCD idiopática.	12/42	33%	30
1989, Valantine H.	Avaliação da história familiar nos registos clínicos de doentes submetidos a transplante cardíaco.	179/NA	6%	36
1990, Mestroni L.	Avaliação dos familiares, apenas se existisse suspeita de terem doença cardíaca.	165/15	7%	41
1992, Michels V.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma de familiares em primeiro grau de doentes com MCD idiopática. Não excluíram os casos atribuídos ao álcool ou à gravidez/parto.	59/315	20%	29
1993, Zachara E.	Avaliação dos familiares apenas se confirmada a presença de miocardiopatia dilatada num deles.	105/109	13%	31
1995, Keeling PJ.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma dos familiares de doentes com MCD idiopática ou familiar. Não excluíram os casos atribuídos ao álcool ou a presença de HTA com valores inferiores a 160/90 mmHg.	40/236	25%	32
1997, Rakar S.	Avaliação dos registos clínicos ou contacto telefónico com os familiares de doentes falecidos com MCD.	24/NA	12,5%	11
1997, McKenna CJ.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma dos familiares de 1º grau de doentes com MCD idiopática ou familiar.	56/200	25% + 45%Possível	34
1998, Grunig E.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma de familiares de 1º e 2º grau de doentes com MCD idiopática. Não excluíram os casos associados à gravidez/parto ou a consumo de álcool inferior a 100g/dia	445/970	11% + 25%Suspeito	33
1999, Mestroni L.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma de todos os familiares disponíveis de doentes com MCD idiopática.	60/281	65%	35
2001, Gavazzi A.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma de todos os familiares disponíveis de doentes com MCD idiopática.	104/472	25%	42
2002, Monserrat L.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma de familiares em 1º grau de doentes submetidos a transplante cardíaco por MCD idiopática ou familiar.	43/199	26% +26%Possível	37
2006, Kushner JD.	Exame clínico, ECG e ecocardiograma dos familiares em 1º ou 2º grau de doentes com MCD idiopática ou familiar e avaliação dos registos clínicos.	304/10518	41% +40%Provável	43

ECG - Electrocardiograma; **MCD -** Miocardiopatia dilatada; **MCDF -** Miocardiopatia dilatada familiar: **NA -** não aplicável.

Associações fenotípicas e os primeiros *loci* identificados

O diagnóstico molecular da miocardiopatia dilatada familiar teve início na década de 90, após a identificação das primeiras mutações em famílias com miocardiopatia hipertrófica [44]. A abordagem inicial incluiu a realização de estudos de associação genética (*linkage*), efectuados em famílias seleccionadas, algumas com manifestações clínicas peculiares.

Em doentes adultos, verificou-se que o padrão de transmissão hereditária mais frequente era o autossómico dominante, mas também poderia ser autossómico recessivo, mitocondrial ou associado ao cromossoma X [45-46]. Por ordem cronológica, foram identificados os seguintes *loci*, nos casos familiares de miocardiopatia dilatada: Xp21 (1993); 1p1-q1 (1994); Xq28, 9q13-q22 e 1q32 (1995); 3p22-p25 e 10q21-23 (1996); 6q23 e 1q11-21 (1997); 2q31 e 2q14-q22 (1999); 6q23-24 e 6q12-q16 (2001); 7p12.1-q21 e 10q25-26 (2006) ([47-61], respectivamente). A presença dos vários padrões de hereditariedade e de *loci* antecipou, desde logo, a variedade de genes que viriam, mais tarde, a ser associados a esta cardiopatia.

Embora, na maioria dos casos, o miocárdio seja o único tecido afectado, uma pequena percentagem de doentes manifesta outro tipo de alterações, ou sub-fenótipos, cujo reconhecimento pode ter implicações prognósticas ou ser útil na orientação inicial do estudo molecular, conforme seguidamente exemplificado.

Miocardiopatia associada a doença precoce do tecido de condução

Em algumas famílias, sem evidência de miopatia esquelética e com risco elevado de morte súbita, o acompanhamento clínico de indivíduos assintomáticos permitiu verificar que as alterações da condução auriculoventricular precedem a dilatação e disfunção sistólica do ventrículo esquerdo [62].

As anomalias electrocardiográficas descritas são variadas e podem estar presentes já na adolescência. Incluem a bradicardia sinusal, bloqueio auriculoventricular, de diferentes graus, fibrilhação auricular, frequentemente com resposta ventricular lenta, a justificar a implantação precoce de pacemaker, extra-sistolia supraventricular ou ventricular frequente e taquicardia ventricular [63]. Neste contexto, a morte súbita e os eventos tromboembólicos são formas de

apresentação clínica. As arritmias podem ocorrer na população pediátrica e há relatos de morte arrítmica apesar da implantação de cardiodesfibrilhador, por fibrilhação ventricular irreversível[64-65]. O estudo electrofisiológico pode ou não revelar alterações nestes doentes [66].

Nesta forma de apresentação clínica, é possível identificar mutações no gene da lâmina A/C em cerca de 30% dos casos [67], sendo a penetrância das mutações geralmente elevada, da ordem dos 90%[68-69]. Depois das primeiras manifestações, a evolução pode ocorrer rapidamente, em 1-2 anos, quer das alterações da condução, quer da disfunção ventricular, podendo exigir a realização de transplante cardíaco em idades jovens. Como as alterações electrocardiograficas são as mais precoces, pode não ser irrelevante a documentação de bloqueio auriculoventricular, mesmo que de 1º grau, num indivíduo com história familiar de miocardiopatia dilatada ou de morte súbita.

Convém lembrar que outros genes foram, entretanto, identificados em famílias com uma evolução clínica semelhante. Por exemplo, a mutação D1275N, no gene da subunidade-α do canal de sódio (SCN5A), foi descrita num caso com disfunção do nó sinusal e taquiarritmias supraventriculares na adolescência, com atraso progressivo da condução auriculoventricular e intraventricular e posterior dilatação e disfunção biventriculares [70]. Curiosamente, a mesma mutação tinha já sido identificada num caso de paralisia auricular precoce [71].

Miocardiopatia associada a miopatia esquelética, com ou sem doença do tecido de condução

Messina [54] e Van der Kooi [55] descreveram quatro famílias em que a miocardiopatia dilatada se associou a lesão do sistema de condução cardíaco e a distrofia muscular das cinturas, com início ou progressão na idade adulta. Apesar de a miopatia ter sido documentada nas biópsias musculares, nem sempre se verificou elevação do valor de creatinocinase sérica.

Famílias como estas, apenas se destacam da generalidade de doentes com distrofias musculares, pelo facto da disfunção cardíaca não ser encarada como uma manifestação tardia ou "secundária", relativamente à miopatia periférica e as alterações da condução serem particularmente evidentes.

Actualmente sabe-se que o envolvimento cardíaco nas miopatias é frequente e pode preceder, suceder ou acompanhar a doença muscular esquelética ou ter um carácter subclínico [72]. A ocorrência de miocardiopatia dilatada é particularmente frequente nas laminopatias (80%), que são responsáveis pela forma autossómica dominante da distrofia muscular de Emery-Dreifuss e distrofia das cinturas tipo 1B, nas distrofinopatias (75-90%), na distrofia miotónica tipo I (77%) e na distrofia muscular das cinturas tipo 2I (55%) [73-76].

Miocardiopatia associada a surdez neuro-sensitiva

Shonberger avaliou duas famílias, caracterizadas pela surdez neuro-sensitiva na juventude e posterior desenvolvimento de miocardiopatia grave. O *locus* foi mapeado no cromossoma 6q23-24 e, posteriormente, foi identificada a mutação em causa: uma delecção de 4 846 pb no gene de um co-activador da transcrição designado por EYA4 [77]. Estudos funcionais efectuados em embriões de *zebrafish* revelaram a importância deste factor no desenvolvimento cardíaco [78].

A HETEROGENEIDADE GENÉTICA

O diagnóstico molecular da miocardiopatia dilatada tem sido efectuado recorrendo a duas estratégias principais: estudos de associação genética, seguidos de clonagem posicional, e pesquisa mutacional em genes candidatos, isto é, genes que codificam proteínas com expressão ao nível do miocárdio [45].

A aplicação da primeira metodologia, a mais efectiva na determinação da causalidade nas doenças monogénicas, tem-se confrontado com algumas dificuldades. O insucesso relativo tem sido parcialmente atribuído ao facto das famílias serem frequentemente pouco informativas do ponto de vista genético, devido, não só, à letalidade da doença, mas também à penetrância incompleta e dependente da idade e à presença frequente de fenocópias em doentes adultos. Apesar de se tratar de argumentos válidos, a possibilidade da miocardiopatia dilatada familiar nem sempre se comportar como uma doença monogénica, isto é, atribuída a uma alteração de um único gene, não deve ser minorada [79].

A segunda metodologia, isto é, a simples sequenciação de genes candidatos, incorre na possibilidade de falsos negativos e positivos, estes últimos devidos, por exemplo, à atribuição da causalidade a meros polimorfismos genéticos. Neste sentido, torna-se necessário corroborar a patogenicidade das mutações identificadas, quer pela demonstração da segregação familiar com a doença, quer através da realização de estudos funcionais, incluindo modelos animais, o que, na maioria dos trabalhos, não tem sido observado.

Presentemente foram reconhecidas mutações em mais de 20 genes distintos (Quadro 3), sendo elas maioritariamente exclusivas ou "privadas" para cada caso-índex ou família [80-81]. Por outro lado, só foi possível concluir o diagnóstico molecular numa minoria de casos, numa percentagem seguramente inferior a 20%, incluindo naqueles com história familiar positiva. Tal implica que outros genes, ainda não identificados, estejam envolvidos na etiopatogenia da doença.

Esta enorme diversidade génica tem dificultado a obtenção de dados conclusivos relativamente à epidemiologia molecular da miocardiopatia dilatada. Apesar disso, os genes da cadeia pesada da β-miosina (MYH7) e da lâmina A/C (LMNA) destacam-se pelas frequências relativas mais elevadas embora, cada um deles, explique apenas 8-10 % dos casos de miocardiopatia isolada, isto é, sem sub-fenótipo associado [67, 82]. Os restantes genes analisados são responsáveis, individualmente, por menos de 5% dos casos familiares ou esporádicos (*idiopáticos*) da doença [83-85].

Apesar da heterogeneidade genética, os resultados acumulados até ao momento, suportam a asserção de que as mutações subjacentes às miocardiopatias dilatadas resultam em proteínas disfuncionais, provavelmente sistematizáveis em 4 grandes grupos: proteínas do citoesqueleto, incluindo componentes do disco-Z do sarcómero, de que são exemplo as mutações descritas na α-actina, desmina, α-Bcristalina, distrofina, δ-sarcoglicano, metavinculina, titina (conectina), proteína LIM muscular e α-actinina [86-93]; proteínas miofibrilares, exemplificadas pelas mutações detectadas na cadeia pesada da β-miosina, troponina T, troponina I, α-tropomiosina e proteína-C de ligação à miosina [94-96]; proteínas do invólucro nuclear, como as mutações da lâmina A/C [97]; proteínas membranares de canais iónicos, tais como o fosfolamban [98].

Quadro 3 | *Loci* e respectivos genes implicados na etiopatogenia da miocardiopatia dilatada genética.

Loci	Gene	Proteína	Doenças atribuídas a mutações do mesmo gene
1q21	LMNA	Lâmina A/C	*Distrofia muscular de Emery-Dreifuss*[100], *distrofia muscular das cinturas tipo 1B*[101], *lipodistrofia parcial*[102], *síndrome progeroide*[103], *doença de Charcot-Marie-Tooth*[104], *dermopatia restritiva*[105], *miocárdio não-compactado*[106].
1q31-q42	PSEN2	Presenilina 2 [99]	*Doença de Alzheimer*[107]
1q32	TNNT2	Troponina T	*Miocardiopatia hipertrófica*[108], *miocardiopatia restritiva*[109]
1q42-q43	ACTN2	α-actinina 2	-
2q12-q14	FHL-2/DRAL	Four and half LIM protein-2 [110]	-
2q31	TTN	Titina	*Miocardiopatia hipertrófica*[111], *miopatia muscular tibial* [112]
2q35	DES	Desmina	*Miopatia esquelética miofibrilar*[113], *síndrome escapulo-peroneal tipo Kaeser* [114], *miocardiopatia restritiva* [115]
3p21	SCN5A	Sub-unidade α do canal de sódio [70]	*Síndrome do QT longo, síndrome de Brugada; doença do nó sinusal*[117]
3p21.3-p14.3	TNNC1	Troponina C [116]	-
5q33	SGCD	δ-sarcoglicano	*Distrofia muscular das cinturas tipo 2E* [118]
6q23-q24	EYA4	Co-activador da transcrição[77]	*Surdez neuro-sensitiva*[119]
6q22.1	PLN	Fosfolamban	*Miocardiopatia hipertrófica* [120]
9q31	FKTN	Fukutina [121]	*Distrofia muscular congénita de Fukuyama* [122], *distrofia muscular das cinturas tipo 2M* [123], *Síndrome de Walker-Warburg* [124]

10q21.1	MYPN	Miopaladina [125]	-
10q22-q23.3	ZASP/LDB3	Proteina 3 de ligação ao domínio LIM [126]	*Miopatia miofibrilar [128], miocardio não-compactado[129]*
10q22.1-q23	VCL	Vinculina	-
	ANKRD1/ CARP	Cardiac ankyrin repeat protein [127]	*Miocardiopatia Hipertrófica[130]*
11p11.2	MYBPC3	Proteina C de ligação à miosina[131]	*Miocardiopatia hipertrófica [132]*
11p15.1	CSRP3	Proteína LIM cardíaca (proteína 3 rica em cisteina e glicina)	*Miocardiopatia hipertrófica [133]*
11q22.3-q23.1	CRYAB	α-Bcristalina	*Cataratas[134], miopatia esquelética miofibrilar [135]*
12p12.1	ABCC9	Sub-unidade do canal de potássio sensível ao ATP [136]	_
12q22	TMPO/ LAP2	Timopoietina [137]	_
14q12	MYH7	Cadeia pesada da β-miosina	*Miocardiopatia hipertrófica [44], miocárdio não-compactado [139], miopatia de armazenamento de miosina [140], miopatia distal de Laing [141]*
14q24.3	PSEN1	Presenilina 1	*Doença de Alzheimer [142], doença cerebral de Pick [143]*
10q25-q26	RBM20	Proteina 20 de ligação ao ARN [138]	-
15q14	ACTC1	α-actina	*Miocardiopatia hipertrófica [144]*
15q22.1	TPM1	α-tropomiosina	*Miocardiopatia hipertrófica [145]*
17q12	TCAP	Teletonina [146]	*Miocardiopatia hipertrófica [146] , Distrofia muscular das cinturas tipo 2G [147]*
19q13.4	TNNI3	Troponina I	*Miocardiopatia hipertrófica [148], miocardiopatia restritiva[149]*
Xp21.2	DMD	Distrofina	*Distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker [151]*
Xq28	TAZ	Tafazina [150]	*Síndrome de Barth [152], miocárdio não-compactado [153]*

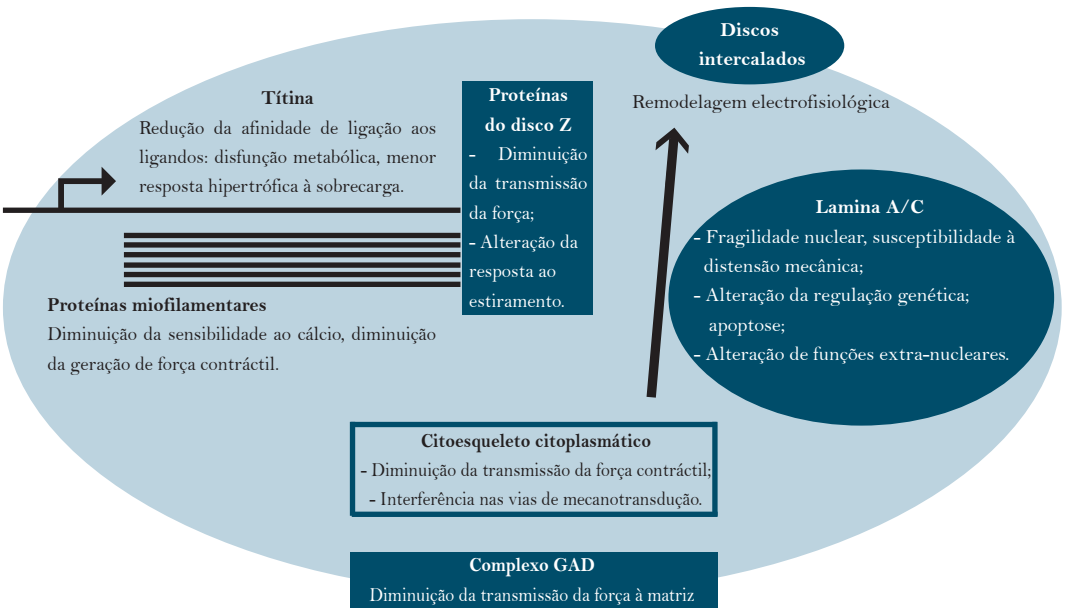
A patogenicidade das mutações

A variedade de genes implicada na miocardiopatia dilatada genética resulta necessariamente no envolvimento de mecanismos patogénicos distintos, cujos detalhes, ao nível das alterações subcelulares e moleculares, persistem por esclarecer (Figura 1).

No entanto, considerando o agrupamento funcional das principais proteínas envolvidas, até ao momento, é possível estabelecer três vias fisiopatológicas principais: defeito na transmissão da força contráctil ou da mecanotransdução, por alterações nas proteínas do citoesqueleto [154-156]; diminuição da geração da força contráctil, devido a mutações em proteínas dos miofilamentos [157]; alteração da expressão génica, secundária a mutações na lâmina A/C [158].

É importante realçar que a doença tem uma penetrância incompleta e a expressão clínica é muito variável e não específica da mutação [159]. Isto indica que outros factores, ainda desconhecidos, de ordem genética ou ambiental, possam desempenhar um papel determinante na etiopatogenia [79].

Figura 1 | Possíveis mecanismos etiopatogénicos envolvidos na miocardiopatia dilatada familiar.



Defeito na transmissão da força contractil ou da mecanotransdução

O citoesqueleto é composto por uma rede intrincada de filamentos e de proteínas acessórias que permite aos cardiomiócitos resistir à sobrecarga mecânica e manter a integridade estrutural dos mesmos [160]. Para além de fornecer resistência mecânica, suporta a membrana celular, posiciona os organelos, participa no transporte intracelular e organiza os miofilamentos contrácteis. Importante é também a função do citoesqueleto como sensor a estímulos biomecânicos, interagindo com múltiplas vias de sinalização intracelular [161].

Classicamente, considera-se constituído por 3 tipos principais de filamentos: os microtúbulos, os filamentos intermediários e os microfilamentos de actina. No miocárdio, as proteínas do sarcolema, que unem o citoesqueleto à matriz extracelular, e a titina, conjuntamente com as suas proteínas associadas no sarcómero, também fazem parte desta estrutura organizativa [162].

Inicialmente, acreditava-se que a miocardiopatia dilatada genética era uma doença predominantemente do citoesqueleto, secundária a um defeito na transmissão da força contráctil [154], sendo a miocardiopatia hipertrófica atribuída a um defeito ao nível da geração dessa mesma força [163]. Esta teoria resultou do facto das primeiras mutações terem sido identificadas nos genes da distrofina [47], actina [87] e desmina [88] e também do conhecimento de modelos animais, com disfunção em proteínas do citoesqueleto, capazes de reproduzir a doença cardíaca humana, nomeadamente o hamster BIO 14.6, com uma delecção do δ-sarcoglicano [164].

Algumas mutações foram sendo analisadas, do ponto de vista funcional, recorrendo a diferentes metodologias e os resultados obtidos permitiram a configuração de modelos fisiopatológicos, genéricos, de lesão dos cardiomiócitos (Figura 1).

Por exemplo, foi possível objectivar a desorganização da estrutura do citoesqueleto, secundária a mutações na desmina e na α-Bcristalina [165-166]. É possível que esta alteração da organização dos filamentos intermediários possa condicionar uma variedade de alterações secundárias, como atenuar a união aos disco-Z [167], modificar a função mitocondrial e induzir a apoptose [165, 168-169] ou diminuir a densidade das junções de hiato ("*gap junctions*") [170].

Nas distrofinopatias, ocorre destabilização do complexo glicoproteico associado à distrofina, o que pode relacionar-se com uma modificação da permeabilidade celular [171-172]. Em doentes com mutações na distrofina e sarcoglicanos observou-se indução de espasmo no músculo liso vascular [173] e diminuição da reserva de fluxo coronário [174], alterações que podem promover, secundariamente, a deterioração da função miocárdica.

O método de ensaio fenotípico de leveduras transformadas tem sido o utilizado para analisar os componentes do citoesqueleto do sarcómero, como a titina e as proteínas com ela relacionada [175]. Com esta metodologia, observou-se que, em geral, nos casos de miocardiopatia dilatada, ocorre

uma redução da afinidade das interacções proteicas. Pelo contrário, em mutações identificadas em doentes com miocardiopatia hipertrófica, ocorre fortalecimento dessas mesmas uniões [146].

Relativamente aos componentes do disco-Z do sarcómero, é possível que as mutações possam não só alterar a transmissão da força contráctil, mas também modificar a resposta ao estiramento [162]. Uma possível interferência pode ser através de vias de sinalização, mediadoras da hipertrofia celular, exemplificadas pela interacção da teletonina com a calsarcina [176] e da proteína ZASP (Z-*band alternatively spliced PDZ-motif protein*) com a proteína cinase C [126]. No caso da proteína FHL-2 (*Four and Half LIM protein-2*), pode ocorrer um menor recrutamento de enzimas metabólicas para o sarcómero, ocasionando disfunção das vias metabólicas e indução de uma menor resposta hipertrófica em condições de sobrecarga [177].

Diminuição da geração da força contráctil

O sarcómero é a unidade contráctil das miofibrilhas, local onde os miofilamentos grosso e fino se interdigitam, lado a lado, dando origem à contracção muscular. Esta resulta das ligações cruzadas e das alterações conformacionais que decorrem da interacção entre a actina e a miosina [178].

O filamento grosso é constituído pela miosina, proteína C de ligação à miosina (MYBPC3) e pela titina. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas (MYH7) e 4 cadeias leves. O domínio globular ou "cabeça" da miosina contém o local de hidrólise do ATP e de ligação à actina. As cadeias leves, reguladora e essencial da miosina, suportam a ligação do domínio globular à restante proteína filamentar [179].

O filamento fino é composto pela actina, tropomiosina e troponina. Esta última regula as interacções entre a actina-miosina e a actividade ATPásica, sendo constituído por três subunidades: a unidade de ligação à tropomiosina (TnT), a de ligação ao cálcio (TnC) e o peptideo inibitório (TnI).

Utilizando modelos *in vitro* de fibras musculares permeabilizadas, foi possível verificar que mutações nos genes da troponina T (TNNT2) e da tropomiosina (TPM), de doentes com miocardiopatia dilatada, diminuem a sensibilidade ao cálcio dos miofilamentos [180-182]. Pelo contrário, na miocardiopatia hipertrófica e, particularmente, na restritiva, tende a ocorrer um aumento desta mesma sensibilidade [183-185].

A redução da sensibilidade ao cálcio atenua a geração de força contráctil. Desconhece-se, contudo, de que forma condiciona as vias de sinalização que estão envolvidas no processo de remodelagem ventricular [186].

Existem também incertezas sobre os mecanismos que provocam a alteração funcional da resposta ao cálcio. Uma das hipóteses é a modificação da fosforilação das proteínas sarcoméricas[187]. Curiosamente, a administração de um agente inotrópico, sensibilizador ao cálcio, foi capaz de melhorar significativamente a função cardíaca e a sobrevida de ratinhos *knock-in* para a mutação ΔK210 do gene TNNT2[188].

Como a troponina é um tampão de cálcio intracelular, um outro mecanismo possível pode ser o da alteração da homeostasia do mesmo, com alteração da expressão génica, por exemplo, via calcineurina [189].

Outra hipótese é a de mutações numa determinada proteína do sarcómero poderem afectar a expressão de outras, originando uma reorganização da estrutura miofibrilar [190].

Alteração da expressão génica

O envelope nuclear é composto por duas membranas, uma externa, em continuidade com o retículo endoplasmático, e uma interna, voltada para o nucleoplasma, onde existem várias proteínas integrais que interagem com a lâmina nuclear e com a cromatina [191].

A lâmina nuclear compreende uma fina rede de proteínas entrelaçadas (20nm), que rodeia a face interna da membrana nuclear, contribuindo para manutenção da integridade e organização espacial das proteínas da membrana nuclear [192]. Além disso, desempenha um importante papel na regulação da síntese de ADN, transcrição de ARN, organização da cromatina e manutenção do estado de diferenciação celular [193].

As lâminas A e B são os principais constituintes da lâmina nuclear [194]. As lâminas do tipo A (A e C) são produtos de *splicing* alternativo do mesmo gene (LMNA A/C) sendo idênticas em 566 aminoácidos [195]. Genes distintos codificam as lâminas B1 e B2 (genes LMNB1 e B2, respectivamente). Pelo menos uma das lâminas, B1 ou B2, é expressa em todas as células, em qualquer momento ou fase do ciclo celular [196]. As lâminas do tipo A são expressas exclusivamente em tecidos diferenciados, embora de forma assíncrona [197]. As células indiferenciadas sintetizam níveis baixos ou indetectáveis de lâmina do tipo A e algumas células proliferativas, em tecidos adultos, também não as expressam, como é o caso das células basais da pele, certas linhagens hematopoiéticas ou células pluripotenciais das criptas vilosas do intestino. Na presença de mutações da lâmina A/C, as células terminalmente diferenciadas, como os cardiomiócitos, estão em desvantagem relativamente a outras, porque não são capazes de compensar a degradação progressiva da lâmina que ocorre naturalmente com a idade [198].

Como as funções da lâmina A/C são específicas de tecido, diferentes mutações podem originar doenças clinicamente muito distintas, como a distrofia muscular esquelética, síndromes progeroides, neuropatia de Charcot-Marie-Tooth ou lipodistrofia parcial [199].

Considera-se que as mutações na lâmina A/C podem afectar directamente a programação genética e, no caso da miocardiopatia, induzir a ocorrência de apoptose.

Num modelo de ratinho, com distrofia muscular e miocardiopatia, a análise da expressão genética por *microarrays* de ARN, demonstrou uma activação precoce da sinalização pelas MAPK, a preceder a presença de marcadores moleculares de miocardiopatia [200].

Mais recentemente, num outro modelo de haploinsuficiência (Lmna+/-), que reproduz a miocardiopatia dilatada humana, verificou-se que as alterações precoces do tecido de condução são devidas a apoptose das células do nó auriculoventricular [200]. O "sequestro" inadequado de c-fos pela lâmina mutada, com desinibição do factor de transcrição AP-1, é uma das vias propostas para a activação das caspases envolvidas na apoptose [201]. A vulnerabilidade particular das células do tecido de condução cardíaco poderá ser atribuída às características moleculares intrínsecas destas células.

Em alguns doentes constata-se, por microscopia electrónica, a presença de dismorfias nucleares, como núcleos irregulares, alongados, com herniações ou deslocação da heterocromatina [202]. Estas alterações apontam para a presença de mecanismos de fragilidade nuclear. Esta hipótese é particularmente interessante quando aplicada às miopatias, uma vez que as forças geradas durante a contracção podem condicionar uma perda preferencial das células que contém os núcleos fragilizados.

Como as membranas nucleares interna, externa e do retículo endoplasmático constituem um sistema membranar contínuo, não é de excluir que as repercussões funcionais das laminopatias possam também ocorrer a um nível extra-nuclear.

Abordagem clínica da miocardiopatia dilatada familiar

Os progressos ao nível do conhecimento da base molecular das miocardiopatias genéticas, não tiveram ainda um reflexo significativo no protótipo de abordagem clínica das famílias afectadas.

Destacam-se, talvez, os seguintes desenvolvimentos: as propostas recentes de nomenclatura das miocardiopatias, que colocam a tónica na separação entre casos genéticos e não genéticos, apenas com base em critérios clínicos [1,12]; a relevância atribuída ao rastreio familiar da doença, mesmo entre os indivíduos assintomáticos [203]; o reconhecimento de alguns sub-fenótipos como marcadores de prognóstico.

Todos estes aspectos têm aprimorado o aconselhamento genético proporcionado aos doentes com miocardiopatia dilatada hereditária ou esporádica.

Diagnóstico e avaliação dos familiares

Actualmente, são ainda utilizadas as recomendações de Mestroni e colaboradores, publicadas em 1999, para o estudo das miocardiopatias dilatadas familiares [6,204-205]. Este documento fornece critérios para o seu reconhecimento na prática clínica, que se baseiam, fundamentalmente, nos achados da história familiar e propõe um algoritmo de estudo complementar dos diferentes elementos familiares, que inclui os parentes assintomáticos (Figura 2).

A investigação do caso-índex deve incluir a realização de radiografia torácica, electrocardiograma, ecocardiograma, prova de esforço, monitorização electrocardiográfica (Holter) e estudo analítico, incluindo o doseamento de creatinocinase.

Outros exames, como a coronariografia ou testes de isquemia não-invasivos, estão especialmente indicados em homens com mais de 40 anos ou na presença de dor torácica ou factores de risco de doença aterosclerótica. Recomenda-se a realização de biópsia endomiocárdica, com o intuito de excluir miocardite ou apenas a presença de genoma vírico, o que pode apontar para outra(s) causa(s) de dano miocárdico.

Outras avaliações sugeridas, algumas de carácter investigacional, são o ECG de alta-resolução, prova de esforço cardiorespiratória, doseamento de auto-anticorpos e de troponina plasmática, avaliação por um especialista em doenças neuromusculares e, eventualmente, biópsia muscular. Este último procedimento deve ser considerado na suspeita clínica de miopatia esquelética, elevação sérica da creatinocinase, electromiografia anormal ou história familiar de doença neuromuscular.

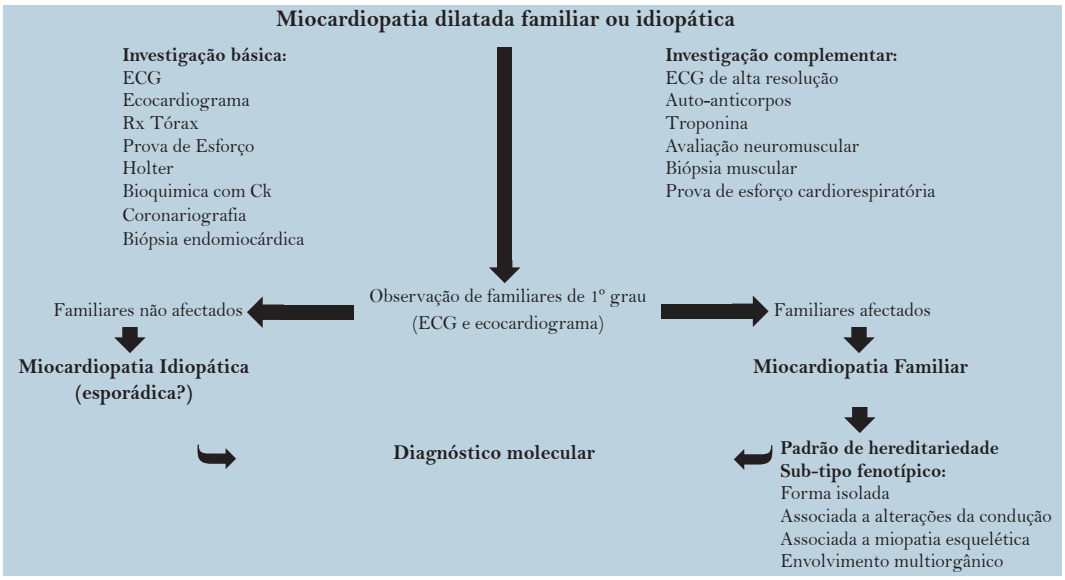
Todos os familiares de primeiro grau do caso-índex devem ser observados, devendo efectuar electrocardiograma e ecocardiograma.

No caso de existir evidência de transmissão familiar da doença, deve ser estabelecido o padrão de hereditariedade e os doentes devem ser classificados, do ponto de vista fenotípico, em 4 subtipos principais: forma isolada; miocardiopatia associada a alterações precoces da condução auriculoventricular; miocardiopatia associada a envolvimento neuromuscular (com ou sem alterações da condução); miocardiopatia com envolvimento multiorgânico.

O envolvimento multiorgânico é mais frequente nas crianças e nos jovens, e nestes é exigido o diagnóstico diferencial de doenças raras, como os erros inatos do metabolismo, designadamente aminoacidopatias, defeitos do metabolismo dos ácidos gordos, glicoproteinoses ou as mucopolissacaridoses [206]. Nas citopatias mitocondriais, cuja presença deve ser considerada se existir transmissão materna, o envolvimento cardíaco foi descrito em diversas síndromes como o de Kearns Sayre, MERRF e MELAS [207-208].

O estudo molecular, especialmente na forma "isolada" de miocardiopatia dilatada, está ainda confinado a centros de investigação [209]. A sua futura aplicabilidade clínica está dependente da disponibilidade de métodos expeditos e pouco onerosos, de pesquisa simultânea de mutações em múltiplos genes e/ou estudos de associação genética.

Figura 2 | Abordagem clínica da miocardiopatia dilatada familiar ou idiopática.



Aconselhamento aos familiares assintomáticos

Na ausência de diagnóstico molecular, todos os familiares assintomáticos estão potencialmente no estádio A da insuficiência cardíaca crónica [210] e, nesta perspectiva, devem ser aconselhados a evitar e/ou a controlar os factores de risco cardiovascular, nomeadamente o consumo excessivo de álcool e devem ser incentivados para a prática de exercício físico regular, moderado.

Devem ser informados de que a doença pode ter uma evolução imprevisível e que os sintomas são muito variáveis, incluindo, não só, os de insuficiência cardíaca, mas também os associados a perturbações do ritmo.

O facto do rastreio inicial não mostrar alterações, não exclui a possibilidade de doença, uma vez que a expressão clínica depende da idade e também não exclui a transmissão à descendência, existindo um risco de 50%, na forma mais comum, autossómica dominante [46].

As mulheres devem ser observadas durante a gravidez, sobretudo no último trimestre e nos primeiros 6 meses após o parto, altura em que é frequente a manifestação clínica da doença.

A periodicidade das reavaliações dos indivíduos assintomáticos depende dos achados da observação basal. Segundo Crispell, recomenda-se que os familiares sejam reavaliados cada 3 a 5 anos, se apresentarem electrocardiograma e ecocardiograma normais, e cada 1 a 3 anos, na presença de anomalias *minor* ou sintomas [211-213]. O aparecimento de qualquer sintoma cardiovascular deve implicar uma rápida reavaliação clínica [62].

Questões actuais

Sumariando algumas questões anteriormente referidas, pode dizer-se que, do ponto de vista clínico, é importante reconhecer-se que a miocardiopatia dilatada pode ter uma origem genética e que, portanto, pode ser transmitida à descendência; que, actualmente, este diagnóstico etiológico é praticamente de exclusão, isto é, depende do reconhecimento de uma história familiar positiva, na ausência de outra causa identificável para a miocardiopatia; a penetrância é incompleta e a expressão clínica é muito variável; o diagnóstico molecular é complexo e não tem ainda aplicação clínica generalizada.

Para além destes conceitos gerais, muitas questões persistem ainda por esclarecer em torno desta temática, nomeadamente aquelas que a seguir se inumeram, e sobre as quais se desenvolveram alguns dos trabalhos inseridos no projecto de investigação subjacente a esta dissertação.

Será a miocardiopatia dilatada familiar uma doença monogénica ou predominantemente poligénica e multifactorial?

Com base em dados de ordem clínica e molecular, sabe-se que a expressão fenotípica da miocardiopatia parece depender da conjunção de outros factores, para além da mutação patogénica, cujo contributo relativo é desconhecido e provavelmente variável de caso para caso.

Por um lado, o tipo de miocardiopatia (dilatada, hipertrófica ou restritiva) não é específico de gene [214], nem mesmo da mutação [159, 215-216]; dentro de cada família, a expressão clínica pode ser muito variável, desde a morte súbita na infância, à insuficiência cardíaca na adultez, controlada ou não com a medicação; a penetrância é incompleta, e portanto, nem todos os portadores manifestam a doença [217]; a idade, e em alguns casos, o género [218], modulam as manifestações clínicas; frequentemente, o diagnóstico coincide com eventos, como a gravidez [22, 219] e quadros infecciosos [220-221], o que faz supor que factores hemodinâmicos, inflamatórios ou imunológicos [222], possam desempenhar um papel determinante na expressão da doença [46, 223].

A análise simultânea do contributo destas diferentes variáveis, genéticas e não genéticas, é complexa, mas é também fundamental para a compreensão da etiopatogenia desta entidade nosológica.

No caso de ser efectuado o diagnóstico molecular, quais os genes que devem ser analisados prioritariamente?

Contrariamente ao que já se conhece sobre a base molecular da miocardiopatia hipertrófica, em que o diagnóstico genético é possível em 50 a 60% dos doentes, sendo os dois principais genes envolvidos, o MYH7 e MYBPC3 [224-225], na miocardiopatia dilatada familiar a epidemiologia molecular é ainda desconhecida.

A probabilidade de identificar uma mutação, em doentes adultos com a forma "isolada" da doença, analisando, por exemplo, 20 dos genes descritos, é inferior a 40%, facto que torna o diagnóstico genético complexo e oneroso [83, 226-227]. Actualmente, não é possível excluir que outros (s) gene (s) sejam mais importantes na etiopatogenia da doença, que todos aqueles até agora identificados. Por exemplo, não dispomos de resultados da análise da totalidade de um gene, candidato por excelência, como o da titina, devido à dificuldade técnica que ainda existe, em analisar um gene com 363 exões [92, 228].

A metodologia que se mantém mais eficaz na identificação de novos genes, continua a ser a realização de estudos de associação genética (*linkage*) em famílias individuais, o que nem sempre é possível, devido à presença de um número reduzido de elementos familiares informativos, de um ponto de vista genético.

Hoje em dia, a maioria dos laboratórios opta por iniciar a análise pelos genes MYH7 e TNNT2, não só pela sua frequência relativa nos casos de miocardiopatia dilatada, mas também por fazerem parte do portefólio do diagnóstico molecular da miocardiopatia hipertrófica. O gene LMNA também tem merecido especial atenção, devido às implicações prognósticas associadas às respectivas mutações[229].

Como devem ser investigados os familiares assintomáticos e informados acerca do risco individual de desenvolver a doença?

A investigação clínica, envolvendo os familiares e/ou portadores assintomáticos, reveste-se de particular interesse pelo contributo que pode ter para o entendimento da história natural da miocardiopatia dilatada genética.

O seguimento daqueles sem critérios definitivos da doença, pode permitir esclarecer o papel de factores moduladores da expressão clínica e identificar marcadores precoces de prognóstico. Sabe-se que estes indivíduos podem apresentar uma variedade de alterações subclínicas, mas não necessariamente pré-clínicas, detectáveis no ecocardiograma[212-213, 230-231], electrocardiograma[232] e outro tipo de exames[233-238], cujo significado patológico é incerto, e as implicações terapêuticas ainda nulas.

Para o clínico, sobretudo numa altura em que a genética não fornece um diagnóstico conclusivo na maioria dos casos, são bem-vindas todas as estratégias que permitam reconhecer os indivíduos em risco, de forma a optimizar as estratégias de vigilância clínica e/ou terapêutica. Basear uma estimativa de risco de evolução da doença, apenas em alterações da morfologia ventricular parece ser insuficiente, aguardando-se por métodos funcionais, que permitam identificar os mecanismos incipientes associados ao processo de remodelagem ventricular. De certa forma, esta possibilidade seria o equivalente à detecção de alterações pré-malignas em modelos de progressão neoplásica.

Uma das perspectivas futuras é a de que, o início precoce da terapêutica médica, nomeadamente com antagonistas dos sistemas neuro-hormonais, possa vir a constituir uma estratégia capaz de modificar a história natural da doença.

Devem os doentes com distrofias musculares, e sem envolvimento cardíaco aparente, ser encarados, em termos de risco, como os familiares (portadores) assintomáticos de doentes com miocardiopatia dilatada dita "isolada"?

Os resultados da investigação molecular vieram estabelecer uma relação estreita entre os doentes com miocardiopatias genéticas e aqueles com miopatias primárias do músculo esquelético [72]. A definição recente de miocardiopatia familiar inclui precisamente a existência de um parente com a mesma doença cardíaca ou então, com um fenótipo que pode ser atribuído à mesma mutação patogénica, como são as miopatias primárias [1].

Atendendo às similaridades em termos de etiopatogenia, é plausível admitir que as conclusões dos estudos que envolvam familiares assintomáticos de doentes com miocardiopatia "isolada" possam vir a ser extrapoladas para o conjunto de doentes com distrofias musculares e sem envolvimento cardíaco aparente, nomeadamente em questões como a estratificação de risco, diagnóstico e/ou medidas terapêuticas precoces.

Embora a frequência de distrofias musculares seja da ordem de 1:10 000, estes doentes representam uma percentagem, não desprezível, da totalidade de casos de miocardiopatia dilatada [239].

A terapêutica médica convencional da insuficiência cardíaca oferece aos doentes com miocardiopatia dilatada genética os mesmos benefícios?

Desconhece-se se a resposta terapêutica dos doentes com miocardiopatia dilatada genética, nomeadamente aos antagonistas neuro-hormonais, é distinta da generalidade dos casos de origem não-genética.

Conforme demonstrado em alguns modelos animais, a presença de polimorfismos ou mutações patogénicas é capaz de condicionar o tipo de resposta farmacológica [188]. No futuro, o diagnóstico molecular das miocardiopatias poderá vir a ser útil no aconselhamento genético, estratificação de risco e também na escolha das opções terapêuticas, nomeadamente em medidas de carácter farmacogenético.

Qual a prevalência da miocardiopatia dilatada de origem genética?

Apesar dos inúmeros trabalhos efectuados com o objectivo de responder a esta questão, não é conhecida a verdadeira prevalência de casos de origem genética, sendo esta pergunta uma das mais difíceis de responder na actualidade, dada a ausência de marcadores etiológicos específicos.

Considerando a frequência de miocardiopatia dilatada de 1:2 500 [4] e sendo 25% a 50% de origem genética, a prevalência da doença familiar enquadra-se actualmente nos valores atribuídos às doenças consideradas raras, na população geral.

Objectivo

Na presente dissertação intitulada **"Miocardiopatia dilatada familiar: determinantes da expressão clínica"** expõem-se dados relativos a características clínicas, imagiológicas e moleculares de famílias afectadas pela doença.

Tendo em conta algumas das questões atrás referidas, os objectivos da investigação visaram contribuir para o conhecimento desta cardiopatia, a dois níveis distintos:

1 Expandir a caracterização molecular da miocardiopatia dilatada genética;

2 Aprofundar a caracterização clínica, nomeadamente identificar marcadores de risco de progressão da doença.

Material e Métodos

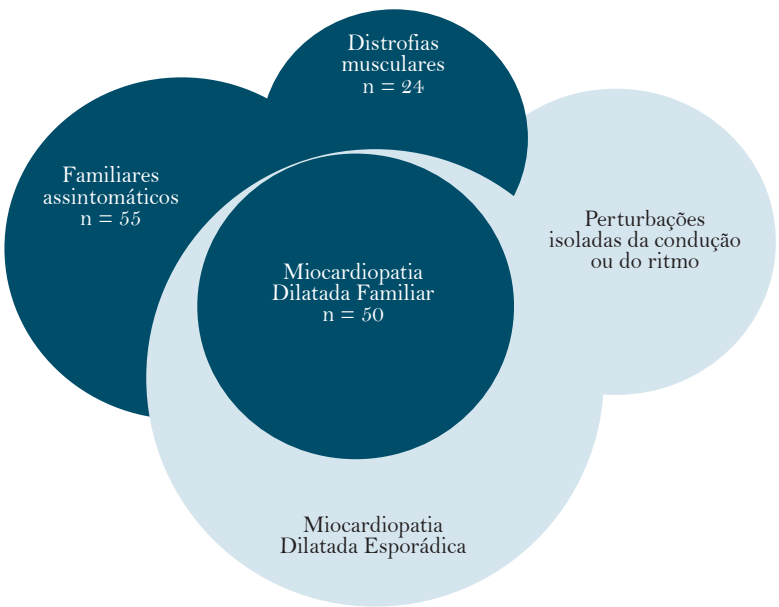
Seguidamente, apresenta-se, de forma simplificada, a população seleccionada e a metodologia utilizada nos trabalhos efectuados, estando a descrição pormenorizada dos mesmos contida nas respectivas publicações.

O projecto de investigação foi submetido à apreciação da Comissão de Ética do Hospital de São João, tendo sido obtido o consentimento informado escrito, de todos os familiares observados, de acordo com as normas da Declaração de Helsínquia[240].

População

Incluímos, como população alvo da investigação, 3 grupos distintos de indivíduos, aos quais se associa a presença de maior risco de morte súbita e de insuficiência cardíaca, de causa genética (Figura 3).

Figura 3 | A azul assinalam-se os diferentes grupos de indivíduos avaliados.



Os números apresentados representam a população total de doentes e familiares distintos observados, não necessariamente aqueles submetidos às diferentes avaliações do protocolo de investigação.

Casos familiares de miocardiopatia dilatada

Doentes com miocardiopatia dilatada

Os doentes, com critérios de miocardiopatia dilatada familiar (n=50; 33 famílias), foram observados na consulta de insuficiência cardíaca e transplante, do Serviço de Cardiologia do Hospital de São João, entre Janeiro de 2000 e Janeiro de 2009. Cerca de metade dos casos foram identificados a partir da revisão de 370 processos clínicos de pacientes com insuficiência cardíaca, de diferentes etiologias; os restantes foram sendo incluídos durante o tempo de duração do projecto.

Na aplicação dos critérios de inclusão e de exclusão dos casos-índex, foram tidas em consideração as normas propostas pela Sociedade Europeia de Cardiologia para o diagnóstico da miocardiopatia dilatada familiar[6].

Critérios de inclusão

Foram incluídos, como casos-índex, os doentes que cumpriram as seguintes condições:

- Diagnóstico de miocardiopatia dilatada "idiopática" **e** presença de dois ou mais indivíduos **afectados** na mesma família **ou** familiar, em primeiro grau, com morte súbita inexplicada, antes dos 35 anos de idade.

Critérios de exclusão

- Evidência de miocardiopatia secundária ou específica, de acordo com as definições do seguinte quadro.

Quadro 4 | Critérios de exclusão.

Doença coronária: história de enfarte do miocárdio ou estenose igual ou superior a 50% num vaso epicárdico *major*.
Hipertensão arterial: valor confirmado, em diferentes avaliações, de pressão arterial sistólica superior a 160 mmHg e/ ou diastólica superior a 100 mmHg, uso de terapêutica hipotensora ou lesão de orgão-alvo.
História de consumo excessivo de álcool: superior a 80g/dia nos homens e superior a 40g/dia nas mulheres.
Doença valvular intrínseca (não inclui a insuficiência mitral secundária a dilatação do anel auriculoventricular).
Miocardite: secundária a agentes infecciosos ou drogas (ex. cocaína).
Miocardiopatia de stress ("Tako-Tsubo"): disfunção sistólica transitória e regional do ventrículo esquerdo, envolvendo os segmentos médio-apicais , na ausência de estenoses significativas das artérias epicárdicas.
Doença metabólica ou endócrina (inclui a diabetes *mellitus*).
Doenças infiltrativas (ex.amiloidose) ou de **armazenamento** (ex. hemocromatose, doença de Fabry).
Doença auto-imune ou do tecido conjuntivo (Lúpus Eritematoso Sistémico, dermatomiosite, artrite reumatóide, esclerodermia, poliarterite nodosa).
Doença cardíaca congénita
Cor pulmonale
Doença do pericárdio
História de irradiação do tórax, exposição a antraciclinas ou ciclofosfamida

Quadro adaptado de: *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies* [3];*Contemporary definitions and classification of cardiomyopathies*[12];*Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases*[1].

Familiares assintomáticos

A todos os casos-índex foi disponibilizada a observação dos familiares em primeiro grau, desde que estes se mostrassem receptivos em participar no estudo, tendo sido, na totalidade, observados 55 familiares assintomáticos.

Sempre que identificado um novo caso de disfunção ventricular, a avaliação da família expandiu-se, muitas vezes englobando a observação de indivíduos de diferentes gerações. Nas famílias numerosas, e com o objectivo de definir o padrão de transmissão hereditária, foi construída uma árvore genealógica, sendo a caracterização fenotípica dos diferentes membros, efectuada utilizando os critérios apresentados na tabela 1, da Introdução.

Doentes com distrofias musculares (com e sem manifestações cardíacas)

Com o objectivo de estabelecer correlações genótipo-fenótipo, incluímos a avaliação de 24 doentes com diferentes tipos de distrofias musculares, a maioria dos quais (75%) com diagnóstico molecular estabelecido. Os doentes foram referenciados a partir da consulta de doenças neuromusculares do Hospital de São João, de forma consecutiva, durante o ano de 2003.

Métodos

Caracterização molecular da miocardiopatia dilatada genética

Pesquisa de mutações, em genes candidatos, nos casos-índex de miocardiopatia dilatada familiar. (IPATIMUP -Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto)

Aos doentes com miocardiopatia dilatada familiar, foi colhida uma amostra de sangue periférico, em tubo com EDTA, para extracção de ADN, que foi amplificado utilizando a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

Nessas amostras, foram analisados os genes da cadeia pesada da β-miosina (MYH7), troponina T cardíaca (TNNT2) e fosfolamban (PLN).

Relativamente ao gene MYH7, foram pesquisadas mutações, apenas nas sequências exónicas, em 45 casos-índex. Utilizou-se o método de PCR-SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*), que permite detectar variações genéticas, de apenas 1 pb [241]. Este método baseia-se na migração diferencial de ADN cadeia simples, num gel não-desnaturante de poliacrilamida. O padrão de bandas obtido serve como método de rastreio de variações genéticas, sendo sequenciadas as amostras com padrão anormal.

A análise do gene TNNT2 foi inicialmente orientada para a identificação de uma delecção específica, no exão 13, designada por K210del. Para tal, foi utilizada a técnica de interpretação de electroferogramas, que permite revelar diferenças alélicas de peso molecular, de segmentos amplificados e submetidos a electroforese capilar. Posteriormente foi efectuada a sequenciação dos produtos com peso molecular diferente do esperado. Nesta avaliação, para além de 27 casos-índex (2 de origem Moçambicana), foram incluídas amostras de 40 doentes com miocardiopatia dilatada "idiopática" e de 100 indivíduos normais, não aparentados.

Numa fase ulterior, expandiu-se a pesquisa de mutações aos restantes exões do gene TNNT2, utilizando a mesma técnica de SSCP-sequenciação.

Relativamente ao gene do fosfolamban (PLN), foi efectuada a sequenciação directa do segundo e único exão codificante, em 13 casos familiares e 37 idiopáticos.

Análise de associação genética (linkage) numa família numerosa. (Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University of Würzburg)

Numa família multigeracional, foi obtido ADN de todos os parentes disponíveis (n= 52, incluindo os cônjugues) e efectuado a análise de associação genética ou de *linkage*, com o objectivo de identificar o *locus* e, posteriormente, o gene e a mutação associados à doença.

As regiões codificantes de 3 genes candidatos (laminina β1-LAMB1, laminina β4 -LAMB4 e phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide-PIK3CG), contidos no *locus* identificado (7q22.3-31.1), foram sequenciadas.

Diagnóstico molecular nos doentes com distrofias musculares

Nos doentes com distrofias musculares, o diagnóstico genético tinha sido obtido em 18 dos 24 casos, e incluiu a análise dos genes da distrofina, da *Dystrophia Myotonica Protein Kinase* (DMPK) e do *locus* da distrofia facioescapulohumeral (avaliado pela quantificação do número de unidades de repetição D4Z4), na região 4q35.

Nas distrofias das cinturas, o estudo molecular foi precedido pela análise da expressão de distrofina, sarcoglicanos e disferlina, por imunocitoquímica do músculo esquelético.

É de salientar que a pesquisa de mutações no gene da lâmina A/C não era efectuada à data da execução de trabalho, apesar de se saber, actualmente, que as laminopatias, juntamente com as distrofinopatias e sarcoglicanopatias β, δ e γ[72, 242-243], carecem de seguimento cardiológico prioritário.

Caracterização clínica e identificação de marcadores de risco nos casos familiares de miocardioptia dilatada

Avaliação basal

Na primeira consulta de inclusão no estudo, para além da história clínica e do exame físico, todos os indivíduos efectuaram ecocardiograma transtorácico e electrocardiograma de 12 derivações, exames indispensáveis para a caracterização fenotípica.

Os ecocardiogramas foram efectuados pelo mesmo cardiologista, utilizando um aparelho Hewlett Packard Sonos 5500, sendo as imagens registadas em suporte vídeo VHS. A medição das cavidades cardíacas foi efectuada de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia[244].

Avaliação complementar

Numa segunda fase do projecto, elementos de 23 famílias distintas (n= 45), incluindo doentes e familiares assintomáticos, foram submetidos a uma avaliação complementar que incluiu: a realização de cintigrafia cardíaca com metaidodobenzilguanidina-Iodo-123 (^{123}I-MIBG), com o objectivo de caracterizar a actividade adrenérgica cardíaca; ressonância magnética cardíaca, para documentar a presença de fibrose miocárdica e monitorização electrocardiográfica contínua de 24 horas (Holter), para análise dos parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca.

Os diferentes resultados obtidos foram correlacionados entre si e também com as características e a evolução clínica dos doentes.

Cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG (n=45)

Este exame foi realizado no serviço de Medicina Nuclear do Hospital de São João, utilizando uma Gama Câmara GE Millennium MG.

Foram obtidas imagens planares, aos 20 minutos e 4 horas, após a injecção de 370 MBq de ^{123}I-MIBG. Os índices calculados, nas imagens torácicas anteriores, foram a razão coração/mediastino e a taxa de *washout* [245]. As quantificações foram efectuadas por dois operadores e os resultados finais obtidos pela média das duas avaliações.

Foram também adquiridas imagens tomográficas, processadas com o *software* QGS/QPS®, sendo avaliada a captação regional de ^{123}I-MIBG, utilizando uma escala de cor semi-quantitativa e de acordo com a divisão em 5 e 20 segmentos do ventrículo esquerdo [246-247].

Ressonância magnética cardíaca (n=40)

Este exame foi efectuado no Serviço de Radiologia do Hospital de São João, utilizando um scanner 3 Tesla (Magneton trio, Siemens) e as imagens interpretadas, por consenso, entre um radiologista e um cardiologista.

A quantificação dos volumes ventriculares, fracção de ejecção e massa ventricular esquerda foi realizada utilizando uma marcação semi-automática dos bordos endocárdico e epicárdico de ventrículo esquerdo, em imagens *cine*, com recurso ao *software* Argus, Siemens Medical Solutions®.

Foram obtidas imagens, em eixo-curto e eixo-longo, 10 a 15 minutos após a administração intravenosa de gadolíneo, para avaliação do padrão de realce tardio.

Estudo Holter- parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca (n=45)

O estudo Holter, de 24 horas, foi efectuado num registador DigiTrack-Plus (Philips Medical Systems, USA) e a análise realizada utilizando o *software* Philips Zymed Holter, Model 1810 Plus®.

Os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca foram avaliados, por dois observadores independentes, e calculados de acordo com as recomendações da Task Force of the North American Society of Pacing and Electrophysiology [248].

Resultados

CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO INCLUÍDA NOS TRABALHOS PUBLICADOS

CASOS FAMILIARES DE MIOCARDIOPATIA DILATADA

Doentes com miocardiopatia dilatada

- n = 50 (33 famílias distintas)
- Fenótipo:
  Miocardiopatia "isolada" - 47
  Miocardiopatia associada a defeitos da condução ou arritmias "precoces" - 3

Características basais:

- Sexo: 34 (68%) homens
- Idade: 40 ±12 anos
- Classe NYHA: I-25%, II-65%, III-10%
- Bloqueio de ramo esquerdo: 18 (36%); Fibrilhação auricular: 6 (12%)
- Fracção de ejecção: 28±12%; diâmetro telediastólico do ventrículo esquerdo: 65±10 mm; aurícula esquerda: 46±9 mm.

Características durante o tempo de seguimento:

- Terapêutica efectuada: Inibidores da enzima de conversão da angiotensina ou antagonistas do receptor da angiotensina-100%; Bloqueadores-beta: 85%; Espironolactona: 52%
- Sobrevida aos 5 anos: 68%
- Eventos *major*, durante os 8 anos de observação do estudo: 9 doentes transplantados, 4 falecidos, 1 implantação de cardiodesfibrilhador (CDI) para prevenção secundária de morte súbita.
- Diagnóstico molecular em 2 famílias distintas:
  Uma mutação: Δ210K na TNNT2
  Um novo *locus*, no cromossoma 7q22.3-31.1
- Hiperactividade adrenérgica, documentada na cintigrafia cardíaca com 123I-MIBG: n= 30/35
- Fibrose miocárdica, detectada por ressonância magnética cardíaca: n= 8/30
- Disfunção ventricular direita detectada por ressonância magnética cardíaca: n=8/30

Familiares assintomáticos (sem critérios de doença): n=55

- Elevação do valor de BNP: n= 0/55
- Hiperactividade adrenérgica documentada na cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG: n= 6/10 (4 portadores do *locus* da doença e 2 sem diagnóstico molecular estabelecido)
- Fibrose miocárdica, detectada por ressonância magnética cardíaca: n= 0/10

DOENTES COM DITROFIAS MUSCULARES n= 24

- Sexo: 16 homens
- Idade: 33±11 anos
- Idade de diagnóstico da miopatia: 23±12 anos
- Diagnóstico genético: 18 (75%) doentes
- Alterações do ECG: 14 (58%)
  Bloqueio de ramo esquerdo: 1 (4%); Fibrilhação auricular: 1 (4%)
- Doentes com miocardiopatia dilatada ou evidência de remodelagem ventricular: 6 (25%).
  Fracção de ejecção: 37±11%; diâmetro telediastólico do ventrículo esquerdo: 60±5 mm; aurícula esquerda: 42±2 mm.
- Mutações identificadas nos doentes com alterações ecocardiográficas:
  - Três delecções da distrofina
  - Uma delecção das unidades de repetição D4Z4, no *locus* 4q35
  - Uma amplificação do tripleto CTG, no gene DMPK (*Dystrophia Myotonica Protein Kinase*).
- Elevação do valor de NT-Pro BNP: 3 doentes
- Elevação do valor de Troponina I: 1 doente

PUBLICAÇÕES

Os trabalhos incluídos nesta dissertação foram organizados, de acordo com os objectivos da mesma, da seguinte forma:

Quais os genes implicados na patogenia da miocardiopatia dilatada genética?

1 A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.

2 Familial dilated cardiomyopathy with Troponin T K210del mutation.

3 Left ventricular function in adults with muscular dystrophies: genotype-phenotype correlations.

Qual o prognóstico dos indivíduos afectados e qual a importância da caracterização neuro-hormonal, na estratificação de risco dos diferentes elementos familiares?

4 Survival of patients with familial dilated cardiomyopathies on optimal heart failure therapy.

5 ^{123}I-MIBG cardiac uptake imaging in familial dilated cardiomyopathy.

6 ^{123}I-MIBG and cardiac adrenergic activity in familial dilated cardiomyopathy .

Como anexos, incluem-se os seguintes artigos relacionados:

I Artigo de revisão: Familial dilated cardiomyopathy.

II Perspectivas futuras: Portuguese study of FAmilial dilaTed cardIoMyopAthies: The Fatima study.

A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathi maps to chromosome 7q22.3-31

Hum Genet (2005) 118: 451 457
DOI 10.1007/s00439-005-0064-2

ORIGINAL INVESTIGATION

Jost Schönberger · Leif Kühler · Elisabete Martins
Tom H. Lindner · Jose Silva-Cardoso
Michael Zimmer

A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1

Received: 8 July 2005 / Accepted: 25 August 2005 / Published online: 14 October 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Inherited dilated cardiomyopathy (DCM) is a genetically and phenotypically very heterogeneous disease. DCM is caused by mutations in multiple genes encoding proteins that are involved in force generation, force transmission, energy production and several signalling pathways. Thus, the pathophysiology of heart failure is complex and not yet fully understood. Familial forms of DCM let the way to identify new key proteins by positional cloning and to study respective pathomechanisms that are critical for normal cardiac function, but may not have been correlated with heart disease before. Here we report a three-generation pedigree including 16 individuals affected by dilated cardiomyopathy without additional phenotypes. The pedigree is consistent with autosomal-dominant inheritance and age-related penetrance. A genome-wide linkage analysis excluded linkage to all known DCM genes and loci, whereas several close markers on chromosome 7q22.3-31.1 segregated with the disease (maximum logarithm of odds score, 4.20 at D7S471 and D7S501). The disease causing mutation lies in a 9.73 Mb interval between markers D7S2545 and D7S2554 that contains no known cytoskeletal genes. Coding exons of the candidate genes LAMB1, LAMB4 and PIK3CG were screened but no mutations were identified.

Jost Schönberger, Leif Kühler, and Elisabete Martins authors contributed equally to the work

J. Schönberger · L. Kühler · T. H. Lindner · M. Zimmer (✉)
Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University of Würzburg, Grombühlstr. 12, 97080 Würzburg, Germany
E-mail: zimmer@klin-biochem.uni-wuerzburg.de
Tel.: +49-931-3293619
Fax: +49-931-3293630

J. Schönberger · T. H. Lindner
Department of Medicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany

E. Martins · J. Silva-Cardoso
Department of Cardiology, Hospital de S. João, Porto Medical School, Porto, Portugal

Introduction

Heart failure is a major public health problem due not only to its high prevalence, morbidity and mortality but also to the major economic burden it represents (Remme and Swedberg 2001; Hunt et al. 2001). It is estimated that there are 50 million people with suspected or confirmed heart failure in Europe and neighbouring countries (Cleland et al. 2002) with steadily increasing numbers. Despite the development of effective new therapies for heart failure, such as angiotensin-converting enzyme inhibitors, beta-blockers, and cardiac transplantation, the prognosis for patients with this condition remains poor, and deaths have more than doubled in 14 years (Braunwald 1997). A better understanding of the complex pathophysiology of heart failure is required for the development of novel and more specified treatment strategies.

Idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) is an intrinsic muscle disease characterized by left ventricular systolic dysfunction and dilation that cannot be explained by known causes of heart failure. DCM is an important cause of heart failure and is one of the two most important indications for cardiac transplantation (Taylor et al. 2003). Of all DCM cases 25 30% are familial with mostly autosomal-dominant patterns of inheritance (Goerss et al. 1995; Grunig et al. 1998; Keeling et al. 1995). Familial DCM can be an isolated disease or it is accompanied by other phenotypes. Additional features can be cardiac phenotypes such as conduction system disease and mitral valve prolapse, or extra-cardiac phenotypes such as skeletal muscle disease or hearing loss.

In families where DCM is inherited as a Mendelian trait, the causative disease genes can either be identified by positional cloning or by candidate gene approaches. DCM causing mutations have been identified in the genes for cardiac troponin T (Kamisago et al. 2000), titin (Gerull et al. 2002), δ-sarcoglycan (Tsubata et al. 2000), phospholamban (Schmitt et al. 2003), cardiac

;muscle-LIM-protein (Knoll et al. 2002), cardiac β-myosin heavy chain, cardiac actin (Kamisago et al. 2000), α –tropomyosin (Olson et al. 2001), metavinculin (Olson et al. 2002) and lamin A/C (Fatkin et al. 1999) for purely cardiac phenotypes and in desmin (Li et al. 1999), α-dystrobrevin (Ichida et al. 2001), desmoplakin (Norgett et al. 2000), dystrophin (Ortiz-Lopez et al. 1997), EYA4 (Schonberger et al. 2005), tafazzin (Bione et al. 1996) and cypher (Vatta et al. 2003) for DCM with extra-cardiac phenotypes.

The fact that many DCM disease genes encode cytoskeletal proteins has led to the hypothesis that DCM is generally caused by defective force transmission from the sarcomere to the plasma membrane (Bowles et al. 2000). However, as mutations in the nuclear envelop protein lamin A/C, the transcription factor EYA4, and taffazin also cause DCM, the pathological pathways turn out to be more complex.

In addition to the known DCM genes listed above, disease loci have been reported at chromosomes 2q14-22 (Jung et al. 1999), 6q12-16 (Sylvius et al. 2001), 6q23 (Messina et al. 1997), 9q13-22 (Krajinovic et al. 1995), and 10q21-23 (Bowles et al. 1996), but the respective disease genes have not been identified yet.

Here we report a Portuguese family with autosomal-dominant inheritance of isolated DCM and mapping of a new DCM locus to the chromosomal region 7q22.3-31.1. The identification of the disease gene at this locus can provide substantial insight into the pathophysiology of human heart failure.

Methods

Subjects and clinical evaluations

Studies were approved by the ethical committees of the Universities of Wuerzburg and Porto. All family members were evaluated by clinical history taking, physical examination, 12-lead ECG and transthoracic 2D-echocardiography. Echocardiographic measurements of left ventricular cavity dimensions were determined from M-mode tracings recorded by the same observer. DCM in the familial context was diagnosed on the basis of a left ventricular end-diastolic dimension >95th percentile plus a fractional shortening <28%, or if the left ventricular dimension alone was above the ninety-eight percentile (gender specific) of a broad population sample ($n=4957$), in the absence of known systemic or other cardiovascular causes of heart failure (Manolio et al. 1992; Vasan et al. 1997). The disease status of deceased individuals was based on medical records or, if unavailable, on reports by family members.

Genetic studies

Genomic DNA for linkage studies was isolated from peripheral blood lymphocytes by phenol chloroform extraction and subsequent ethanol precipitation. Genotyping was performed using the Marshfield STRP screening set, version 10, that is composed of short tandem repeat markers with an average marker interval of 9 cM (Map pairs® version 10.0, Invitrogen, Carlsbad, CA). Polymerase chain reactions (PCR) were carried out with 20 ng of genomic DNA in a 10 µl reaction, using fluorescence labeled primers and standard reagents for standard reaction times. Touch-down protocols were used to maximize specificity. Reaction products were pooled and mixed with size standards according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Foster City, CA). Product lengths were determined on a 6% denaturing polyacrylamide gel on an ABI377 with Genescan®and Genotyper® software (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Markers that failed to amplify with appropriate quality were replaced by closely linked markers.

Logarithm of the odds (LOD) scores were determined by two-point linkage analysis using the FASTLINKv4.1 (Cottingham et al. 1993) module of easyLINKAGEv2.10 (Lindner and Hoffmann 2005) assuming a penetrance of 100% with no phenocopies allowed, and a disease allele frequency of 0.1%. Marker allele frequencies were estimated to be equally distributed. The order of the loci used for haplotype construction was based on the order in dense genetic maps (Broman et al. 1998; Kong et al. 2002) and was confirmed on the human genome sequence assembly (http://genome.cse.ucsc.edu). Haplotype reconstruction was aided by MERLIN software (Abecasis et al. 2002). Genes in the candidate region were assigned from the human genome sequence assembly.

Mutation analysis of LAMB1, LAMB4 and PIK3CG

The genomic structure of the candidate genes was determined by alignment of mRNA sequences with the genomic DNA sequence. Primers for the amplification of coding exons were placed at a distance of at least 50 bp from exon intron boundaries. Primer sequences are available upon request. After amplification, *ExoSAP-IT*® (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England) was added to the PCR reactions and incubated according to the manufacturer's instructions to digest excess dNTPs and primers. Direct sequencing of PCR-fragments was performed on both strands using PCR primers and BigDye® Terminator v3.0 or v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reactions were analyzed on an ABI 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Results

Phenotypic analysis of the DCM family

The heritability of idiopathic DCM in this Portuguese family became evident when the index patient II-6 and

his nephew III-8 were seen in the same heart failure clinic, and it was subsequently confirmed by clinical investigation of all available family members (Fig. 1). The clinical status of all affected individuals is summarized in Table 1. Both founders of the pedigree were already deceased and could not therefore be examined, but subject I-1 was reported with a longstanding history of dyspnoea and edema (Table 1). Of the seven individuals in the second generation, four were affected by DCM. Individuals II-3 and II-5 had already succumbed and only a history of dyspnoea was available, but as both have affected children it is safe to assume that they died from DCM.

In the third generation we identified nine individuals who were affected by DCM. Individual III-2 died from heart failure during the course of the study. Individual III-14 had died at age 33 after implantation of a left ventricular assist device. The pathology report described a heart with predominantly left sided, massive dilation. The specimen showed normal wall thickness, normal valves, normal coronary arteries, but multiple areas of interstitial fibrosis, predominantly perivascular and on the outer layers of the ventricular wall. Sixteen children and adolescents of the fourth generation did not show signs for DCM and were therefore not included in the genetic study.

Significant coronary artery disease as a cause for DCM was excluded in individuals II-1, II-4, II-6 and III-14.

Linkage analysis

Pedigree analysis of this family was consistent with an autosomal-dominant pattern of inheritance and age-dependent penetrance (Fig. 1, Table 1). The age of onset varies between 25 and 47 years. We genotyped all family members shown in Fig. 1, with the exception of individuals I-1, I-2, II-3, and II-5 for whom the haplotypes were deduced because DNA was not available. To exclude errors due to misclassification caused by age-related non-penetrance, we restricted the linkage analysis to 13 clearly affected individuals. Since the clinical evidence for deceased family members I-1, II-3 and II-5 was insufficient, they were excluded. This strategy allows calculation with a penetrance of 100%.

Since X-linked inheritance was excluded by male-to male transmission, we restricted the whole-genome scan to the 22 human autosomes. Genotyping of 379 autosomal markers excluded linkage for 79% of the

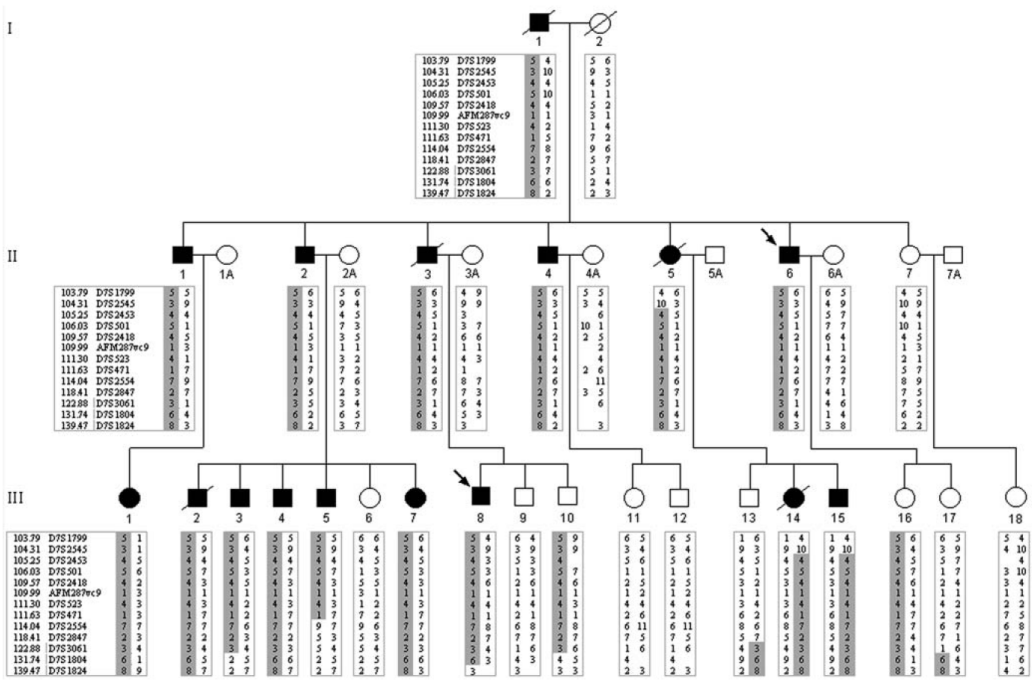


Fig. 1 Clinical and genetic status of family members. *Circles* indicate females; *squares*, males; and a slash, deceased. *Filled symbols* indicate DCM, *open symbols* an unaffected status. Alleles (*top to bottom*) are provided for loci on the long arm of chromosome 7. Gaps appear where alleles could neither be directly determined nor reconstructed. The physical location of the markers is displayed in Mb based on the Human Genome Assembly from May 2004. The disease haplotype is *greyed*

454

Table 1 Clinical Status of affected family members

Pedigree	Sex	Age	Height (cm)	Clinical evidence	LVEDD (mm)	FS (%)
I-1	M	71[a]	N/A	Dyspnoea	N/A	N/A
II-1	M	73	150	Dyspnoea	84 (52.2)	13
II-2	M	69	155	Dyspnoea	71 (52.7)	10
II-3	M	61[a]	N/A	Dyspnoea	N/A	N/A
II-4	M	64	164	Pulmonary edema	70 (54.6)	19
II-5	F	50[a]	N/A	Dyspnoea	N/A	N/A
II-6	M	54	164	Asymptomatic	64 (54.6)	28
III-1	F	40	153	Asymptomatic	55 (49.9)	35
III-2	M	43[a]	164	Terminal heart failure	83 (54.6)	5
III-3	M	37	168	Dyspnoea	63 (55.1)	19
III-4	M	42	162	Asymptomatic	63 (54.1)	25
III-5	M	35	172	Asymptomatic	62 (56.0)	34
III-7	F	25	160	Dyspnoea	61 (50.7)	26
III-8	M	41	169	Dyspnoea	83 (55.6)	15
III-14	F	31[a]	N/A	Autopsy	N/A	N/A
III-15	M	18	170	Asymptomatic	58 (55.6)	27

LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension (ninety-fifth percentile reference limits are given in parentheses); *FS*, fractional shortening; *M*, male; *F*, female; *N/A*, data not available; *Age*, Age of clinical examination
[a]*Age* of death

genome. It also excluded linkage to all previously reported DCM genes and loci, indicating that the disease in this family must be caused by a mutation in a novel DCM gene.

We found suggestive linkage at three loci on chromosomes 6p23.1, 7q23 and 12q24: D6S1051, LOD = 1.67 at $\theta = 0.00$; D7S821, LOD = 2.11 at $\theta = 0.00$ and D7S3061, LOD = 2.59 at $\theta = 0.05$; PAH, LOD = 1.68 at $\theta = 0.10$ and GATA41E12, LOD = 1.76 at $\theta = 0.05$ (the last two are close markers on chromosome 12q24). Because we could not exclude incomplete penetrance at this stage—apart from age-related penetrance—the neighbouring chromosomal segments at all three loci were fine-mapped with additional microsatellite markers at shorter intervals and evaluated by haplotype analysis.

A putative disease haplotype at chromosome 12q24 was shared by 13 out of 16 affected individuals (maximum LOD-score = 1.83 at D12S2082), but not by the affected individuals II-1/III-1 (father and daughter) and III-15 (data not shown). Based on these results we excluded this locus as a candidate region. A similar result was obtained for chromosome 6p21.31 where 14 out of 16 affected individuals shared one haplotype (maximum LOD-score = 1.67 at D6S1051).

Only on chromosome 7q22.3-33.1 did one haplotype entirely co-segregate with the disease status. Fine mapping yielded identical peak LOD-scores = 4.20 ($\theta = 0.00$) at markers D7S501 and D7S471 located 4.20 cM apart, indicating a likelihood of approximately 15,800:1 that the disease gene is indeed located very close to these markers (Table 2).

The disease candidate region was defined by recombination events in individuals III-5, and siblings III-14 and III-15 (offspring of mother II-5) who carry recombinations between markers D7S471 and D7S2554 (distal) and markers D7S2545 and D7S2453 (proximal), respectively (Figs. 1, 2). Individual III-5 is 33 years old and already has an enddiastolic left ventricular diameter of 62 mm (172 cm body height); individual III-14 was already described above with an autopsy-proven phenotype. Thus, the disease interval is flanked by markers D7S2545 and D7S2554, measuring 9.09 cM or 9.73 Mb. It contains 30 known genes and 7 unknown RefSeq-confirmed mRNAs (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/). None of the known genes encode cytoskeletal proteins.

Candidate gene analysis

The genes for the laminins beta-1 (LAMB1) and beta-4 (LAMB4) (Fig. 3) as well as the gamma polypeptide of the phosphoinositide-3-kinase (PIK3CG) are located in the minimal disease interval and represent excellent candidate genes. LAMB1 and LAMB4 are expressed in the heart and are major components of the basal laminae of the myocardium, providing a scaffold for the anchoring of myocytes and interacting with transmembrane laminin receptors like integrins.

PIK3CG is a modulator for extracellular signals, e.g. from E-cadherin mediated cell-cell adhesion, and PIK3 $\gamma^{-/-}$ mice have recently been reported to develop dramatic myocardial damage after chronic pressure overload induced by transverse aortic constriction (Patrucco et al. 2004).

We amplified all coding exons of these genes from genomic DNA and directly sequenced the PCR products. However, sequence analysis did not reveal unknown sequence variants in affected individuals that co-segregated with the disease.

Discussion

Here we report a four-generation pedigree with 16 individuals affected by isolated DCM without additional phenotypes. Because of the age-related penetrance we only used the first three generations for linkage analysis,

Table 2 Linkage to Markers at 7q22.3-31.1

Locus	Genetic position (cM)	Recombination fraction (θ)					
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	Max LOD
D7S1799	113.9	0.29	1.48	1.55	1.34	0.95	1.55; θ = 0.10
D7S2545	114.4	−0.51	0.73	0.85	0.76	0.52	0.85; θ = 0.10
D7S2453	115.9	0.54	0.49	0.44	0.34	0.23	0.54; θ = 0.00
D7S501	118.9	**4.20***	**3.87**	**3.52**	2.75	1.88	**4.20; θ = 0.00**
D7S2418	122.0	2.84	2.56	2.27	1.68	1.07	2.84; θ = 0.00
AFM287vc9	122.5	1.68	1.55	1.41	1.12	0.79	1.68; θ = 0.00
D7S523	122.7	**3.54**	**3.48**	2.93	2.26	1.51	**3.54; θ = 0.00**
D7S471*	122.8	**4.20***	**3.87**	**3.52**	2.75	1.88	**4.20; θ = 0.00**
D7S2554	123.0	1.06	2.46	2.28	2.26	1.44	2.46; θ = 0.05
D7S2847	125.2	0.96	2.36	2.18	1.95	1.35	2.36; θ = 0.05

Significant LOD-scores are shown in bold face
*Maximal LOD-score

and genotyped the fourth generation to verify the haplotypes.

As the whole genome scan excluded linkage to all previously published DCM genes and loci, this family must be affected by a mutation in a novel DCM gene. Linkage analysis and subsequent fine mapping defined a 9.73 Mb disease interval that is shared by all affected family members. Individuals III-10 and III-16, who were 30 and 26 years old, respectively, at the time of evaluation, carry the chromosome 7q disease haplotype but they are not affected yet. Regarding the variable age of onset in this family and the relatively young age of these individuals it is conceivable that they have not yet developed the phenotype. However, given the complete penetrance at a higher age, it is likely that they will contract DCM later.

The disease candidate region contains approximately 37 known or predicted genes most of which are expressed at least at considerable levels in myocardial tissue. None of the known genes encode cytoskeletal proteins and, therefore, we expect to explore new pathophysiological pathways leading to dilated cardiomyopathy and heart failure in humans.

The genes LAMB1, LAMB3 and PIK3CG are located in the minimal disease interval and are good candidate genes for DCM. Mice that are deficient in PI3Kγ developed myocardial damage after chronic pressure overload (Patrucco et al. 2004). In cardiomyocytes the PI3Kγ-PTEN signalling pathway that is linked to G-protein coupled receptors modulates heart muscle contractility and is likely to play a role in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. As several genes have been shown to be responsible for both hypertrophic and dilated cardiomyopathy, PI3Kγ should still be considered a good candidate gene in this family.

Amplification and sequencing of the coding exons of these three genes revealed no mutations, but this first screening approach would not detect mutations in the

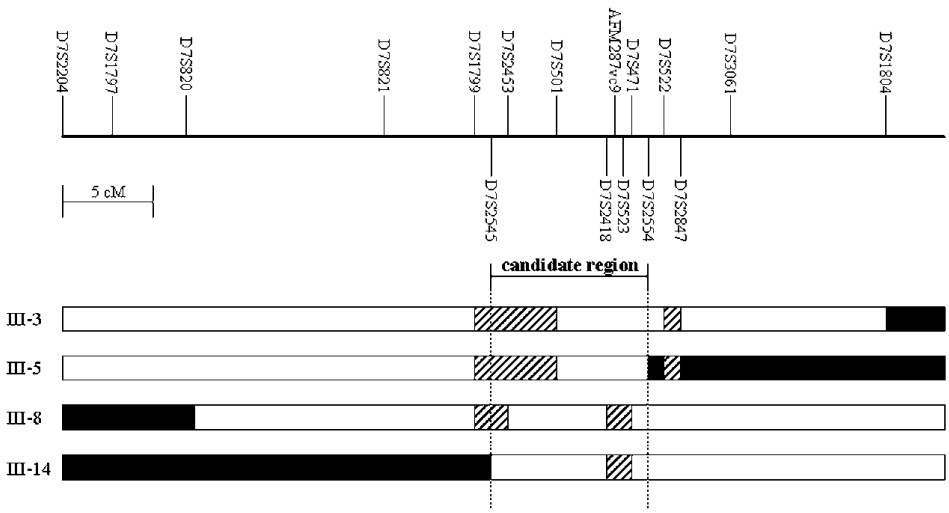


Fig. 2 The novel DCM disease interval on chromosome 7q spans 9.73 Mb. The minimal interval between markers D7S2545 (proximal) and D7S2554 (distal) is defined by recombination events in affected individuals III-5 and III-14, respectively. *White shading* indicates disease haplotype, *black shading* other haplotypes. Non-informative genotypes are marked by *hatched shading*

456

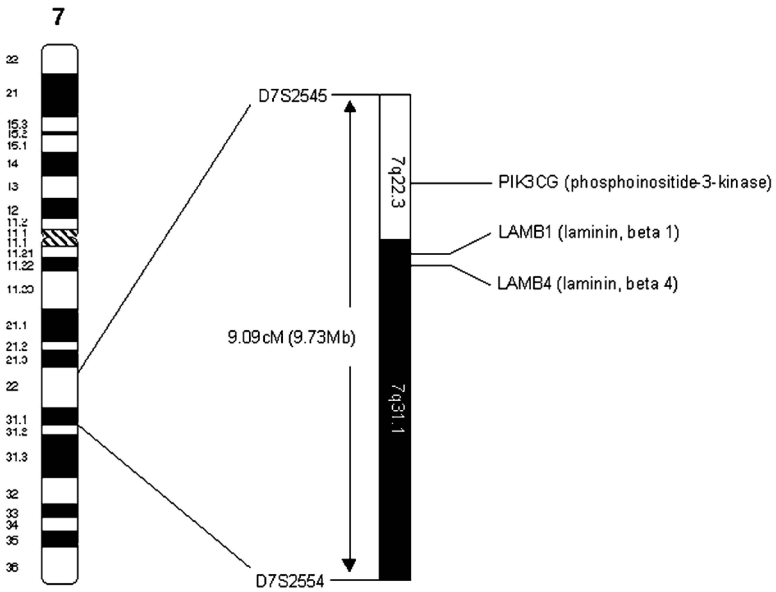


Fig. 3 Ideogram of chromosome 7. The minimal disease interval spans parts of chromosmal bands 7q22.3 and q31.1. Screened candidate genes in the interval are displayed

promoter regions, UTRs or introns that could alter the normal expression levels of the proteins or affect regular splicing. It would also not be suitable to reveal chromosomal micro-deletions or rearrangements leading to a truncated or altered gene product. Therefore, mutation screening will be extended to all genes in the candidate interval, and comprehensive methods of analysis will be applied.

This family with a new DCM locus offers the opportunity to identify a novel disease gene that is relevant for cardiac function and that may provide insights into novel venues of human cardiac pathophysiology.

Acknowledgements We are indebted to the members of family DCM-1 without whose assistance this study would not have been possible. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Zi 496/3-2 (to J.S. and M.Z.), Li768/3-1/-3/, Li768/4-1/-2 (to T.H.L.), and the Portuguese Calouste Gulbenkian Foundation. We are grateful for the helpful comments, support and technical expertise from Ulrich Walter, Georg Ertl, Mario Berger, Albert Smolenski, Laura Nessmann, and Gunnar Kristjansson.

References

Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) Merlin–rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. Nat Genet 30:97–101

Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D (1996) A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. Nat Genet 12:385–389

Bowles KR, Gajarski R, Porter P, Goytia V, Bachinski L, Roberts R, Pignatelli R, Towbin JA (1996) Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21–23. J Clin Invest 98:1355–1360

Bowles NE, Bowles KR, Towbin JA (2000) The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy. Herz 25:168–175

Braunwald E (1997) Shattuck lecture–cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. N Engl J Med 337:1360–1369

Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL (1998) Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. Am J Hum Genet 63:861–869

Cleland JG, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Eastaugh J, Follath F, Freemantle N, Gavazzi A, van Gilst WH, Hobbs FD, Korewicki J, Madeira HC, Preda I, Swedberg K, Widimsky J (2002) Management of heart failure in primary care (the improvement of Heart Failure Programme): an international survey. Lancet 360:1631–1639

Cottingham RW Jr, Idury RM, Schaffer AA (1993) Faster sequential genetic linkage computations. Am J Hum Genet 53:252–263

Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ Jr, Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W, McDonough B (1999) Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. N Engl J Med 341:1715–1724

Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitas K, Sasse-Klaassen S, Seidman JG, Seidman C, Granzier H, Labeit S, Frenneaux M, Thierfelder L (2002) Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. Nat Genet 30:201–204

Goerss JB, Michels VV, Burnett J, Driscoll DJ, Miller F, Rodeheffer R, Tajik AJ, Schaid D (1995) Frequency of familial dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 16(Suppl O):2–4

Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA (1998) Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 31:186 194

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SC Jr (2001) ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America. Circulation 104:2996 3007

Ichida F, Tsubata S, Bowles KR, Haneda N, Uese K, Miyawaki T, Dreyer WJ, Messina J, Li H, Bowles NE, Towbin JA (2001) Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. Circulation 103:1256 1263

Jung M, Poepping I, Perrot A, Ellmer AE, Wienker TF, Dietz R, Reis A, Osterziel KJ (1999) Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. Am J Hum Genet 65:1068 1077

Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, Smoot L, Mullen MP, Woolf PK, Wigle ED, Seidman JG, Seidman CE (2000) Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 343:1688 1696

Keeling PJ, Gang Y, Smith G, Seo H, Bent SE, Murday V, Caforio AL, McKenna WJ (1995) Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. Br Heart J 73:417 421

Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR (2002) The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. Cell 111:943 955

Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. Nat Genet 31:241 247

Krajinovic M, Pinamonti B, Sinagra G, Vatta M, Severini GM, Milasin J, Falaschi A, Camerini F, Giacca M, Mestroni L (1995) Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart Muscle Disease Study Group. Am J Hum Genet 57:846 852

Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R (1999) Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. Circulation 100:461 464

Lindner TH, Hoffmann K (2005) easyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses. Bioinformatics 21:405 407

Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristow JD, Michels VV, Abelmann WH, Harlan WR (1992) Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. Am J Cardiol 69:1458 1466

Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM (1997) Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. Am J Hum Genet 61:909 917

Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, Whittock N, Leigh IM, Stevens HP, Kelsell DP (2000) Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. Hum Mol Genet 9:2761 2766

Olson TM, Kishimoto NY, Whitby FG, Michels VV (2001) Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 33:723 732

Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch BM (2002) Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. Circulation 105:431 437

Ortiz-Lopez R, Li H, Su J, Goytia V, Towbin JA (1997) Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy. Circulation 95:2434 2440

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. Cell 118:375 387

Remme WJ, Swedberg K (2001) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. Eur Heart J 22:1527 1560

Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U, Kranias EG, MacLennan DH, Seidman JG, Seidman CE (2003) Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. Science 299:1410 1413

Schonberger J, Wang L, Shin JT, Kim SD, Depreux FF, Zhu H, Zon L, Pizard A, Kim JB, Macrae CA, Mungall AJ, Seidman JG, Seidman CE (2005) Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. Nat Genet 37:418 422

Sylvius N, Tesson F, Gayet C, Charron P, Benaiche A, Peuchmaurd M, Duboscq-Bidot L, Feingold J, Beckmann JS, Bouchier C, Komajda M (2001) A new locus for autosomal dominant dilated cardiomyopathy identified on chromosome 6q12-q16. Am J Hum Genet 68:241 246

Taylor DO, Edwards LB, Mohacsi PJ, Boucek MM, Trulock EP, Keck BM, Hertz MI (2003) The registry of the International Society for heart and lung transplantation: twentieth official adult heart transplant report 2003. J Heart Lung Transplant 22:616 624

Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA (2000) Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 106:655 662

Vasan RS, Larson MG, Levy D, Evans JC, Benjamin EJ (1997) Distribution and categorization of echocardiographic measurements in relation to reference limits: the Framingham heart study: formulation of a height- and sex-specific classification and its prospective validation. Circulation 96:1863 1873

Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z, Sinagra G, Lin JH, Vu TM, Zhou Q, Bowles KR, Di Lenarda A, Schimmenti L, Fox M, Chrisco MA, Murphy RT, McKenna W, Elliott P, Bowles NE, Chen J, Valle G, Towbin JA (2003) Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. J Am Coll Cardiol 42:2014 2027

Familial dilated cardiomyopathy with Troponin T210del mutation

Familial Dilated Cardiomyopathy with Troponin T K210del Mutation [24]

ELISABETE MARTINS, J. SILVA-CARDOSO, CÍNTIA ALVES, HELENA PEREIRA, BENILDE SOARES, ALBERTINO DAMASCENO, CASSIANO ABREU-LIMA, ANTÓNIO AMORIM, F. ROCHA-GONÇALVES

Serviço de Cardiologia do Hospital de São João, Porto, Portugal
Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal
Serviço de Cardiologia do Hospital Universitário de Maputo, Maputo, Moçambique
Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Portugal
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2006; 25 (3): 295-300

ABSTRACT

Background: It has been estimated that more than 30 % of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy have a familial form of the disease. The most frequent pattern of inheritance is autosomal dominant and several genes or loci have been implicated, coding for sarcomeric or cytoskeleton proteins. Most of the genotype-phenotype correlations are still under study, but a particular mutation, K210del in the troponin T gene, has been identified in four different families with severe forms of DCM. The pathogenesis of this mutation has been inferred by functional studies but its transmission has not been demonstrated, perhaps due to the high mortality of the affected family members.
The aim of this work was to investigate the prevalence of the K210del mutation in Portuguese and Mozambican families with dilated cardiomyopathy.

Methods: We evaluated 27 probands with familial DCM. Forty idiopathic (sporadic) DCM patients and 100 non-related healthy individuals were used as controls. Mutational analysis was performed by amplification of exon 13 of the troponin T gene by the polymerase chain reaction (PCR), determination of molecular weight of PCR products and further sequencing.

Results: The K210del mutation in the cardiac troponin T gene was identified in one of the DCM families which presented an aggressive form of the disease, with a high incidence of sudden death, and need for heart transplant at young age. One affected member had

RESUMO

Mutação K210del da Troponina T na Miocardiopatia Dilatada Familiar

Estima-se que mais de 30 % dos indivíduos com miocardiopatia dilatada (MCD) idiopática têm uma forma familiar da doença. O padrão de transmissão hereditária mais frequente é o autossómico dominante e diversos genes ou loci têm sido implicados, codificando proteínas do sarcómero ou do citoesqueleto. A maioria das correlações genótipo-fenótipo persiste por determinar, mas uma mutação particular, K210del no gene da troponina T, foi já descrita em quatro casos de MCD familiar. A patogenicidade desta mutação tem sido inferida a partir de estudos funcionais, mas a sua transmissão ainda não foi demonstrada por *linkage*, talvez devido à mortalidade elevada dos elementos familiares afectados.
O objectivo deste trabalho foi investigar a prevalência da mutação K210del da troponina T, em famílias portuguesas e moçambicanas com MCD.

Métodos: Avaliámos 27 probandos com MCD familiar. Incluímos, como grupo controlo, a análise de 40 casos de MCD idiopática esporádicos e de 100 indivíduos saudáveis. A pesquisa da mutação foi efectuada através da amplificação do exão 13 da troponina T por PCR (polymerase chain reaction), determinação do peso molecular dos produtos amplificados e posterior sequenciação.

Resultados: A mutação K210del da troponina T foi identificada num dos casos familiares de MCD que apresentava uma forma agressiva da doença, com elevada incidência de morte

Recebido para publicação: Dezembro de 2005 • Aceite para publicação: Fevereiro de 2006
Received for publication: December 2005 • Accepted for publication: February 2006

Rev Port Cardiol
Vol. 25 Março 06/March 06

sustained left ventricular function recovery after diagnosis.

Conclusions: These results reinforce previous work by others, indicating that this mutation is a bad prognostic factor in familial forms of DCM. The K210del mutation in the troponin T gene, like other mutations in the troponin complex, seems to be especially prevalent in families with rapidly progressive DCM or sudden cardiac death at young age.

Palavras-Chave
Dilated cardiomyopathy; Familial; Genetics; Troponin T

súbita e necessidade de transplante cardíaco em idade jovem. Um dos familiares afectados teve uma recuperação temporária da função ventricular após o diagnóstico.

Conclusões: Estes resultados reforçam o trabalho de outros autores e apontam para o facto desta mutação ser um factor de mau prognóstico nas formas familiares de MCD. A pesquisa da mutação K210del no gene da troponina T, tal como a de outras mutações no complexo das troponinas, parece ser especialmente prevalente em famílias com MCD rapidamente progressiva ou morte súbita em idades jovens.

Key words
Miocardiopatia dilatada; Familiar; Genética; Troponina T

INTRODUCTION

The familial forms of dilated cardiomyopathies (FDCM) are a recently identified subgroup of cardiomyopathies characterized by clinical diversity and genetic heterogeneity. The hereditary pattern of the disease can be autosomal, recessive, X-linked or mitochondrial, but the most frequent type is autosomal dominant. In the latter subgroup abnormalities in several genes have been identified in different families: cardiac troponin T [1, 2, 3], troponin C [3], titin [4], desmin [5], δ-sarcoglycan [6], phospholamban [7], metavinculin [8], cardiac actin [9], β-myosin heavy chain [1, 10, 11], α-tropomyosin [12], and lamin A/C [13].

This genetic heterogeneity parallels what happens in hypertrophic cardiomyopathy and makes it difficult to perform genetic screening on a large scale. However a particular mutation, troponin T K210del, has been identified in four different DCM families [1-3]. These families exhibited some common clinical features, namely dilated cardiomyopathy of early onset and the occurrence of sudden death.

Although transmission studies have not been performed, functional studies have shown the consequences of the K210del mutation in calcium kinetics: it lowers the affinity of calcium-dependent troponin T-troponin C binding, decreases Ca^{2+}-activated maximal force, and reduces the rate of actomyosin ATP hydrolysis and the speed of thin filament sliding [14-16].

The frequency of the K210del troponin T mutation and its established functional consequences makes it a candidate for genomic screening in FDCM patients and even in sporadic cases of DCM, especially when younger patients are affected.

The present work aims to evaluate the frequency of the K210del Troponin T mutation in a group of Portuguese and Mozambican familial cases of DCM.

METHODS

Design and setting

This prospective study was conducted in the heart failure clinics of two university hospitals: one in Porto, Portugal and another in Maputo, Mozambique.

Patients

From January 2002 to January 2004 we consecutively included patients diagnosed with FDCM in both clinics and their relatives. Two groups of Portuguese controls were included: one of patients with idiopathic DCM and another of healthy individuals.

Evaluation

Detailed medical history, physical examination, 12-lead electrocardiography and transthoracic 2D-echocardiogram were performed in all patients. Left ventricular dimensions and function (ejection fraction and shortening fraction) were determined as recommended by the American Society of Echocardiography [17].

Dilated cardiomyopathy was defined by the presence of left ventricular dilatation >117% of predicted value, corrected for age and body surface [18], and ejection fraction <0.45 or shortening fraction <0.25. Identification of FDCM cases and classification of family members as affected, unaffected or with unknown phenotype was performed according to the criteria of Mestroni et al. [19].

Genetic analysis for the presence of the K210del troponin T mutation was performed in MCDF probands and 140 controls.

DNA extraction and exon 13 amplification

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, using the salt-chloroform method [20].

Exon 13 of the troponin T gene was amplified using the following set of primers: Forward-5'CACACCCTCCGAGACAGAG3'; Reverse: 5'CGAGTGCCCAGACCATTC3'. The forward primer was labeled with fluorochrome.

The PCR reactions were done using 5-10 ng of genomic DNA, 10X PCR buffer (Applied Biosystems) containing 15 mM $MgCl_2$, 0.25 µM primers, 200 µM dNTPs (Applied Biosystems) and 0.5 U Taq DNA polymerase (Applied Biosystems), to a final volume of 25 µl. After preincubation at 95°C for 2 min, we performed 35 amplification cycles (denaturation: 95°C/20 sec, annealing: 58 °C/30 sec, extension: 72°C/1 min), followed by 30 minutes of final extension at 60°C, in a thermocycler (Applied Biosystems).

Screening the mutation and sequencing

The presence of the 3 bp deletion (AAG deletion) in exon 13 of the troponin T gene was screened by fragment size, on an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) using GeneScan analysis software version 3.1. PCR products with atypical size were sequenced using a BigDye terminator cycle sequencing reaction (Ready Reaction Kit, Applied Biosystems).

Ethics

The protocol was approved by the ethics committees of both institutions. Informed consent was obtained from all participants.

RESULTS

Twenty-seven probands with FDCM (two from Mozambique), 40 patients with idiopathic DCM and 100 healthy non-related individuals were included (*Table I*). No FDCM patient had evidence of skeletal myopathy or conduction system disturbances.

The proband of one of the Portuguese DCM families presented an abnormal genescan pattern, corresponding to the presence of two amplified products with 3 bp difference (*Fig. 1*). Sequencing of the amplified products confirmed the presence of the K210del mutation in heterozygosity (*Fig. 2*).

This mutation was identified in the only surviving affected member of the family (*Fig. 3*; III:14), a 26-year-old woman. She underwent heart transplantation due to rapidly progressive dilated cardiomyopathy at the age of 25 (*Fig. 4*).

Her father (II:15), who we assumed to carry the mutation, was also affected. He was followed

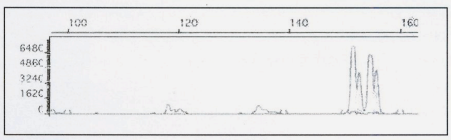


Fig. 1 Electrophoregrams of both alleles.

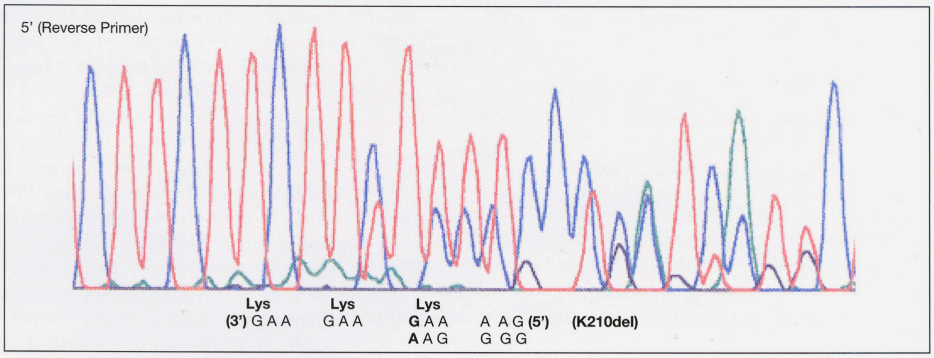


Fig. 2 K210del mutation in heterozygosity.

Rev Port Cardiol
Vol. 25 Março 06/March 06

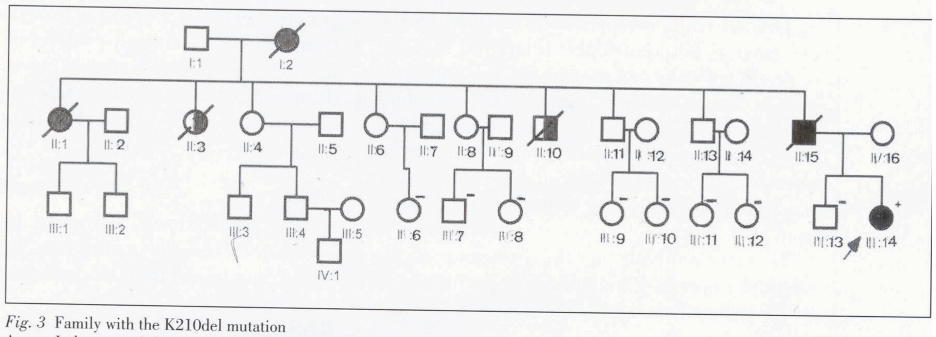


Fig. 3 Family with the K210del mutation
Arrow: Index case; Solid symbols: individual affected by DCM, Half-solid symbols: Sudden death; Symbols with slash: deceased individuals; Mutation carrier is indicated by a + sign; subjects without mutation are indicated by a – sign.

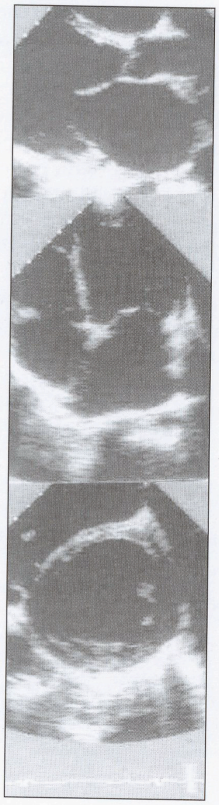


Fig. 4 Echocardiogram of the index patient showing a dilated form of cardiomyopathy.

in our heart failure clinic for 10 years. He had dilated cardiomyopathy diagnosed at 45, following a respiratory infection. After an initial symptomatic period, his condition stabilized on angiotensin-converting enzyme inhibitors. Five years later, he had only mild left ventricular systolic dysfunction and was asymptomatic. At the age of 53, and also after another infection, he developed rapidly progressive congestive heart failure and died six months later.

In this family, two women (I:2 and II-1) died with signs and symptoms of heart failure in their forties. Two other members had sudden death at the ages of 53 (II-3) and 27 (II-10).

No member of the other 26 families studied or any of the two control groups presented this genetic abnormality.

DISCUSSION

In autosomal dominant forms of FDCM, more than 15 different genes have been identified including those coding for sarcomeric, cytoskeletal and regulatory proteins such as phospholamban [7] and SUR2A [21]. Our knowledge of the relative frequency of mutations in FDCM is still dependent on genetic screening of multiple genes in large series of patients, including sporadic forms of the disease.

Sarcomeric genes, such as β-myosin heavy chain (MYH7) and troponin complex proteins, have been frequently analyzed. They appear to affect less than 10% of patients, depending on the series [3, 11]. Although not common, the identification of troponin mutations has special clinical relevance because of the associated "malignant" phenotype. So far, various cardiac troponin T (TNNT2) mutations have been identified: R205L, R131W, D270N [3], A171S [22] (1 family each), R141W [11, 23] (2 families, 1 sporadic) and K210del (4 families).

The latter mutation was first identified by Kamisago in two families with FDCM [1]. In one of these families, 4 relatives had sudden death, two of them before one year of age. In the other family a young woman had sudden death before 19 and two patients died due to congestive heart failure before age 20.

In 2002, Hanson [2] described the same mutation in a family in which 4 members died due

Table I
Clinical features of probands

Family	Sex	Age	Age at diagnosis	NYHA CLASS	LVED (mm)	EF (%)	Outcome
1	M	40	38	II	65	25	
2	F	51	49	II	56	41	
3	M	39	39	II	79	24	
4	M	40	37	I	79	26	
5	F	53	51	II	66	34	
6	F	56	55	II	75	28	
7	M	24	24	II	74	12	Received transplantat age 34
8	M	19	6 months	I	61	27	
9	M	56	55	I	70	25	
10	M	50	45	II	81	20	
11	M	57	53	III	67	25	Sudden death at age 58
12	F	49	48	I	64	33	
13	M	46	40	II	62	30	ICD implanted at age 49
14	F	27	23	II	59	20	
15	F	64	63	II	66	32	
16	F	46	39	III	74	39	
17	M	43	42	II	77	30	
18	M	64	62	II	67	21	
19	M	36	36	II	56	30	
20	F	25	25	III	65	17	K210del mutation Received transplant at age 26
21	F	40	35	III	56	28	
22	F	56	52	II	62	24	
23	M	37	27	II	61	40	
24	M	25	24	II	73	35	
25	F	57	56	II	61	47	
26*	M	54	NA	II	80	12	
27*	M	56	NA	II	77	44	

EF: ejection fraction; ICD: implantable cardioverter defibrillator; LVED: left ventricular end-diastolic size; NA: not available; NYHA: New York Heart Association; *: Families from Mozambique.

to congestive heart failure before the age of 20. One of the carriers had no clinical expression of the disease. In the family described by Mogensen [3] three brothers manifested DCM before 35 years of age, and their father had sudden death at the age of 36.

We now report the fifth family with this mutation. It presents similar clinical characteristics to previous ones: sudden death and congestive heart failure affecting young patients.

So far the pathogenicity of this mutation has been established by functional studies demonstrating a negative dominant effect on calcium kinetics, and also by the fact that this mutation was absent in 500 healthy controls. Linkage analysis has not been possible due to small pedigrees, and to a high mortality rate among affected family members.

Our work reinforces previous observations on the poor prognosis associated with the troponin T K210del mutation in FDCM.

This mutation should be screened in other families, especially those with a history of congestive heart failure or sudden cardiac death at young ages. PCR-based fragment size analysis proved to be an appropriate method for large-scale screening of this particular mutation in DCM families.

This genetic evaluation is useful not only to clarify genotype-phenotype correlations in order to provide genetic counseling, but also to follow up the carriers of the mutation more closely.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Calouste Gulbenkian Foundation and IPATIMUP was partially funded by Fundação para Ciência e a Tecnologia and by Program Operacional Ciência, Tecnologia e Inovação (POCTI), Quadro Comunitário de Apoio III.

Pedidos de separatas para:
Address for reprints:

ELLISABETE MARTINS
Serviço de Cardiologia
Hospital de São João
4200-319 PORTO, PORTUGAL

Rev Port Cardiol
Vol. 25 Março 06/March 06

REFERENCES

1. Kamisago M, Sharma SD, Steven RD, et al. Mutations in Sarcomere Protein Genes as a cause of Dilated Cardiomyopathy. N. Engl. J Med 2000; 343:1688-96.

2- Hanson EL, Jakobs PM, Keegan H, et al. Cardiac Troponin T Lysine 210 Deletion in a Family with Dilated Cardiomyopathy. J Card Fail 2002;8 (1):28-32.

3. Mogensen J, Murphy RT, Shaw T, et al. Severe Disease Expression of Cardiac Troponin C and T mutations in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. JACC 2004;44(10):2033-40.

4-Gerull B, Gramlich M, Atherton J, et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. Nature Genet 2002,30:201-4.

5. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, et al. Desmin Mutation Responsible for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Circulation 1999;100 461-4.

6. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, et al. Mutations in the human -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 2000;106 (5):655-62.

7. Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, et al. Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure Caused by a Mutation in Phospholamban. Science 2003;299:1410-13.

8. Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch B. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. Circulation 2002;105 431-7.

9. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. Science 1998;280:750-2.

10. Karkkainen S, Helio T, Jaaskelainen, et al. Two novel mutations in the -myosin heavy chain gene associated with dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2004;6:861-8.

11. Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, et al. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. Eur J Heart Fail 2005;2:794-803.

12- Olson TM, Kishimoto NY, Whitby FG, Michel VV. Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. J Mol Cell Card 2001 Apr; 33 (4):723-32.

13. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. N Engl J Med 1999; 341:1715-24.

14. Morimoto S, Lu QW, Harada K et al. Ca2+ desensitizing effect of a deletion mutation K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. PNAS 2002;99 (2):913-8.

15. Venkatraman G, Harada K, Gomes AV, Kerrick WG, Potter JD. Different Functional Properties of Troponin T Mutants that Cause Dilated Cardiomyopathy. J Biol Chemistry 2003;278 (43):41670-6.

16. Robinson P, Mirza M, Knott A, et al. Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac troponin T mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by troponin T mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. J Biol Chemistry 2002;2002 40710-16.

17. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. J Am Soc Echocardiog 1989;2 (5) 358-67.

18. Henry WL, Gardin JM, Ware JH. Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. Circulation 1980;62:1054-61.

19- Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Eur Heart J 1999;20;93-102.

20. Mullenbach R, Lagoda PJL, Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissue. Trends Genet 1989;5:391.

21. Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. Nat Genet 2004;36 382-7.

22. Stefanelli CB, Rosenthal A, Borisov AB, Ensing GJ, Russell MW. Novel troponin T mutation in familial dilated cardiomyopathy with gender-dependant severity. Mol Genet Metab 2004;83 (1-2):188-96.

23. Li D, Czernuszewicz GZ, Gonzalez O, et al. Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. Circulation 2001;104 (18):2188-93.

Left ventricular function in adults with muscular dystrophies: genotype – phenotype correlations

Função Ventricular Esquerda em Adultos com Distrofia Muscular: Correlações Genotipo-Fenótipo [2]

ELISABETE MARTINS, J. SILVA-CARDOSO, FERNANDO SILVEIRA, GORETI NADAIS, F. ROCHA GONÇALVES
Clínica de Insuficiência Cardíaca e Transplante do Serviço de Cardiologia; Unidade de Neurofisiologia
Hospital de São João, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2005;24(1):23-35

RESUMO

Introdução: A disfunção ventricular esquerda é uma das manifestações da distrofia muscular em adultos, condicionando o seu prognóstico; contudo, não existem ainda recomendações consensuais para o seguimento cardiológico destes doentes. Neste trabalho, pretendemos avaliar a frequência de disfunção ventricular esquerda (DVE) sistólica, numa população de doentes adultos com distrofia muscular.

Métodos: Os doentes foram referenciados de uma consulta de doenças neuromusculares, tendo efectuado avaliação clínica cardiovascular, ECG, ecocardiograma transtorácico e doseamento sérico de Troponina I e NT-proBNP. Definimos DVE sistólica da seguinte forma: fracção de ejecção inferior a 45 % e/ou fracção de encurtamento inferior a 25 %.

Resultados: Durante o período de um ano, observámos 24 doentes consecutivos, 16 do sexo masculino, 33 ± 11 anos de idade (idade de diagnóstico da miopatia – 23 ± 12 anos) com as seguintes patologias: quatro distrofinopatias (Duchenne-1, Becker-3); nove distrofias miotónicas de Steinert; seis miopatias das cinturas, quatro distrofias facioescapuloumerais (FEU) e uma miopatia de Miyoshi (disferlinopatia). O diagnóstico da distrofia, baseado em critérios clínicos e histológicos, foi confirmado geneticamente em 18 (75 %) casos.
Cinco (20,8 %) doentes referiam dor torácica, quatro (16,6 %) dispneia e um história de síncope. O ECG apresentava alterações em 14 (58,3 %) dos casos.

ABSTRACT

Left ventricular function in adults with muscular dystrophies: genotype-phenotype correlations

Background: Left ventricular dysfunction (LVD) is a clinical manifestation of muscular dystrophy (MD) in adults and an important prognostic factor. However, there is a lack of recommendations concerning cardiac follow-up of these patients.
The aim of this work was to evaluate the prevalence of systolic LVD in adults with MD.

Methods: The patients, referred from a Neuromuscular Diseases Unit, underwent clinical evaluation, ECG and transthoracic echocardiogram. Serum troponin I and NT-proBNP were also evaluated. Systolic LVD was defined by an ejection fraction of < 0.45 and/or shortening fraction of < 0.25.

Results: During a one-year period, we evaluated 24 consecutive patients, 16 men, age 33 ± 12 years (age at myopathy diagnosis 23 ± 12 years). They had the following MD: dystrophinopathies – four patients (Duchenne: 1, Becker: 3); Steinert myotonic dystrophy – nine patients; limb-girdle myopathies – six patients; facioscapulohumeral (FSH) myopathies – four patients; and one dysferlinopathy (Miyoshi myopathy). The MD diagnosis, based on clinical and histological criteria, was genetically confirmed in 18 cases (75 %).
Five patients (20.8 %) had thoracic pain, four (16.6 %) dyspnea and one a history of syncope. ECG abnormalities were present in 14 cases (58.3 %).

Recebido para publicação: Setembro de 2004 • Aceite para publicação: Novembro de 2004
Received for publication: September 2004 • Accepted for publication: November 2004

Rev Port Cardiol
Vol. 24 Janeiro 05/January 05

Seis (25 %) doentes apresentavam remodelagem ventricular e/ou DVE: três com distrofinopatias, um com miopatia das cinturas, um com distrofia FEU e uma doente com distrofia miotónica. Três (12,5 %) doentes apresentavam insuficiência cardíaca de acordo com os critérios da Sociedade Europeia de Cardiologia.
Verificou-se elevação dos níveis séricos de NT-proBNP em três dos cinco doentes com compromisso da função sistólica do VE. Um doente com distrofia de Becker tinha valores de troponina I ligeiramente aumentados.
As mutações identificadas nos doentes com DVE e/ou remodelagem ventricular foram: deleção do intrão um ao exão 49 do gene da distrofina (um doente com Duchenne), deleções dos exões 45 a 51 da distrofina (dois doentes com Becker), deleção de repetições D4Z4 no lócus DFS (4q35) (um doente com distrofia FEU) e 1300-1500 repetições do tripleto CTG do gene DMPK (um doente com distrofia miotónica).

Conclusões: Estes resultados, embora preliminares, indicam que numa elevada percentagem dos doentes com patologia do músculo esquelético de causa genética, as mutações associadas podem ter repercussões funcionais ao nível dos cardiomiócitos, ocasionando disfunção ventricular grave e insuficiência cardíaca. Assim, parece inteiramente justificada uma avaliação cardiológica periódica dos doentes com distrofias musculares. As correlações genótipo-fenótipo poderão ajudar, no futuro, a temporizar a vigilância cardiológica destes doentes.

Palavras-Chave
Distrofias nusculares; Miocardiopatias; Genética; Função ventricular

Systolic LVD or left ventricular remodeling were present in six patients (25 %): three with dystrophinopathies, one with limb-girdle myopathy, one with FSH dystrophy and one with myotonic dystrophy. Three patients (12.5 %) were diagnosed with heart failure according to the European Society of Cardiology criteria.
Three of the five patients with left ventricular dysfunction had elevation of NT-proBNP. One patient with Becker dystrophy had slight elevation of troponin I.
In patients with systolic LVD or LV remodeling, the mutations identified were: deletion in intron 1 to exon 49 (one Duchenne MD patient) and deletions in exons 45 to 51 (two Becker MD patients) in the dystrophin gene; deletion of D4Z4 repeats in the DFS locus (4q35) (one patient with FSH MD); and 1300-1500 CTG triplet repeats in the DMPK gene (one patient with myotonic dystrophy).

Conclusions: These results, although preliminary, show that a high percentage of patients with genetically determined skeletal myopathies exhibit cardiac myocyte functional impairment, with severe LVD and heart failure, justifying periodic cardiovascular evaluation.
In the future, phenotype-genotype correlations could help to determine the best cardiac surveillance in MD patients.

Key words
Muscular dystrophies; cardiomiooathyy; Generics; Ventricular function

INTRODUÇÃO

A designação distrofia muscular inclui um grupo de doenças musculares hereditárias cujo diagnóstico é primordialmente clínico, sendo confirmado pelos dados da biopsia muscular e recentemente através da genética molecular.

São manifestações clássicas das distrofias: a fraqueza e atrofia musculares, as contracturas,

INTRODUCTION

The term muscular dystrophy (MD) covers a group of hereditary muscular diseases, for which diagnosis is mainly clinical, confirmed by muscle biopsy and recently through molecular genetic study.

The classical manifestations of dystrophy are muscle weakness and atrophy, contractures, increased serum levels of muscle creatine ki-

a elevação da creatinocinase muscular (CK--MM) sérica e as alterações do sistema de condução cardíaco. De igual forma, a miocardiopatia dilatada pode ser a manifestação inicial ou desenvolver-se no decurso da doença, nomeadamente nas distrofias devidas a mutações do gene da distrofina (Duchenne, Becker), dos sarcoglicanos, da emerina e lâmina A/C (Cinturas e Emery-Dreifuss) [1]. A ocorrência de miocardiopatia arritmogénica do ventrículo direito foi descrita na distrofia facioescapuloumeral (FEU) [2]. É ainda desconhecida a patogenia do atingimento cardíaco neste contexto, o qual pode ocorrer independentemente da miopatia periférica. As hipóteses actuais incluem disfunção mitocondrial, interacção com proteínas envolvidas no fluxo de cálcio intracelular [1, 3], susceptibilidade a agentes infecciosos, como os vírus [4] e a disfunção coronária [5]. A história natural destas miocardiopatias não está ainda clarificada.

Independentemente deste conhecimento, o apoio cardiológico a doentes com distrofias musculares prevê-se crescente no futuro, devido à progressiva utilização de meios ventilatórios não-invasivos, que proporcionando uma maior sobrevivência, levará a um aumento relativo da morbilidade e mortalidade cardíaca nestes doentes. Em geral, o diagnóstico da cardiopatia é tardio, devido à atribuição das queixas, como a dispneia, a causa respiratória, à imobilização relativa dos doentes e às dificuldades no diagnóstico clínico devido às malformações torácicas.

Actualmente não estão ainda definidas recomendações consensuais para o rastreio de miocardiopatia em doentes com distrofias musculares. Não existindo correlação entre a gravidade de miopatia periférica e o grau de lesão cardíaca, resta saber se o genótipo pode ou não predizer a ocorrência e/ou a gravidade da doença cardíaca. Este conhecimento poderá ter importância no seguimento cardiológico dos doentes com distrofias musculares, contribuindo para a temporização das avaliações ou mesmo influenciando as opções terapêuticas.

Neste trabalho pretendemos avaliar a frequência de disfunção ventricular esquerda sistólica numa população de doentes adultos com distrofia muscular e estabelecer as respectivas correlações genotipo-fenótipo.

MÉTODOS

De Janeiro a Dezembro de 2003, avaliámos de forma consecutiva doentes com distrofias musculares, referenciados a partir de uma consulta de Doenças Neuromusculares. O diagnóstico de DM, baseado em critérios clínicos, electromiográficos e histológicos, foi confirmado em todos os casos por estudo genético. Foram excluídos os doentes com idade inferior a 18 anos, com doença cardíaca conhecida ou com factores de risco cardiovascular major. Todos os doentes foram submetidos a electrocardiograma de 12 derivações, ecocardiograma transtorácico e avaliação da função respiratória. Foi ainda realizada uma entrevista estruturada para avaliação de sintomas cardíacos e respiratórios. Foi considerada disfunção ventricular esquerda sistólica uma fracção de ejecção do ventrículo esquerdo (FEVE) inferior a 50%, calculada pelo método de Simpson. Foi considerada dilatação do ventrículo esquerdo um diâmetro telediastólico superior a 56 mm. Foi considerada dilatação da aurícula esquerda um diâmetro superior a 40 mm. Foi considerada hipertrofia do ventrículo esquerdo uma espessura parietal superior a 11 mm. Foi considerada dilatação da raiz da aorta um diâmetro superior a 37 mm. Foi considerada dilatação da aorta ascendente um diâmetro superior a 40 mm. Foi considerada dilatação do ventrículo direito um diâmetro superior a 30 mm. Foi considerada dilatação da aurícula direita um diâmetro superior a 40 mm. Foi considerada hipertensão pulmonar uma pressão sistólica da artéria pulmonar superior a 30 mmHg. Foi considerada insuficiência mitral ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada insuficiência tricúspide ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada insuficiência aórtica ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada insuficiência pulmonar ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada estenose mitral ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm². Foi considerada estenose tricúspide ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm². Foi considerada estenose aórtica ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm². Foi considerada estenose pulmonar ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm². Foi considerada insuficiência mitral ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada insuficiência tricúspide ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada insuficiência aórtica ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada insuficiência pulmonar ligeira um jacto regurgitante inferior a 1 cm, moderada um jacto regurgitante entre 1 e 2 cm e grave um jacto regurgitante superior a 2 cm. Foi considerada estenose mitral ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm². Foi considerada estenose tricúspide ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm². Foi considerada estenose aórtica ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm². Foi considerada estenose pulmonar ligeira uma área valvular superior a 1,5 cm², moderada uma área valvular entre 1 e 1,5 cm² e grave uma área valvular inferior a 1 cm².

nase (CK-MM) and cardiac conduction system alterations. However, dilated cardiomyopathy may be the first manifestation or may develop during the course of the disease, particularly in dystrophies due to mutations in the dystrophin gene (Duchenne and Becker) and sarcoglycanopathies linked to emerin and lamin A/C (limb-girdle and Emery-Dreifuss) [1]. Arrhythmogenic cardiomyopathy of the right ventricle has been described in facioscapulohumeral (FSH) dystrophy [2]. The pathogenesis of cardiac involvement in this disorder, which can occur independently of peripheral myopathy, is not known. Current theories include mitochondrial dysfunction, interaction with proteins involved in intracellular calcium flow [1, 3], susceptibility to infectious agents such as viruses [4], and coronary dysfunction [5]. The natural history of these cardiomyopathies has yet to be fully clarified.

Regardless of any advances in knowledge in this area, the need for cardiac monitoring in patients with muscular dystrophy is expected to increase in the future, due to the growing use of noninvasive ventilatory measures, which by increasing survival will lead to a relative increase in cardiac morbidity and mortality in these patients. Cardiopathy is generally diagnosed late, since symptoms such as dyspnea are attributed to respiratory causes or the relative immobility of patients, and clinical diagnosis is made more difficult by thoracic malformations.

At present there is no consensus on recommendations on screening for cardiomyopathy in patients with muscular dystrophy. Since there is no correlation between the severity of peripheral myopathy and the degree of cardiac involvement, the question is whether genotype can predict the occurrence and/or severity of heart disease. Such knowledge could be important in cardiac follow-up of MD patients by helping to schedule assessments and could even influence therapeutic options.

The aim of this work was to evaluate the prevalence of systolic left ventricular dysfunction (LVD) in adults with muscular dystrophy and to investigate any genotype-phenotype correlations.

METHODS

Between January and December 2003, we consecutively evaluated patients with muscular dystrophy, referred from a Neuromuscular Diseases Unit. The diagnosis of MD, based on clini-

Rev Port Cardiol
Vol. 24 Janeiro 05/January 05

sulta de doenças neuromusculares. O diagnóstico da distrofia foi baseado em critérios clínicos e histológicos e foi confirmado geneticamente em 18 (75 %) casos. Nos seis doentes com distrofia muscular das cinturas em que não foram identificadas mutações, o estudo imunocitoquímico, em amostras de músculo esquelético, foi normal para a distrofina, sarcoglicanos e disferlina. Também foi negativa a pesquisa de mutações da calpaína por sequenciação. Estes casos estão provavelmente relacionados com alterações noutros genes, cuja pesquisa mutacional não foi realizada.

Para além da história clínica e do exame físico, foi efectuada avaliação complementar através de ecocardiograma, electrocardiograma e doseamentos séricos de troponina I e NT-ProBNP em todos os doentes.

Ecocardiograma Modo-M, bidimensional e Doppler (Hewlett-Packard Sonos 5500): As dimensões das cavidades cardíacas, fracção de encurtamento e fracção de ejecção foram determinadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia [6]. Considerou-se existir disfunção sistólica do ventrículo esquerdo se a fracção de encurtamento fosse inferior a 25 % e/ou a fracção de ejecção menor do que 45 %.

Doseamento de troponina I e de NT-ProBNP – Os valores séricos de NT-proBNP (Elecsys - Roche) e de troponina I (Dade Behring) foram determinados pelo método de ELISA. Na interpretação dos doseamentos de NT-proBNP foram considerados os limites superiores de normalidade para cada idade e sexo. Para a troponina I, os limites de detecção e o valor do percentil 99 são, no nosso laboratório, 0.04 ng/ml e 0.11ng/ml, respectivamente.

Estudo genético – O diagnóstico molecular foi realizado a partir de amostras de sangue periférico. A detecção de expansões do tripleto CTG do gene DMPK nos casos de distrofia miotónica, a pesquisa de deleções no lócus DFS nos doentes com distrofia facioescapuloumeral e a pesquisa de deleções e duplicações no gene da distrofina foram efectuadas pela técnica de *Southern Blot*. Nas distrofias das cinturas a análise molecular foi precedida pelo estudo imunocitoquímico, em músculo esquelético, da distrofina, sarcoglicanos e disferlina e as mutações dos exões da calpaína foram pesquisadas por PCR- SSCA e posterior sequenciação.

cal and histological criteria, was genetically confirmed in 18 cases (75 %). In the six patients with limb-girdle dystrophy, in whom no mutations were identified, immunocytochemical study in skeletal muscle samples was normal for dystrophin, sarcoglycans and dysferlin. A search for calpain mutations by sequencing was also negative. These cases are probably related to alterations in other genes that were not investigated for mutations.

In addition to clinical history and physical examination, all patients underwent echocardiogram, electrocardiogram and measurement of serum troponin I and NT-proBNP.

M-mode, two-dimensional and Doppler echocardiogram (Hewlett-Packard Sonos 5500) were used to determine cardiac chamber size, shortening fraction and ejection fraction following the recommendations of the American Society of Echocardiography [6]. Systolic LVD was defined by shortening fraction of less than 25 % and/or ejection fraction of less than 45 %.

Serum levels of NT-proBNP (Elecsys, Roche) and troponin I (Dade Behring) were determined using the ELISA method. Interpretation of NT-proBNP measurements was based on the upper normal limits for age and gender. Detection limits and the value of percentile 99 for troponin I in our laboratory are 0.04 ng/ml and 0.11ng/ml respectively.

With regard to genetic study, molecular diagnosis was performed on samples of peripheral blood. Detection of CTG triplet expansions in the DMPK gene in cases of myotonic dystrophy, deletions in the DFS locus in patients with facioscapulohumeral dystrophy, and deletions and repeats in the dystrophin gene was performed using Southern blot analysis. In cases of limb-girdle dystrophy, molecular analysis was preceded by immunocytochemical study of dystrophin, sarcoglycans and dysferlin in skeletal muscle and the search for mutations in calpain exons was performed by PCR-SSCA, followed by sequencing.

RESULTS

During a one-year period, we evaluated 24 consecutive patients, aged 33±11 years, of whom 16 (66.7 %) were male. Cardiological observation occurred around 10 years after the age at which skeletal myopathy had been diagnosed (23±12 years). They had the following

RESULTADOS

Durante um ano, foram avaliados de forma consecutiva 24 doentes, com idade de 33 ± 11 anos, sendo 16 (66,7 %) do sexo masculino. A observação cardiológica ocorreu cerca de 10 anos após a idade de diagnóstico da miopatia esquelética (23 ± 12 anos) Os diagnósticos dos 24 doentes avaliados incluíam: quatro (16,7 %) distrofinopatias (Duchenne-1, Becker-3); nove (37,5 %) distrofias miotónicas de Steinert; seis (25,0 %) miopatias das cinturas, quatro (16,7 %) distrofias FEU e uma disferlinopatia (miopatia de Miyoshi).

Dez doentes (41,7 %) apresentavam sintomas cardíacos: cinco (20,8 %) referiam dor torácica, quatro (16,7 %) dispneia e um (4,2 %) história de síncope. Cinco (20,8 %) tinham hipertensão arterial, cinco dislipidemia, cinco hábitos tabágicos e dois (8,3 %) diabetes *mellitus*.

O ECG revelou alterações em 14 (58,3 %) dos doentes (*Quadro I*).

Cinco (20,8 %) doentes apresentavam disfunção ventricular esquerda sistólica (*Quadro II*): três com distrofinopatias, um com miopatia das cinturas e um com distrofia FEU. Este último doente, além de compromisso da função de ambos os ventrículos, apresentava válvula mitral com folheto anterior redundante.

Um outro doente com distrofia das cinturas tinha hipocinesia da parede lateral, mantendo função global do ventrículo esquerdo conservada. Na história clínica era de destacar um internamento prévio por episódio de «miopericardite» tendo, na altura, disfunção ventricular esquerda severa.

Uma das nove doentes com distrofia miotónica de Steinert possuía marcada dilatação do

Quadro I
Alterações electrocardiográficas

Distrofias musculares N.º doentes		ECG normal N.º doentes	ECG anormal N.º doentes	Alterações do ECG N.º doentes
Duchenne	1	0	1	AIRV (1)
Becker	3	1	2	HVE(1), BRE (1)
Miotónica	9	4	5	MPRP (3), AIRV (1), BRD (1), FA (1)
Cinturas	6	4	2	AIRV (1), HVE (1)
FEU	4	0	4	BRD (2), AIRV (1), BFAE (1)
M. Miyoshi	1	1	0	
Total	24	10	14	

AIRV: Alterações inespecíficas da repolarização ventricular; BFAE: Bloqueio Fascicular Anterior Esquerdo; BRD: Bloqueio Ramo Direito; BRE: Bloqueio Ramo Esquerdo; FA: Fibrilhação auricular; FEU: Facioescapuloumeral; HVE: Hipertrofia Ventricular esquerda; MPRP: Má progressão de R's precordiais.

MD: four (16.7 %) dystrophinopathies (Duchenne: 1, Becker: 3); nine (37.5 %) myotonic dystrophy (Steinert disease); six (25.0 %) limb-girdle myopathy; four (16.7 %) facioscapulohumeral (FSH) myopathy; and one dysferlinopathy (Miyoshi myopathy).

Ten patients (41.7 %) presented cardiac symptoms: five (20.8 %) had thoracic pain, four (16.7 %) dyspnea, and one (4.2 %) a history of syncope. Five (20.8 %) had hypertension, five dyslipidemia, two (8.3 %) diabetes, and five were smokers.

ECG abnormalities were present in 14 cases (58.3 %) (*Table I*).

Five patients (20.8 %) presented systolic left ventricular dysfunction (*Table II*): three with dystrophinopathies, one with limb-girdle myopathy, and one with FSH dystrophy. The latter patient, besides biventricular functional impairment, presented a redundant anterior mitral valve leaflet.

Another patient with limb-girdle dystrophy had lateral wall hypokinesia, with conserved global left ventricular function. The clinical history revealed previous hospitalization for an episode of "myopericarditis", with severe left ventricular dysfunction.

One of the nine patients with Steinert myotonic dystrophy had marked left ventricular apical dilatation (*Fig. 2*) as well as redundant anterior mitral valve leaflet, without prolapse. This patient also had a family history of sudden death.

Among the patients with systolic left ventricular dysfunction, mutations were identified in the three cases of dystrophinopathy and in the patient with FSH dystrophy. In the pa-

Table I
Electrocardiographic abnormalities

Muscular dystrophies No. of patients		Normal ECG No. of patients	Abnormal ECG No. of patients	ECG abnormalities No. of cases
Duchenne	1	0	1	NSVRA (1)
Becker	3	1	2	LVH(1), LBBBB (1)
Myotonic	9	4	5	PPRWP (3), NSVRA (1), RBBB (1), AF (1)
Limb-girdle	6	4	2	NSVRA (1), LVH (1)
FSH	4	0	4	RBBB (2), NSVRA (1), LAFB (1)
Miyoshi myopathy	1	1	0	
Total	24	10	14	

NSVRA: Non-specific ventricular repolarization abnormalities; LAFB: Left anterior fascicular block; RBBB: Right bundle branch block; LBBB: Left bundle branch block; AF: Atrial fibrillation; FSH: Facioscapulohumeral; LVH: Left ventricular hypertrophy; PPRWP: Poor precordial R-wave progression.

Rev Port Cardiol
Vol. 24 Janeiro 05/January 05

Quadro II
Correlações função/anatomia ventricular e genótipo

Distrofia muscular (factores de risco)	Idade Sexo	LVEDD FE (%)	Particularidades Morfológicas	MCD Critérios OMS [7]	Sintomas	Insuficiência Cardíaca Critérios SEC [8]	Gene (Mutação)
Duchenne							
1	26 Homem	59 35%	–	MCD	Dispneia	Sim	**Distrofina** (Delecção do intrão 1 ao exão 49)
Becker							
1 (HTA, dislipidemia)	54 Homem	67 30%	–	MCD	Dispneia Dor torácica*	Sim	**Distrofina** Delecção exões 45-48
1	37 Homem	58 42%	–		Fraqueza muscular	Não	Delecção exões 45-47
Cinturas							
1 (tabagismo)	24 Homem	62 33%	–	MCD	Dispneia	Sim	?**
1 (tabagismo)	37 Homem	53 57%	Hipocinesia da parede lateral do VE		Não	Não	?
FEU							
1	28 Homem	50 44% Disfunção	Folheto ant. da mitral redundante biventricular	–	Fraqueza muscular	Não	**Lócus DFS-4q35** (Delecção D4Z4; fragmento com 21Kb)
Miotónica							
1 (Morte súbita familiar)	38 Mulher	43 50%	Folheto ant. da mitral redundante, Dilatação apical do VE	–	Fraqueza muscular	Não	**DMPK** (1300-1500 repetições CTG)

* Coronárias normais no cateterismo; ** Imunocitoquímica normal para sarcoglicanos, distrofina, adalina e disferlina; ausência de mutações da calpaína (exónicas); MCD: Miocardiopatia Dilatada; OMS: Organização Mundial de Saúde; SEC: Sociedade Europeia de Cardiologia; VE: Ventrículo esquerdo.

Table II
Correlations between ventricular function and anatomy and genotype

Muscular dystrophy (risk factors)	Age Gender	LVEDD EF (%)	Morphological characteristics	DCM (WHO criteria) [7]	Symptoms	Heart failure (ESC criteria) [8]	Gene (mutation)
Duchenne							
1	26 Male	59 35%	–	DCM	Dyspnea	Yes	**Distrofina** (deletion in intron 1 to exon 49)
Becker							
1 (HT, dyslipidemia)	54 Male	67 30%	–	DCM	Dyspnea Thoracic pain*	Yes	**Distrofina** (deletion in exons 45-48)
1	37 Male	58 42%	–		Muscle weakness	No	(deletion in exons 45-47)
Limb-girdle							
1 (smoking)	24 Male	62 33%	–	DCM	Dyspnea	Yes	?**
1 (smoking)	37 Male	53 57%	LV lateral wall hypokinasia		No	No	?
FSE							
1	28 Male	50 44%	Redundant anterior mitra valve leaflet (biventricular dysfunction)	–	Muscle weakness	No	**DFS locus - 4q35** (DAZ4 deletion; 21-kb fragment))
Myotonic							
1 (Family history of sudden death))	38 Female	43 50%	Redundant anterior mitral valve leaflet and LV apical dilatation	–	Muscle weakness	No	**DMPK** (1300-1500 CTG repeats)

* Normal coronary arteries on catheterization; ** Normal immunocytochemical study for sarcoglycans, dystrophin, adhalin and dysferlin; no calpain (exon) mutations; LVEDD: Left ventricular end-diastolic diameter; EF: Ejection fraction; DCM: Dilated cardiomyopathy; WHO: World Health Organization; ESC: European Society of Cardiology; HT: Hypertension; FSH: Facioscapulohumeral; LV: Left ventricle.

ápex do ventrículo esquerdo (*Fig. 2)* além de redundância do folheto anterior da mitral, sem prolapso. Além disso tinha história familiar de morte súbita.

Nos doentes com disfunção ventricular esquerda sistólica, as mutações foram identificadas nos três casos de distrofinopatias e no doente com distrofia FEU. No doente com distrofia das cinturas e compromisso moderado da função sistólica do ventrículo esquerdo, a imunocitoquímica do músculo-esquelético foi normal para sarcoglicanos β, δ, γ, adalina, distrofina e disferlina, tendo sido excluídas mutações exónicas do gene da calpaína.

A doente com distrofia miotónica e dilatação apical do ventrículo esquerdo apresentava 1300-1500 repetições do tripleto CTG do gene DMPK (Dystrophia Myotonica Protein Kinase).

Apenas três dos doentes com disfunção ventricular esquerda sistólica possuíam níveis séricos elevados de NT-proBNP: Duchenne, Becker e distrofia FEU. Os dois primeiros referiam queixas de dispneia e o último apenas fraqueza muscular. Os valores de troponina I foram normais em todos os casos, excepto num doente com distrofia de Becker e disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, que apresentava valores discretamente aumentados (0,23 ng/ml).

DISCUSSÃO

Actualmente o diagnóstico da maioria das distrofias musculares pode ser corroborado através da análise molecular, sendo que a maioria das mutações identificadas ocorre em genes que codificam proteínas do citoesqueleto celular.

As distrofias de Duchenne e Becker, transmitidas pelo cromossoma X, devem-se a mutações do gene da distrofina. A miocardiopatia dilatada é frequente nos casos de distrofinopatias, em especial nos doentes adultos com Becker. Nalguns casos, a cardiopatia surge precocemente, sendo os doentes submetidos a transplante cardíaco, anos antes de manifestarem a miopatia periférica [9]. As portadoras de Duchenne ou Becker têm também risco acrescido de miocardiopatia dilatada [10].

Ao fenótipo *«distrofia das cinturas»* podem corresponder mais de 15 genotipos distintos, sendo mais comuns e graves as formas autossómicas recessivas da doença. O envolvimento cardíaco é variável, geralmente subclínico, e parece ser mais comum nos casos devidos a mutações nos sarcoglicanos γ, β, e δ (formas

tient with limb-girdle dystrophy and moderate systolic LV impairment, immunocytochemical study of skeletal muscle was normal for sarcoglycans β, δ, and γ, adhalin, dystrophin and dysferlin, and exon mutations in the calpain gene were excluded.

The patient with myotonic dystrophy and left ventricular apical dilatation presented 1300-1500 CTG triplet repeats in the DMPK (dystrophia myotonica protein kinase) gene.

Only three patients with systolic LVD had elevated serum NT-proBNP levels, those with Duchenne, Becker and FSH dystrophy. The first two reported symptoms of dyspnea and the third muscle weakness only. Troponin I values were normal in all cases, except in one patient with Becker dystrophy and systolic LVD, who had slightly increased levels (0.23 ng/ml).

DISCUSSION

Diagnosis of most muscular dystrophies can now be confirmed through molecular analysis, most identified mutations being in genes that code for cytoskeletal proteins.

Duchenne and Becker dystrophies, with X-linked inheritance, are caused by mutations in the dystrophin gene. Dilated cardiomyopathy is common in dystrophinopathy, particularly in adults with Becker muscular dystrophy. Cardiopathy appears early in some cases, with patients undergoing heart transplantation years before the onset of peripheral myopathy [9]. Women carriers of Duchenne or Becker dystrophy also have increased risk for dilated cardiomyopathy [10].

The limb-girdle dystrophy phenotype can correspond to more than 15 different genotypes, the most common and severe forms of the disease being autosomal recessive. Cardiac involvement, generally subclinical, varies and appears to be more common in cases resulting from mutations in sarcoglycans γ, β and δ (forms 2C, 2E and 2F, respectively) and in lamin A/C (form 1B). Sarcoglycans are a group of four cell membrane proteins that form a complex that is indirectly linked to intracellular dystrophin. Lamin A/C is an intermediate filament that is part of the inner structure of nuclear membranes, the nuclear lamina. Laminopathy is generally associated with alterations in cardiac conduction [11]. Lamin A/C mutations also explain some familial and sporadic cases of dilated cardiomyopathy, with a high incidence

Rev Port Cardiol
Vol. 24 Janeiro 05/January 05

2C, 2E e 2F, respectivamente) e da lâmina A/C (forma 1B). Os sarcoglicanos são um grupo de 4 proteínas integrais da membrana celular que formam entre si um complexo, que se liga indirectamente à distrofina intracelular. A lâmina A/C é um filamento intermediário que faz parte da estrutura interna à membrana nuclear, a lâmina nuclear. Geralmente as «laminopatias» associam-se a alterações da condução cardíaca [11]. Da mesma forma mutações da lâmina A/C explicam alguns casos familiares e esporádicos de miocardiopatia dilatada, com elevada incidência de morte súbita [12, 13].

A distrofia de *Emery-Dreifuss*, outra forma de distrofia muscular, pode ser autossómica ou ligado ao cromossoma X. As formas autossómica dominante e recessiva são também devidas a mutações da lâmina A/C. A forma ligada ao cromossoma X, deve-se a mutação do gene da emerina. A emerina é uma proteína integral da membrana nuclear interna, que interage directamente com a lâmina A/C. A ocorrência de miocardiopatia, geralmente precedida por defeitos de condução, é uma das características típicas desta forma de distrofia muscular. Os indivíduos afectados podem ter morte súbita ou desenvolver insuficiência cardíaca progressiva.

A *distrofia miotónica de Steinert* associa-se à expansão de unidades de repetição CTG (citosina-timina-guanina) no gene DMPK localizado no cromossoma 19q. Nestes doentes a alteração cardíaca predominante é a progressiva fibrose do sistema de condução com risco de morte súbita por bloqueio cardíaco, mas também por arritmias ventriculares. A relação do número de repetições CTG com as alterações cardíacas não foi estabelecida em todos os trabalhos [14, 15]. A ocorrência de miocardiopatia dilatada é rara, mas pode ocorrer em doentes com distrofia miotónica [16, 17].

A *distrofia facioescapuloumeral*, autossómica dominante, associa-se a deleções da região subtelomérica do cromossoma 4q (lócus DFS), com perda de unidades de repetição D4Z4. Geralmente as alterações cardíacas mais típicas são os defeitos de condução e as arritmias [9].

DISFUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA E GENOTIPO

Na nossa amostra, 25% dos doentes apresentavam remodelagem cardíaca e/ou disfunção ventricular esquerda sistólica. Três deles of sudden death [12, 13].

Another form of muscular dystrophy is Emery-Dreifuss dystrophy, which may be autosomal or X-linked. The autosomal dominant and recessive forms are also caused by lamin A/C mutations, while the X-linked form is due to mutations in the emerin gene. Emerin is a protein of the inner nuclear membrane that interacts directly with lamin A/C. Cardiomyopathy, which is generally preceded by conduction disturbances, is a typical characteristic of this type of muscular dystrophy. Affected individuals may suffer sudden death or develop progressive heart failure.

Myotonic dystrophy (Steinert disease) is associated with expansion of CTG (cytosine-thymine-guanine) triplet repeats in the DMPK gene located on chromosome 19q. The main cardiac alteration in these patients is progressive fibrosis of the conduction system, with risk of sudden death due to heart block or ventricular arrhythmias. A relation between the number of CTG repeats and cardiac involvement has not been established in all studies [14, 15]. Dilated cardiomyopathy in patients with myotonic dystrophy is rare, but it can occur [16, 17].

Facioscapulohumeral dystrophy, of autosomal dominant inheritance, is associated with deletion of D4Z4 repeats in the subtelomere region of chromosome 4q (DFS locus). The most typical cardiac alterations are conduction defects and arrhythmias [9].

LEFT VENTRICULAR DYSFUNCTION AND GENOTYPE

In our sample, 25% of patients presented cardiac remodeling and/or systolic left ventricular dysfunction. Three of them (12.5% of the study population) had severe systolic dysfunction and dilated cardiomyopathy, according to the WHO criteria, and heart failure based on European Society of Cardiology criteria. Cardiac abnormalities were detected in patients with different types of muscular dystrophy: Becker, Duchenne, limb-girdle, FSH and Steinert myotonic dystrophies. Mutations in the gene for dystrophin (a cytoskeletal protein) were associated with most cases of systolic left ventricular dysfunction.

The deletions identified in patients with dystrophinopathy, particularly the two patients with Becker MD, were located in domains that have been associated with dilated cardiomyo-

(12,5 % da população) tinham disfunção sistólica grave e miocardiopatia dilatada segundo os critérios da OMS e critérios de insuficiência cardíaca de acordo com a Sociedade Europeia de Cardiologia. As alterações cardíacas foram detectadas em doentes portadores de formas distintas de distrofia muscular: Becker, Duchenne, Cinturas, Distrofia FEU e distrofia miotónica de Steinert. As mutações do gene da distrofina (proteína do citoesqueleto), associaram-se à maioria dos casos de disfunção ventricular esquerda sistólica.

As deleções identificadas nos doentes com distrofinopatias, nomeadamente nos dois doentes com Becker, ocorrem em domínios cuja associação com a miocardiopatia dilatada foi já descrita na literatura. Inclusive, as deleções envolvendo os exões 48 e 51, foram igualmente identificadas em casos esporádicos e familiares de miocardiopatia dilatada ligada ao cromossoma X [13]. Nestas formas de miocardiopatia, os doentes tipicamente afectados são homens jovens com formas letais de miocardiopatia e mulheres de meia-idade com doença cardíaca lentamente progressiva. Noutros casos esporádicos (não familiares) de miocardiopatia dilatada foram identificadas mutações pontuais da distrofina [19]. Uma das pistas para a identificação destas formas de distrofinopatias pode ser a elevação da CK sérica.

No doente com miopatia das cinturas e disfunção ventricular esquerda não foi possível confirmar o diagnóstico genético, embora o estudo imunocitoquimico fosse normal para sarcoglicanos β, γ, e δ, distrofina, adalina e disferlina. Note-se que as mutações da adalina [20], juntamente com mutações dos sarcoglicanos e distrofina, são reconhecidas causas de miocardiopatia dilatada.

No doente com distrofia FEU e compromisso da função sistólica dos ventrículos direito e esquerdo foi identificado um fragmento de 21Kb (utilizando as enzimas de restrição EcoR1/Bln1), resultante da deleção de repetições D4Z4. Na literatura são raros os casos de miocardiopatia nestes doentes, tendo sido descrito um caso de taquicardia ventricular no contexto de miocardiopatia arritmogénica do ventrículo direito [2].

A doente com distrofia miotónica e história familiar de morte súbita não apresentou episódios arrítmicos no Holter de 24 horas. O padrão «pseudonecrótico» no ECG frequente em doenpathy in the literature. Deletions involving exons 48 and 51 have also been identified in cases of idiopathic and familial X-linked dilated cardiomyopathy [13]. They are typically found in young men with fatal forms of cardiomyopathy and middle-aged women with slowly progressive heart disease. Point mutations in the dystrophin gene have been identified in other sporadic, non-familial, cases of dilated cardiomyopathy [19]. One clue to identifying these forms of distrophinopathy may be elevated serum CK levels.

It was not possible to confirm the diagnosis genetically in the patient with limb-girdle myopathy and left ventricular dysfunction, although the immunocytochemical study was normal for sarcoglycans β, γ and δ, dystrophin, adhalin and dysferlin. It should be noted that mutations in the adhalin gene [20], as well as in those for sarcoglycans and dystrophin, are known causes of dilated cardiomyopathy.

A 21-kb fragment was identified (using the restriction enzymes EcoR1/Bln1), the result of deletion of D4Z4 repeats, in the patient with FSH dystrophy and systolic biventricular dysfunction. Cases of cardiomyopathy in such patients are rare in the literature, but one case has been reported of ventricular tachycardia in arrhythmogenic cardiomyopathy of the right ventricle [2].

The patient with myotonic dystrophy and a family history of sudden death did not present arrhythmic episodes on 24-hour Holter monitoring. The pseudonecrotic ECG pattern frequently observed in patients with myotonic dystrophy [16] presented a progressive character in this patient (*Fig. 1*), associated with left ventricular apical dilatation (*Fig. 2*). Doshi [21] also reported alterations in left ventricular segmental function despite angiographically normal coronary arteries. The fact that this patient had the greatest number of CTG repeats among our sample of patients with myotonic dystrophy supports the idea that this number is linked to cardiac involvement.

BIOMARKERS OF VENTRICULAR DYSFUNCTION

Recent studies have highlighted the role of measuring serum brain natriuretic peptide (BNP) in the diagnosis and assessment of drug response in heart failure patients. BNP measu-

Rev Port Cardiol
Vol. 24 Janeiro 05/January 05

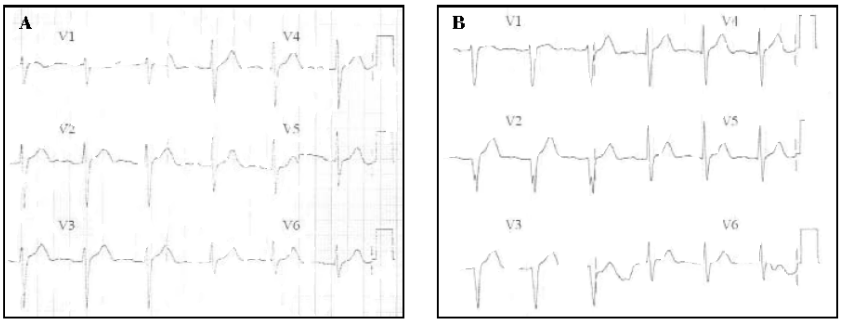


Fig. 1 Electrocardiogramas (derivações precordiais) de 1997 (A) e 2003 (B) da doente com Distrofia Miotónica e 1300-1500 repetições CTG do gene DMPK. Entre os dois registos observa-se o aparecimento de um padrão de «pseudoenfarte» da parede anterior.

Fig. 1 Electrocardiograms (precordial leads) from 1997 (A) and 2003 (B) of the patient with myotonic dystrophy and 1300-1500 CTG repeats in the DMPK gene. Comparison of the two exams reveals a 'pseudoinfarction' pattern of the anterior wall.

tes com distrofia miotónica[16], apresenta um carácter evolutivo neste caso (*Fig. 1*), associado à presença da dilatação apical do ventrículo esquerdo (*Fig. 2*). Doshi[21] também relatou a presença de alterações da função segmentar do ventrículo esquerdo apesar de artérias coronárias angiograficamente normais. O facto desta doente apresentar o maior número de repetições CTG da nossa amostra de doentes com distrofia miotónica, apoia a hipótese da associação deste número com a ocorrência de manifestações cardíacas.

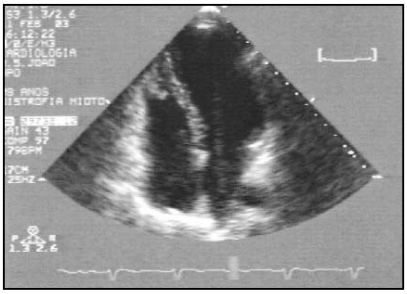


Fig. 2 Imagem do ecocardiograma da mesma doente, em que se observa a presença de dilatação apical do ventrículo esquerdo.

Fig. 2 Echocardiogram of the same patient showing left ventricular apical dilatation.

BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO VENTRICULAR

Estudos recentes têm vindo a pôr em evidência o papel que o doseamento sérico do BNP (Brain Natriuretic Peptide) pode ter no diagnóstico e na avaliação da resposta à terapêutica em doentes com insuficiência cardíaca. Deste modo, o doseamento de BNP, juntamente com a caracterização molecular, poderiam ser parâmetros úteis na monitorização cardiológica de doentes com distrofia muscular, quer na fase sintomática, quer pré-sintomática.

A avaliação neuroendócrina em doentes com distrofias musculares, incluindo o doseamento de BNP, foi efectuada por Ishikava[22], que demonstrou o benefício da terapêutica com inibidores da enzima de conversão da angiotensina e bloqueadores-beta, em doentes com distrofia de Duchenne e sinais e sintomas de insuficiência cardíaca. Nestes ocorreu diminuição do BNP com a instituição da terapêutica farmacorement, together with molecular analysis, may be useful parameters for cardiac monitoring of patients with muscular dystrophy, at both the symptomatic and pre-symptomatic stage.

Neuroendocrinological assessment of MD patients, including BNP measurement, was performed by Ishikawa[22], who demonstrated the benefit of treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers in patients with Duchenne dystrophy and signs and symptoms of heart failure, in whom BNP levels fell with pharmacological therapy. Adachi[23] reported high BNP levels in a female gene carrier of Duchenne dystrophy before the appearance of heart failure symptoms.

On the other hand, markers of myocardial necrosis such as troponin I do not appear to rise in most patients with dystrophinopathies and

lógica. Adachi [23] relatou a elevação de BNP numa mulher portadora de distrofia de Duchenne, previamente ao aparecimento de sintomas de insuficiência cardíaca.

Por outro lado, um marcador de necrose miocárdica como a troponina I, parece não aumentar na maioria dos doentes distrofinopatias e miocardiopatia dilatada [24, 25]. Persiste por determinar se a morte dos cardiomiócitos é ou não um fenómeno importante, homogéneo ao longo do tempo e equivalente em todos os subtipos de distrofias musculares.

Na nossa amostra os valores de NT-ProBNP encontravam-se elevados em três dos cinco doentes com compromisso da função sistólica: doentes com distrofias de Becker, Duchenne e FEU. Apenas um doente com distrofia de Becker apresentava níveis ligeiramente aumentados de troponina I.

CONCLUSÕES/IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Os nosso resultados, embora preliminares, indicam que, numa elevada percentagem de doentes com patologia do músculo esquelético de causa genética, as mutações associadas podem também ter repercussão funcional a nível das células musculares cardíacas, ocasionando disfunção ventricular grave. Deste modo, os nossos dados reforçam a ideia de que a disfunção ventricular esquerda deve ser rastreada nos doentes com distrofias musculares na idade adulta e nos diversos tipos de doença muscular. O diagnóstico da afecção muscular cardíaca parece depender actualmente da realização de ecocardiograma; contudo, o diagnóstico de insuficiência cardíaca, seguindo os critérios da Sociedade Europeia de Cardiologia (sintomas e evidência objectiva de disfunção cardíaca), reveste-se de uma complexidade particular neste contexto. De facto, embora um doente com distrofia muscular possa apresentar disfunção ventricular, os sintomas de dispneia ou astenia poderão ser atribuídos apenas ao envolvimento dos músculos respiratórios ou dos membros pela miopatia. A avaliação da situação é ainda mais complexa se considerarmos que a dispneia e a astenia devidas à insuficiência cardíaca de outras etiologias podem ser atribuídas a alterações moleculares secundárias dos mesmos grupos musculares (respiratórios e dos membros).

Assim, na génese dos sintomas e portanto na atribuição do diagnóstico de insuficiência cardíaca

dilated cardiomyopathy [24, 25]. It remains to be determined whether cardiomyocyte death is an important phenomenon, homogeneous over time and the same in all subtypes of muscular dystrophy.

In our sample, NT-proBNP levels were elevated in three of the five patients with impaired systolic function, those with Becker, Duchenne and FSH dystrophies. Only one patient, with Becker muscular dystrophy, presented slightly raised troponin I levels.

CONCLUSIONS AND CLINICAL IMPLICATIONS

Our results, although preliminary, show that a high percentage of patients with genetically-determined skeletal myopathies exhibit functional impairment of cardiac myocytes, causing severe ventricular dysfunction. Our data therefore reinforce the idea that adult patients with different forms of muscular dystrophy should be screened for left ventricular dysfunction. Diagnosis of cardiac involvement is currently based on echocardiography; however, diagnosis of heart failure according to the criteria of the European Society of Cardiology (symptoms and objective evidence of cardiac dysfunction) is particularly complicated in this situation. Although a patient with muscular dystrophy may present ventricular dysfunction, symptoms of dyspnea or asthenia may be attributed merely to involvement of respiratory or limb muscles due to the myopathy. Assessment of the situation is further complicated by the fact that dyspnea and asthenia due to heart failure of other etiologies may be attributed to secondary molecular alterations in the same muscle groups (respiratory and limb).

Therefore, when determining the genesis of symptoms and a possible diagnosis of heart failure in these patients, the contribution of both cardiac involvement and degree of muscular damage due to dystrophy must be considered. This is by no means an easy task and markers such as BNP could be useful for diagnosis.

Until recommendations have been agreed, cardiovascular surveillance should be scheduled bearing in mind the resources available, but may be optimized in the future through determining genotype-phenotype correlations. Patients with dystrophinopathies (Duchenne and Becker) and those with sarcoglycanopathies or laminopathies would appear for now to be the

Rev Port Cardiol
Vol. 24 Janeiro 05/January 05

díaca, deve ser ponderado o contributo da afecção cardíaca juntamente com o grau de lesão muscular pela distrofia. Este exercício não é obviamente fácil e marcadores, como o BNP, poderão vir a demonstrar-se úteis no diagnóstico.

A programação da vigilância cardiovascular, na ausência de recomendações consensuais, deve ser temporizada atendendo aos recursos locais, podendo ser optimizada, no futuro, através do estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo. Os doentes com distrofinopatias (Duchenne e Becker) e distrofias por sarcoglicanopatias ou lâminopatias, parecem ser, desde já, um grupo prioritário em termos de periodicidade de *follow-up*.

Só estudos a mais larga escala poderão esclarecer o benefício da terapêutica farmacológica ou outras medidas, como a ressincronização miocárdica, em doentes com distrofias musculares e disfunção ventricular e relacionar (ou não) a resposta com o tipo de genotipo.

priority group in terms of regular follow-up.

Only larger-scale studies will clarify the benefit of pharmacological therapy and other measures such as myocardial resynchronization in patients with muscular dystrophies and ventricular dysfunction and determine whether response is related to genotype.

Pedidos de separatas para:
Address for reprints:

ELISABETE MARTINS
Serviço de Cardiologia
Hospital de São João
Alam. Prof. Hernâni Monteiro
4200-319 PORTO, PORTUGAL

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Emery AEH. The muscular dystrophies. Lancet 2002; 359:687-95.

2. Laforêt P, Toma C, Eymard B, et al. Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neurology 1998;51:1454-1456.

3. Emery AEH, Burt D. Intracellular calcium and pathogenesis and antenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. BMJ 1980;280:355-7.

4. Xiong D, Lee GH, Badorff C, et al. Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: A genetic predisposition to viral heart disease. Nat Medicine 2002;8:872-7.

5. Gnecchi-Ruscone T, Taylor J, Mercuri E, et al. Cardiomyopathy in Duchenne, Becker, and Sarcoglycanopathies: a role for coronary dysfunction? Muscle Nerve 1999;22:1549-56.

6. Schiller NB, Shah PM, Crawford M et al. Recommendations for Quantitation of Left Ventricle by Two-Dimensional Echocardiography. J Am Soc Echocardiography 1989;2(5): 358-67.

7. Richardson P, Mckenna W, Bristow MR, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. Circulation 1996; 93:841-2.

8. The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure. Eur Heart J 2001;22 (17):1527-60.

9. Finsterer J, Bittner RE, Grimm M. Cardiac involvement in Becker`s muscular dystrophy, necessitating heart transplantation, 6 years before apparent skeletal muscle involvement. Neuromuscul Disord 1999;9(8):598-600.

10. Hoogerwaard EM, Van der Wouw PA, Wilde AA, et al. Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 1999;9(5):347-51.

11. Van der Kooi AJ, Bonne G, Eymard B ,et al. Lamin A/C mutations with lipodystrophy, cardiac abnormalities and muscular dystrophy. Neurology 2002;59(4):620-3.

12. Becane HM, Bonne G, Varnous S, et al. High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. Pacing Clin Electrophysiol 2000; 23: 1661-1666

13. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. N Eng J Med 1999;341:1715-24.

14. Merlevede K, Vermander D, Theys P, Legius E, Ector H, Robberecht W. Cardiac involvement and CTG expansion in myotonic dystrophy. J Neurol 2002;249(6):693-8.

15. Clarke NR, Kelion AD, Nixon J, Hilton-Jones D, Forfar JC. Does cytosine-thymine-guanine (CTG) expansion size predict cardiac events and electrocardiographic progression in myotonic dystrophy? Heart 2001;86(4):411-6.

16. Melacini P, Buja G, Fasoli G, et al. The natural history of cardiac involvement in myotonic dystrophy: an eight-year follow-up in 17 patients. Clin Cardiol 1988;11(4):231-8.

17. Sonaglioni G, Curatola L, Bollettini et al. Echocardiographic findings in dystrophia myotonica (Steinert disease). G Ital Cardiol 1984;14(8):551-6.

18. Muntoni F, Di Lenarda A, Porcu M et al. Dystrophin gene abnormalities in two patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Heart 1997;78:608-12.

19. Feng J, Yan J, Buzin CH, Towbin JA, Sommer SS. Mutations in the dystrophin gene are associated with sporadic dilated cardiomyopathy. Mol Genet Metab 2002;77(1-2):119-26.

20. Fadic R, Sunada Y, Waclawik A, et al. Deficiency of a Dystrophin-Associated Glycoprotein (Adhalin) in a Patient with Muscular Dystrophy and Cardiomyopathy. N Eng J Med 1996;334(6):362-6.

21. Doshi SN, Sharma SK, Kim MC. Normal coronary arteries and isolated, regional, left ventricular dysfunction in myotonic dystrophy: a case report. Int J Cardiol 2002;83(2):191-3.

22. Ishikawa Y, Bach JR, Minami R. Cardioprotection for Duchenne's muscular dystrophy. Am Heart J 1999;137(5):895-902.

23. Adachi K, Kawai H, Saito M, et al. Plasma levels of brain natriuretic peptide as an index for evaluation of cardiac function in female gene carriers of Duchenne muscular dystrophy. Intern Med 1997;36(7):497-500.

24. Hammerer-Lercher A, Erlacher P, Bittner R, et al. Clinical and Experimental Results on Cardiac Troponin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy. Clin Chem 2001; 47(3):451-8.

25. Hoogerwaard EM, Schouten Y, Van der Kooi A, et al. Troponin T and Troponin I in Carriers of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy with Cardiac Involvement. Clin Chem 2001;47(3):962-3.

7th International Conference of Nuclear Cardiology

Lisbon Congress Centre
Lisbon, Portugal, 8-11 May 2005

ICNC7 Secretariat
E.S.C. - European Heart House
2035, route des Colles – Les Templiers – BP 179
06903 Sophia Antipolis Cedex, France
Tel. +33 (0)4 92 94 86 80 – Fax +33 (0)4 92 94 86 81
E-mail: icnc@escardio.org
Web Site: www.escardio.org then click on the ICNC7 icon

Survival of patients with familial dilated cardiomyopathies on optimal heart failure theraphy

Survival of Patients with Familial Dilated Cardiomyopathy on Optimal Heart Failure Therapy [24]

ELISABETE MARTINS, JOSÉ SILVA CARDOSO, MANUEL CAMPELO, SANDRA AMORIM, BRENDA MOURA, MARIA JÚLIA MACIEL, FRANCISCO ROCHA GONÇALVES

Serviço de Cardiologia, Hospital de São João, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2009; 28 (3): 263-268

ABSTRACT

Background: Familial dilated cardiomyopathy (FDCM) is characterized by clinical and genetic heterogeneity. There are still few survival studies concerning this subgroup of patients.

Aim: To determine the prognosis of patients with FDCM on optimal medical therapy and attending a heart failure clinic.

Methods: This is a prospective study including patients with FDCM, defined according to the guidelines of the European Society of Cardiology. Cardiovascular morbidity and all-cause mortality were evaluated.

Results: Thirty-six patients, 23 (64%) men, were followed for 3.8±2.5 years. Age at baseline was 42±14 years and 67% were in NYHA class II. In 22% heart failure symptoms first occurred after a respiratory infection, and in 6%, after pregnancy/delivery. Most patients were in sinus rhythm (89%) and 33% had left bundle branch block (LBBB). Baseline left ventricular (LV) ejection fraction was 28±9%, LV end-diastolic diameter was 68±8 mm and left atrial dimension was 46±9 mm. Baseline serum sodium was 140±3 mEq/l. All patients were taking angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) or angiotensin-II receptor blockers (ARBs), 81% beta-blockers and 47% spironolactone.

During follow-up, 5 patients died, 4 underwent heart transplantation and one received an implantable cardioverter-defibrillator. Five-year survival was 68%.

Conclusions: Five-year survival of our patients

RESUMO

Sobrevida de doentes com miocardiopatia dilatada familiar, sob terapêutica optimizada da insuficiência cardíaca

Introdução: As formas familiares de miocardiopatia dilatada (MCD) caracterizam-se pela heterogeneidade clínica e genética, havendo ainda poucos estudos de sobrevida neste subgrupo de doentes.

Objectivo: Determinar o prognóstico dos casos familiares de MCD seguidos numa consulta de insuficiência cardíaca, sob terapêutica médica optimizada.

Métodos: Foram incluídos prospectivamente os doentes com o diagnóstico de MCD familiar, definido de acordo com as recomendações da Sociedade Europeia de Cardiologia. Foram analisados os dados relativos à mortalidade e morbilidade cardiovascular.

Resultados: Durante 3,8 ± 2,5 anos foram observados 36 doentes, 23 (64%) homens. A idade inicial era de 42 ±14 anos, encontrando-se 67% em classe II de NYHA. Em 22% dos casos, o aparecimento dos sintomas de insuficiência cardíaca ocorreu após uma infecção respiratória e, em 6%, após a gravidez/parto. A maioria dos doentes encontrava-se em ritmo sinusal (89%) e 33% tinham bloqueio de ramo esquerdo. O valor da fracção de ejecção era de 28 ± 9%, o diâmetro telediastólico do ventrículo esquerdo de 68 ± 8 mm, o da aurícula esquerda de 46 ± 9 mm e o sódio plasmático de 140 ± 3 mEq/L. Todos

Recebido para publicação: Janeiro de 2008 • Aceite para publicação: Novembro de 2008
Received for publication: January 2008 • Accepted for publication: November 2008

Rev Port Cardiol
Vol. 28 Março 09 / March 09

with FDCM, under optimal medical therapy, was similar to that of other forms of non-ischemic DCM reported in the literature.

Key words
Familial dilated cardiomyopathy; Prognosis; Heart failure therapy.

os doentes foram medicados com inibidores da enzima de conversão da angiotensina ou bloqueadores dos receptores da angiotensina II, 81% com bloqueadores-beta e 47% com espironolactona. Durante o seguimento cinco doentes faleceram, quatro foram submetidos a transplante cardíaco e um implantou um cardiodesfibrilhador. A sobrevida aos cinco anos foi de 68%.
Conclusões: Na nossa amostra, a sobrevida aos cinco anos de doentes com MCD familiar, sob terapêutica médica optimizada, foi idêntica à de outras formas de miocardiopatia não-isquémica, referidas na literatura.

Palavras-Chave
Miocardiopatia dilatada familiar; Prognóstico; Terapêutica; Insuficiência cardíaca.

INTRODUCTION

The first series of patients with familial dilated cardiomyopathy (FDCM) were identified in the 1980s[1,2]. Since then, on the basis of echocardiographic screening of asymptomatic siblings of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM), the frequency of this genetically determined subgroup of cardiomyopathies has been estimated at over 25%[3-5]. Several genes and loci have been identified in different families[6] coding for different cardiomyocyte proteins of the sarcomere[7], the cytoskeleton[8], sarcolemma[9], nuclear membrane[10] and ion channels[11,12]. Despite this molecular heterogeneity, some genotype-phenotype correlations have been established, such as lamin mutations and conduction system disturbances[13], the Eya4 gene and sensorineural hearing loss[14], and dystrophin-associated glycoprotein complex and skeletal muscle disease[15]. A few prognostic correlations have also been identified, including the presence of troponin complex mutations and the risk of death at young ages[16]. Despite this growing knowledge, genetic screening is still not accessible to most clinicians, and many families still await molecular diagnosis.

As in other genetic cardiac diseases, FDCM is characterized by clinical diversity[17]. The same mutation can be present in an asymptomatic carrier state and have no phenotypic expression, or, at the other extreme, may cause sudden death during childhood. Under these circumstances, when a pathogenic mutation is identified, the particular clinical course of a patient with FDCM cannot be predicted. The aggressiveness of the mutation may be modulated by different genetic backgrounds, the presence of comorbidities, exposure to noxious agents or medical therapy. As in other cardiomyopathies, neurohormonal blockade is key in terms of therapy.

From a clinical point of view, whether or not the mutated gene has been identified, it is important to ascertain the overall prognosis of FDCM. Few studies to date have addressed the survival of this subgroup of DCM patients. A recently published study involving a large series of patients[18] showed no difference in prognosis at 6 years of follow-up of FDCM compared to other forms of DCM; however, the medical therapy of the patients enrolled was not described.

We aimed to determine the prognosis of a cohort of FDCM patients on optimal medical treatment, followed in our heart failure clinic.

METHODS

In this prospective study we included patients with FDCM consecutively identified at a heart failure clinic of a university hospital over a 5-year

period between December 1999 and December 2005. FDCM was defined according to the European Society of Cardiology ESC guidelines[19].

First-degree relatives of patients considered to have idiopathic DCM were evaluated by clinical history, physical examination, ECG and 2D echocardiogram. The diagnosis of idiopathic DCM was changed to that of FDCM whenever the affected state was present in one or more than one relatives of the index patient. The definition of affected state can be found in the ESC guidelines[19]. In summary, the two major criteria for the definition of FDCM are the presence of DCM in two or more individuals in a single family or the occurrence of unexplained sudden cardiac death in a first-degree relative under 35 years of age. For minor criteria please refer to the ESC guidelines[19].

Echocardiographic measurements were performed according to the recommendations of the American Society of Echocardiography[20]. All echocardiograms were performed by the same cardiologist using a Hewlett Packard Sonos 5500 machine.

All patients over 35 years of age, irrespective of risk factors, underwent myocardial perfusion scintigraphy and/or coronary angiography to exclude ischemic etiology.

During follow-up, patients were treated according to the chronic heart failure guidelines[21,22].

Data on cardiovascular hospitalizations, implantations of cardioverter-defibrillators (ICDs), cardiac transplantation and all-cause death were recorded.

Statistics: Kaplan-Meier curves were used for survival analysis and survival time was censored at heart transplantation and resuscitated cardiac arrest. The prognostic significance of clinical and echocardiographic data was assessed using a Cox proportional hazards model.

Ethics: The protocol was reviewed and approved by the ethics committee of our institution and all participants signed an informed consent agreement form.

This investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

RESULTS

We included 36 patients with FDCM, 23 (64%) men. They were followed for 3.8±2.5 years. The presence of one or more first-degree relatives of the index patient presenting DCM established the diagnosis of FDCM in 94% of cases. In the remainder the diagnosis was established by the occurrence of unexplained sudden death before the age of 35 in a first-degree relative.

Mean age at baseline was 42±14 years. Heart failure symptoms first occurred, on average, 2 years before inclusion (40±14 years). Most patients (67%) were in NYHA class II, and in 14 (39%) a precipitating factor could be identified (*Table I*).

Table I. **Baseline characteristics of the patients**

Characteristics	*n (%) or mean ± SD*
Male	**23 (64)**
Age (years)	
At baseline	42±14
At first symptoms	40±14
Factors	
Pulmonary infection	8 (22)
Alcohol abuse	4 (11)
Pregnancy/Delivery	2 (6)
NYHA	
Class III	4 (11)
Class II	24 (67)
Class I	8 (22)
2D-Echo measurements	
LA (mm)	46±9
LVEDD (mm)	68±8
EF (%)	28±9
ECG	
Atrial fibrillation	4 (11)
LBBB	12 (33)
Plasma sodium (mEq/l)	140±3
Heart failure therapy	
ACEIs/ARBs	36 (100)
BB	29 (81)
SPIRO	17 (47)
Diuretics	28 (78)
Digitalis	18 (50)

ACEIs: angiotensin converting enzyme inhibitors, ARBs: angiotensin-II receptor blockers, BB: beta-blockers, EF: ejection fraction, LA: left atrium, LBBB: left bundle branch blockage, LVEDD: left ventricular end-diastolic dimension, LVH: left ventricular hypertrophy, NYHA: New York Heart Association, SPIRO: spironolactone, 2D-ECHO: transthoracic echocardiogram

Rev Port Cardiol
Vol. 28 Março 09 / March 09

Four patients (11%) had atrial fibrillation and 12 (33%) had LBBB at baseline. Left ventricular ejection fraction was 28±9%, left ventricular end-diastolic diameter 68±8 mm, left atrial dimension 46±9 mm and serum sodium 140±3 mEq/l.

All patients were treated with an ACEI or ARB, 85% with a beta-blocker, 49% with spironolactone, 78% with diuretics and 50% with digitalis.

During follow-up, 11 patients were hospitalized (eight due to acute heart failure), five died, one received an ICD after a sudden cardiac arrest and four underwent heart transplantation (*Table II*).

Table II. **Clinical outcomes**

Outcome	*n (%)*
Hospitalizations	11 (31)
Acute heart failure	8 (22)
Syncope	1 (3)
Pneumonia	2 (6)
Death	5 (14)
SD*	3 (8)
CHF	2 (6)
Unknown cause	1 (3)
Heart transplantation	4 (11)

CHF: congestive heart failure; SD: sudden death
* One patient was resuscitated and a defibrillator was implanted

Five-year survival was 68% (*Figure 1*). None of the variables recorded at baseline (age, gender, NYHA class, LV ejection fraction, LV end-diastolic and left atrial dimensions, atrial fibrillation or LBBB) could independently predict outcome.

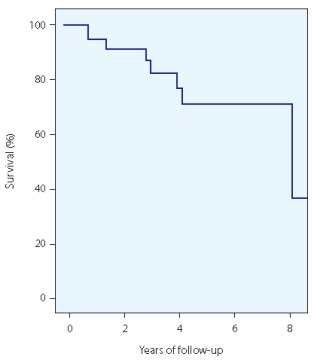


Figure 1. **Kaplan-Meier survival curve**

DISCUSSION

Several genes and loci have been implicated in the etiology of FDCM[23]. The prognosis of a few DCM families has been described in the literature in association with their genetic profile[16,24].

Michels and colleagues recently[18] published a retrospective follow-up study, analyzing the outcome of 30 FDCM patients. They reported a five-year survival rate of 51%. In that study, the authors assumed that all the patients received optimal treatment.

This is relevant in the day-to-day clinical setting because medical treatment for FDCM remains the same as that used in other forms of DCM.

In our work, we prospectively analyzed the prognosis of FDCM patients on medical therapy according to the chronic heart failure therapy guidelines[21,22]. The five-year survival of our population was 68%, which is consistent with the five-year survival of 50-70% reported in more recent studies on the prognosis of non-ischemic DCM[25,26]. It is possible that in the near future we will be able to positively influence the prognosis of this condition by using neurohormonal blockade at early stages of phenotypic expression of the disease.

We were unable to find any clinical variable that could independently predict outcome at first visit, but this must be interpreted with caution considering the small sample size. The significance of B-type natriuretic peptide was not evaluated since it was not measured in all patients at first visit.

The severity of the disease at diagnosis is an important factor to consider when analyzing outcome, and cardiologists dealing with FDCM diagnose the disease at different stages, including in asymptomatic patients. In our cohort, with more than 75% patients in NYHA class II/III at first consultation, five-year mortality was around 30%.

Some of our patients presented their first symptoms simultaneously with the occurrence of a pulmonary infection or of pregnancy, or had a history of alcohol abuse. All of them ceased alcohol consumption after DCM diagnosis. They were considered to have FDCM because two or more relatives were affected by the disease at young ages, with no other identifiable causes.

In our experience the familial forms of DCM are often diagnosed when the relatives of a proband with DCM first attributed to other etiology are studied. In an era when molecular diagnosis is not available on a large scale, the accuracy of the diagnosis of FDCM, depends not only on familial screening, not only of patients with idiopathic DCM but also of those with DCM apparently due to common etiological factors, such as alcohol. In these cases environmental factors may determine gene expression and prognosis.

The importance of gene-environment interplay has been thoroughly demonstrated in recent studies on enterovirus-induced cardiomyopathy and dystrophin deficiency[27] and anthracycline toxicity and ErbB2 mutations[28]. We did not analyze the impact of a past history of alcohol abuse or infection on DCM prognosis. Larger studies with better knowledge of the genetic background, controlling for external exposures, will be necessary in order to determine the independent contribution of each factor to phenotypic presentation and disease progression.

LIMITATIONS

The inclusion of patients based exclusively on clinical data constitutes one of the limitations of our work. Due to this fact our results may reflect the prognosis of a selected subgroup of FDCM patients, most of them carriers of mutations with a reasonable penetrance, highlighting a "positive" family history of the disease. The present unavailability of easy access to genetic screening has to be borne in mind in clinical studies, especially when analyzing the prognosis of patient groups with other forms of cardiomyopathy in which sporadic DCM mutations could be present.

CONCLUSIONS

The five-year survival of our FDCM patients on optimal medical treatment was similar to that of other forms of non-ischemic DCM reported in the literature. No clinical or echocardiogram variable evaluated at baseline was able to independently predict prognosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Altamiro Pereira, MD. Ph.D., for providing assistance in statistical analysis.

Pedido de Separatas:
Address for reprints:

ELISABETE MARTINS
Serviço de Cardiologia
Hospital de São João
4200-319 Porto
e-mail: elisabetemartins09@gmail.com

REFERENCES

1. Michels VV, Driscoll DJ, Miller FA. Familial aggregation of idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1985; 55(9): 1232-3.

2. Valantine HA, Hunt SA, Fowler MB et al. Frequency of familial nature of dilated cardiomyopathy and usefulness of cardiac transplantation in this subset. Am J Cardiol 1989; 63(13): 959-63.

3. Mahon NG, Murphy RT, MacRae CA et al. Echocardiographic evaluation in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy reveals preclinical disease. Ann Inter Med 2005; 143(2):108-115.

4. Baig MK, Goldman JH, Caforio AL et al. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. J Am Coll Cardiol 1998; 31(1):195-201.

5. Grunig E, Tasman JA, Kücherer H et al. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1998; 31(1):186-94.

6. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2005; 45(7): 969-81.

Rev Port Cardiol
Vol. 28 Março 09 / March 09

7. Kamisago M, Sharma SD, Depalma SR et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. N Eng J Med 2000; 343(23): 1688-96.

8. Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S et al. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular noncompaction. J Am Coll Cardiol 2003; 42(11): 2014-27.

9. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M et al. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 2000; 106(5): 655-62.

10. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T et al. Missense mutations in the rod domain of lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. N Eng J Med 1999; 341(23): 1715-24.

11. Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. Nat Genet 2004; 36(4): 382-7.

12. McNair WP, Ku L, Taylor MR et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder and arrhythmia. Circulation 2004; 110(15): 2163-67.

13. Perrot A, Sigusch HH, Nagele H et al. Genetic and phenotypic analysis of dilated cardiomyopathy with conduction system disease: demand for strategies in the management of presymptomatic lamin A/C mutant carriers. Eur J Heart Fail 2006; 8(5): 484-93.

14. Schönberger J, Wang L, Shin JT et al. Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. Nat Genet 2005; 37(4): 418-22.

15. Barresi R, Di Blasi C, Negri T et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by sarcoglycan mutations. J Med Genet 2000; 37(2): 102-7.

16. Mogensen J, Murphy RT, Shaw T et al. Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2004; 44(10): 2033-40.

17. Mestroni L, Rocco C, Gregori D et al. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity heart muscle disease study group. J Am Coll Cardiol 1999; 34(1): 181-90.

18. Michels VV, Driscoll DJ, Miller FA et al. Progression of familial and non-familial dilated cardiomyopathy: long term follow up. Heart 2003; 89(7): 757-61.

19. Mestroni L, Maish B, McKenna WJ et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies collaborative research group of the European Human and Capital Mobility Project on familial dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 1999; 20(2): 93-102.

20. Schiller NB, Shah PM, Crawford M et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. J Am Soc Echocardiogr 1989; 2(5): 358-67.

21. Hunt SA, Backer DW, Chin MH et al. ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation 2001; 104: 2996-3007.

22. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult- Summary Article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation 2005; 112:154-235.

23. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2005; 45(7): 969-81.

24. Taylor MR, Fain PR, Sinagra G et al. Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. J Am Coll Cardiol 2003; 41(5): 771-80.

25. Felker GM, Thompson RE, Hare JM et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. N Eng J Med 2000; 342(15): 1077-84.

26. Di Lenarda A, Pinamonti B, Mestroni L et al. The natural history of dilated cardiomyopathy: a review of the heart muscle disease registry of Trieste. Ital Heart J Suppl 2004; 5(4): 253-66.

27. Xiong D, Lee GH, Badorff C et al. Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: A genetic predisposition to viral heart disease. Nat Med 2002; 8(8): 872-77.

28. Crone SA, Zhao YY, Fan L et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. Nat Med 2002; 8(5): 359-465.

^{123}-I-MIBG CARDIAC UPTAKE IMAGING IN FAMILIAL DILATED CARDIOMYOPATHY

I-123-MIBG Cardiac Uptake Imaging in Familial Dilated Cardiomyopathy [3]

ELISABETE MARTINS, TERESA FARIA, J SILVA-CARDOSO, ANA OLIVEIRA, MANUEL CAMPELO, SANDRA AMORIM, BRENDA MOURA, F. ROCHA-GONÇALVES, JORGE G. PEREIRA, M. JÚLIA MACIEL

Faculdade de Medicina do Porto, Serviço de Cardiologia, Serviço de Medicina Nuclear, Hospital de São João, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2009; 28 (1): 29-36

ABSTRACT

The pathological significance of myocardial adrenergic activity in patients with heart failure is well documented. No previous study has assessed the usefulness of I-123-metaiodobenzylguanidine (^{123}I-MIBG) cardiac uptake imaging for the evaluation of familial dilated cardiomyopathy (DCM).

Objective: To evaluate cardiac adrenergic activity, using ^{123}I-MIBG cardiac uptake imaging, in members of a genotyped family with DCM.

Methods: Clinical evaluation, 12-lead ECG, 2D echocardiogram, heart rate variability analysis by 24h Holter, plasma B-type natriuretic peptide (BNP) measurements and ^{123}I-MIBG cardiac imaging were performed in all participants.

Anterior projection planar images and single photon emission computed tomographies of the thorax were obtained 20 min and 4 hours after the intravenous administration of 370 MBq of ^{123}I-MIBG (early and late images). Heart/mediastinal (H/M) ratio and myocardial washout (MW) rate were obtained based on the anterior planar images. In polar maps, segmental uptake of ^{123}I-MIBG was evaluated using a 4-grade visual score: grade 1 - uptake >75% of maximum myocardial uptake (MMU); grade 2 - uptake 51-75% of MMU; grade 3 - uptake 26-50% of MMU; grade 4 - uptake ≤25% of MMU.

Results: Eleven adults were included: 4 with DCM, 4 with isolated left ventricular enlargement (LVE), and 3 with normal echocardiogram. Patients with DCM and LVE presented higher MW rates, lower H/M ratios and higher visual score grades than those with normal 2D echocardiograms. One patient with

RESUMO

Captação Cardíaca de MIBG-I-123 nas Formas Familiares de Miocardiopatia Dilatada

O significado patológico da hiperactividade adrenérgica está bem documentado em doentes com insuficiência cardíaca. Nenhum estudo prévio avaliou a utilidade da cintigrafia cardíaca com metaidobenzilguanidina-Iodo-123 (^{123}I-MIBG) nas formas familiares de miocardiopatia dilatada (MCD).

Objectivo: Avaliar a actividade adrenérgica cardíaca em membros de uma família genotipada com MCD, utilizando a cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG.

Metodos: Em todos os participantes foi efectuada a avaliação clínica, ECG, ecocardiograma bidimensional, Holter de 24 horas para análise da variabilidade da frequência cardíaca, doseamento plasmático de BNP (B-type Natriuretic Peptide) e cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG.

Foram obtidas imagens planares do tórax em projecção anterior e tomografias computorizadas de emissão cardíacas, aos 20 minutos e às 4 horas, após a administração endovenosa de 370MBq de ^{123}I-MIBG (imagens precoces e tardias).

Os valores do índice de captação coração/mediastino (C/M) e da taxa de *washout* (MW) do miocárdio foram obtidos das imagens planares anteriores. Nas imagens tomográficas avaliou-se a captação segmentar do ^{123}I-MIBG nos mapas polares, utilizando uma escala visual de 4 pontos: *score* 1- captação> 75% da captação miocárdica máxima (CMM); *score* 2- captação de 51 a 75% da CMM; *score* 3- captação de 26-50% da CMM; *score* 4-captação

Recebido para publicação: Fevereiro de 2008 • Aceite para publicação: Setembro de 2008
Received for publication: February 2008 • Accepted for publication: September 2008

Rev Port Cardiol
Vol. 28 Janeiro 09 / January 09

a normal echocardiogram but carrying the disease locus also presented an abnormal MIBG cardiac scintigram.
Conclusion: Patients with the phenotypic expression of the disease (DCM and LVE) and even carriers of the DCM gene with normal echocardiograms may present an abnormal MIBG cardiac scintigram, probably reflecting cardiac adrenergic hyperactivity. If confirmed in larger numbers, this method may be useful for the evaluation of DCM families.

Key words
Familial dilated cardiomyopathy; Sympathetic activity; MIBG

≤ 25% da CMM.
Resultados: Foram incluídos 11 indivíduos: 4 com MCD, 4 com dilatação isolada do ventrículo esquerdo (DVE) e 3 com ecocardiograma normal.
Os doentes com MCD e DVE apresentaram taxas de MW mais elevadas, índices de C/M mais baixos e valores mais elevados dos scores visuais do que os que tinham ecocardiograma normal. Um doente portador do lócus associado à doença e com ecocardiograma normal também apresentou alterações na cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG.
Conclusão: Os indivíduos com expressão fenotípica da doença (DCM e DVE) e mesmo os portadores do genótipo associado à MCD com ecocardiogramas normais podem apresentar alterações na cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG, provavelmente reflectindo a hiperactividade adrenérgica cardíaca. Se demonstrado em larga escala, este método poderá ser útil na avaliação das formas familiares de MCD.

Palavras-Chave
Miocardiopatia dilatada familiar; Actividade simpática; MIBG

INTRODUCTION

Familial dilated cardiomyopathies (FDCM) constitute a heterogeneous group of primary cardiomyopathies [1], characterized by diversity of clinical presentation and of genetic abnormalities [2]. The phenotypic expression of the mutation involved frequently results in a slow left ventricular (LV) remodeling process, influenced by multiple factors including age, gender and environment.

Asymptomatic relatives can present different cardiac abnormalities [3, 4], including dilated cardiomyopathy (DCM) and isolated left ventricular enlargement (LVE) with preserved systolic function, or they may have normal echocardiographic findings. They frequently present abnormalities on cardiopulmonary exercise testing [5], heart rate variability evaluation [6], signal-averaged electrocardiography [7], muscle biopsy [8] or autoimmune tests [9]. In some patients, although 2D echo may show normal global left ventricular systolic function, ventricular dysfunction can actually be revealed by tissue Doppler imaging [10] or by calculation of the Tei index [11].

Ventricular dilatation with preserved systolic function can be a mild phenotype of the disease, or represent an initial stage of DCM development. In fact, in some DCM families, a percentage of individuals with isolated LVE do progress to DCM [3, 4]. It is not yet known how to estimate the individual risk of these patients developing DCM in the presence of isolated LVE.

We hypothesise that pathologic LV remodeling should be paralleled by neurohormonal activation, including cardiac sympathetic nervous system abnormalities.

Iodine-123 metaiodobenzylguanidine (^{123}I-MIBG) uses norepinephrine uptake, storage and release mechanisms in cardiac pre-synaptic sympathetic nerve terminals [12]. Cardiac ^{123}I-MIBG scintigraphy is therefore a powerful method to assess cardiac sympathetic nervous

system activity *in vivo*, and may be useful in the assessment of siblings of patients with DCM.

The purpose of this pilot study was to evaluate the ability of ^{123}I-MIBG cardiac scintigraphy to identify different imaging patterns according to the genotype/phenotype characteristics of the members of a DCM family.

METHODS

Patients

We included the adult members (age >18 years) of a genotyped family with DCM whose pedigree has been described elsewhere [13]. The disease is due to a new and still unidentified gene located in locus 7q22.3-31.1. The participants presented an array of phenotypes including DCM, isolated LVE and normal left ventricular dimensions and function. None had atrial fibrillation or diabetes or was taking medication that could interfere with ^{123}I-MIBG scintigraphy.

During a two-day period, clinical evaluation, 12-lead ECG, transthoracic 2D echocardiogram, 24h Holter, plasma BNP measurements and ^{123}I-MIBG cardiac imaging were performed in all participants. Heart failure therapy was not interrupted during the study.

Definitions

Dilated cardiomyopathy: The presence of left ventricular dilatation (defined as LV end-diastolic dimension >98th percentile of the Framingham Registry [14]) and systolic dysfunction (defined as LV ejection fraction ≤ 45% and/or LV shortening fraction ≤ 25%).

Isolated left ventricular dilatation: LV dilatation with preserved systolic function

Carrier: An individual possessing the DCM locus, irrespective of cardiac phenotype.

Transthoracic 2D echocardiographic evaluation

A Hewlett-Packard ultrasound system (Sonos 5500) equipped with a 2.5-3.5 MHz transducer was used. The images were recorded on Super-VHS videotape for further analysis. The measurements of left ventricular wall thickness, cardiac chamber size, left ventricular fractional shortening and ejection fraction, were performed according to the American and European Societies of Echocardiography guidelines [15].

Left ventricular cavity dimensions were adjusted to patient height and classified into five categories according to the Framingham Registry classification [14]. This methodology was proposed by Hershberger for familial DCM studies [16].

^{123}I-MIBG cardiac imaging

Fixation of iodide by the thyroid gland was blocked by oral administration of potassium iodide solution. This was initiated 2 days before ^{123}I-MIBG imaging and was maintained until 5 days afterwards. Alternatively, potassium perchlorate was used, *per os*, 30 minutes before the injection. The cardiac study protocol consisted of the intravenous administration of 370 MBq (10 mCi) of ^{123}I-MIBG. Anterior projection planar thoracic images and single photon emission computed tomographies (SPECT) were obtained 20 min and 4 hours after the tracer injection (early and late images, respectively).

We used a dual-headed digital tomographic gamma camera (GE Millennium MG), equipped with low-energy high-resolution parallel-hole collimators, using a 20% window centered at the 159 keV photo-peak. Planar images were acquired with a 128x128 matrix. The tomographic acquisition was performed in a 180º arc from 45º right anterior oblique to 45º left posterior oblique view, 36 frames (40 s each), using a 64x64 matrix. Images were then processed with dedicated software (QGS/QPS® on a Xeleris® workstation), using a Wiener prereconstruction filter [17]. No attenuation correction was performed. Slice thickness was one pixel. Data were reconstructed into short-axis, horizontal long-axis and vertical long-axis tomograms and polar plots were generated.

Heart/mediastinal (H/M) ^{123}I-MIBG uptake ratio and myocardial washout (MW) rate were obtained based on the anterior planar images. The H/M ratio was calculated by drawing an elliptical region of interest (ROI) around the heart and a rectangular ROI over the upper mediastinal area; average counts per pixel in the myocardium were then divided by average counts per pixel in the mediastinum [12]. Washout was calculated using the formula: $MW = [(H\text{-}M_{early})\text{-}(H\text{-}M_{late})]/(H\text{-}M_{early}) \times 100\%$ [12, 18]. Measurements were performed twice by two independent observers, who were blinded to the cardiac phenotype. The final results were obtained by the mean of the

Rev Port Cardiol
Vol. 28 Janeiro 09 / January 09

average of each operator.

In tomographic images, segmental ^{123}I-MIBG uptake in the left ventricle was evaluated according to a 4-grade color scale system using 5- and 20-segment models: grade 1 - uptake >75% of maximum myocardial uptake (MMU); grade 2 - uptake 51-75% of MMU; grade 3 - uptake 26-50% of MMU; grade 4 - uptake ≤25% of MMU [18].

Plasma B-type natriuretic peptide (BNP)

Blood samples were collected just before intravenous administration of ^{123}I-MIBG, after a 15-min rest. Serum levels of BNP were determined using a commercially available specific immunoassay kit (Architect system, Abbott Laboratories).

Heart rate variability

A 3-channel, 24-hour digital Holter recording was performed using a DigiTrack Plus recorder (Philips Medical Systems, USA) and was analyzed with Philips Zymed 1810 Plus software (Philips Medical Systems, USA). The recordings were analyzed by two independent observers who were blinded to the phenotype of the participants.

When more than 5% of the 24-hour duration of the Holter recording consisted of noise or ectopic beats the exam was excluded from analysis.

The following heart rate variability parameters were calculated, in accordance with the Task Force of the North American Society of Pacing and Electrophysiology [19]: time-domain measures - standard deviation of all normal-to-normal intervals (SDNN), standard deviation of the averages of NN intervals in all 5 min periods (SDANN), mean of the standard deviations of all NN intervals for all 5 min segments (SDNN index); frequency domain measures - power in the ultra-low (ULF), very low (VLF), low (LF), and high frequency (HF) range, and total power (TP). Normalized low- and high-frequency power was obtained as follows: LFnu = LF/(TP-VLF)x100, HFnu = HF/(TP-VLF)x100.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows V.14 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Continuous data are presented as mean ± SD and categorical data as relative frequencies (percentage). The non-parametric correlation coefficient (r) was used where appropriate. A p value of less than 0.05 was considered significant.

Ethics

The protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of our institution and all participants signed an informed consent agreement form.

The research conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

RESULTS

Clinical characteristics

Detailed clinical and linkage analysis data of this DCM family have been reported elsewhere [13]. They reveal an autosomal dominant pattern of inheritance with age-dependent penetrance. Eleven family members (8 men) were re-evaluated for the purpose of this study: 4 with isolated DCM, 4 with LVE and 3 with normal echocardiographic parameters. Other abnormalities are presented in *Table I*. The disease gene was absent in 2 individuals, one with a normal left ventricle and another with LVE (participants 2 and 11).

^{123}I-MIBG cardiac uptake imaging

Early and late H/M ^{123}I-MIBG uptake ratios and ^{123}I-MIBG MW rate values according to the three distinct cardiac phenotypes are presented in *Table II*. Patients with DCM and isolated LVE presented lower H/M ratio (DCM, mean late H/M = 1.75±0.12 and LVE, mean late H/M = 1.80±0.11) and higher MW rate values (DCM = 37.8±5.5% and LVE = 36.0±6.3%) than those with normal echocardiograms (mean late H/M = 2.06±0.28 and MW = 28.6±10.5%).

Tomographic images of patients with DCM or isolated LVE and of one patient with a normal echocardiogram but carrying the disease gene presented higher color scale scores of ^{123}I-MIBG cardiac uptake (*Figure 1*).

Correlations with heart rate variability

Cardiac 123I-MIBG washout rate correlated with LFnu (r=0.65, p=0.02) and with LF/HF ratio (r=0.71, p=0.01) on Holter recordings. No other correlation was found with any other heart rate variability parameter.

DISCUSSION

FDCM is characterized by enormous genetic

Table I. Clinical characteristics of the participants.

Patient no.	Age/gender	LVEDD (mm)	LVEDD Framingham categories	LVEF (%)	LVFS (%)	ECG Nr	BNP	HF therapy
1	32/F	49	0	60	37	Nr	Nr	-
2	27/F	46	0	65	37	Nr	Nr	-
3	36/M	55	1	55	35	LVH	Nr	-
4	41/M	61	3	64	27	LVH	Nr	-
5	46/F	55	3	60	35	Nr	Nr	-
6	47/M	85	4	30	14	IVCD	High	BB, ACEI, SPIRO
7	48/M	63	4	44	29	NSTA	Nr	BB, ACEI
8	60/M	64	4	60	34	IVCD	Nr	-
9	43/M	71	4	40	18	NSTA	Nr	BB, ACEI, SPIRO
10	75/M	74	4	25	9	NSTA	High	BB, ACEI, SPIRO
11	42/M	57	4	65	39	Nr	Nr	-

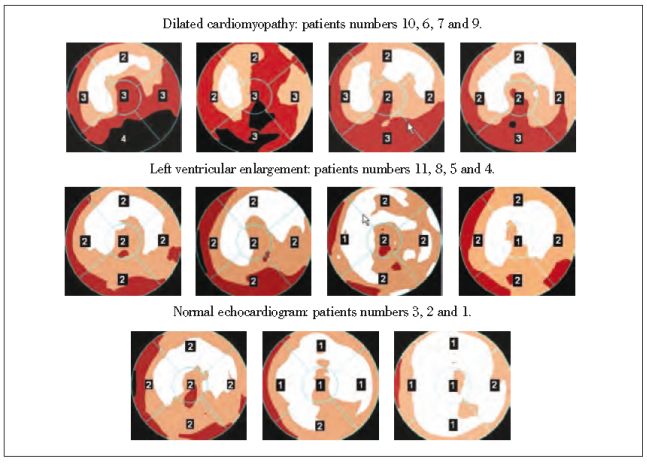
ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor; BB: beta-blocker; BNP: B-type natriuretic peptide; F: female; HF: heart failure; IVCD: intraventricular conduction delay; LVEDD: left ventricular end-diastolic dimension; LVEF: left ventricular ejection fraction; LVFS: left ventricular fractional shortening; LVH: left ventricular hypertrophy; M: male; Nr: normal; NSTA: nonspecific ST-T wave abnormalities; SPIRO: spironolactone.

Framingham categories of height-indexed LVEDD. Category 0: ≤95th percentile of reference limits; category 1: ≤95th percentile of a broad sample (BS); category 2: ≤98th percentile of BS; category 3: ≤99th percentile of BS; category 4: >99th percentile of BS.[16]

Table II. Phenotype, genotype and ^{123}I-MIBG cardiac uptake imaging parameters of the participants.

Patient no.	Phenotype	Presence of the disease gene	Early H/M	Late H/M	123I-MIBG myocardial washout rate (%) *
1	Nr	+	2.2	2.2	19.4
2	Nr	-	2.2	2.2	26.3
3	Nr	+	1.8	1.8	40.2
4	LVE	+	2.0	1.9	32.8
5	LVE	+	1.8	1.7	44.4
6	DCM	+	1.7	1.6	41.6
7	DCM	+	2.0	1.9	37.9
8	LVE	+	2.0	1.9	37.2
9	DCM	+	1.8	1.8	41.9
10	DCM	+	1.7	1.7	30.1
11	LVE	-	1.7	1.7	29.8

* DCM: dilated cardiomyopathy; H/M: heart/mediastinal 123I-MIBG uptake ratio; LVE: left ventricular enlargement; Nr: normal echocardiogram
Myocardial washout rate upper normal limit value: 30%.



Legend: 4-grade colour visual score of late 123I-MIBG cardiac uptake imaging. Grade 1: uptake >75% of maximum myocardial uptake (MMU); Grade 2: uptake 51 - 75% of MMU; Grade 3: uptake 26 - 50% of MMU; Grade 4: uptake ≤ 25% of MMU.

Figure 1. Polar maps with 5-segments, 4-grade colour visual scores of late ^{123}I-MIBG cardiac uptake images.

Rev Port Cardiol
Vol. 28 Janeiro 09 / January 09

heterogeneity and still unclear genotype-phenotype correlations. Multiple factors, other than the pathogenic mutations, could influence individual prognosis, including other genetic factors and environmental factors such as viruses.

Understanding the clinical relevance of asymptomatic cardiac abnormalities in relatives of FDCM patients constitutes a stimulating area of research that can lead to the identification of early markers of disease progression, thus creating the opportunity for early therapeutic intervention.

Various abnormalities have been reported in asymptomatic relatives of DCM probands using different methodologies.

Genetic diagnosis is lacking in the majority of studies published to date.

Three to six percent have DCM or depressed fractional shortening without ventricular dilatation and 15-20% have isolated LVE detected by echocardiography [3, 4]. Recently, Khositseth reported Tei index abnormalities in 42% of the first-degree relatives of index patients[11]. Relatives with isolated LVE may present diminished systolic velocities at the mitral annulus using Doppler tissue imaging [10], peak oxygen consumption less than 80% of predicetd, or anti-heart autoantibodies. In 10-25% of relatives with isolated LVE, DCM became apparent within 3-5 years [3, 4, 20].

In this context, periodic rescreening is indicated for all family members, particularly those with abnormalities at first observation [21].

Hyperactivity of the cardiac sympathetic nervous system is a common pathophysiologic process of DCM development of different etiologies. Our working hypothesis is that individuals with phenotypic expression of the disease should present more marked cardiac sympathetic system abnormalities than those carrying the disease gene but with no phenotypic expression.

Cardiac ^{123}I-MIBG scintigraphy constitutes an important imaging method to assess the sympathetic nervous system *in vivo*.

Numerous studies have corroborated the prognostic value of this exam in patients with heart failure [22-24]. It can be useful in the selection of patients for heart transplantation [25], for the implantation of cardiac defibrillators [26] or for the prediction of a positive response to beta--blockers [27]. Benefits of medical therapy usually correlate with an increase in H/M ^{123}I-MIBG uptake ratio and a decrease in ^{123}I-MIBG MW rate [28].

The clinical relevance of ^{123}I-MIBG cardiac uptake imaging has also been demonstrated in patients with different primary/genetic cardiomyopathies. In right ventricular cardiomyopathy, regional abnormalities of sympathetic innervation can often be demonstrated by this method [29]. In hypertrophic cardiomyopathy, MW rate is a predictor of ventricular tachyarrhythmias [30] and abnormalities of cardiac sympathetic activity may precede the development of systolic dysfunction [31].

To our knowledge, ours is the first study on ^{123}I-MIBG cardiac uptake imaging in FDCM patients.

Abnormalities in ^{123}I-MIBG cardiac scintigraphy in this setting, if present, could be of particular significance in relatives with minor phenotypic expression of the disease, since they could identify those at greater risk of DCM development.

The abnormal ^{123}I-MIBG imaging patterns we observed in this preliminary study may reflect the presence in these individuals of sympathetic hyperactivity, which is implicated in the pathophysiology of left ventricular remodeling and dysfunction. The positive correlation with normalized LF power on Holter recordings, which is known to be related to sympathetic activity, reinforces our interpretation. Similar correlations have been reported in mild to moderate heart failure patients [32].

Patterns of ^{123}I-MIBG scintigraphy according to genotype / phenotype characteristics

In our study, among patients presenting the DCM locus, those with phenotypic expression of the disease (DCM or LVE; patients 6, 7, 9, 10 and 4, 5, 8 respectively) had the most abnormal patterns of ^{123}I-MIBG cardiac scintigraphies. This is consistent with more abnormal cardiac sympathetic activation (a well-known mediator of progressive LV remodeling and dysfunction) in the former group than in the latter.

Abnormal ^{123}I-MIBG scintigraphy with a normal 2D echo and presence of DCM locus

Even in patients carrying the disease gene but with a normal 2D echo, abnormal patterns of ^{123}I-MIBG cardiac scintigraphy can be present (as was the case of our patient number 3). This evidence

of abnormal cardiac sympathetic activity, even in siblings that still do not express the disease, probably means that the pathophysiological process is already established and that it will eventually evolve to LVE or DCM. Thus, ^{123}I-MIBG cardiac scintigraphy abnormalities in this setting may serve as early markers of the phenotypic expression of the disease, a fact of considerable importance for guiding subsequent follow-up and treatment. This could be the basis for early treatment with beta-blockers in order to delay the manifestations of the disease.

Normal ^{123}I-MIBG scintigraphy with a normal echo and the presence of the DCM locus

Finally, it is possible that those carrying the disease gene, but without phenotypic expression and with normal ^{123}I-MIBG cardiac scintigraphy, might be at an even earlier stage of the disease, which would warrant subsequent ^{123}MIBG follow-up.

Study limitations

The major limitation of this work is the small number of cases included. It is uncertain if similar patterns will be found in other families with different clinical and genetic backgrounds.

A control group including benign forms of left ventricular enlargement, such as athletic heart, would be desirable to further clarify the pathogenic significance of ^{123}I-MIBG findings.

Despite these limitations, this pilot study is the first paper submitted for publication on this subject.

Pedidos de separatas para:
Address for reprints:

ELISABETE MARTINS
Serviço de Cardiologia
Hospital de S. João
4200 Porto
e-mail: elisabetemartins09@gmail.com

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1.Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al. Contemporary definitions and classification of cardiomyopathies. Circulation 2006; 113: 1807-16.

2.Burkett EL, Hersberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. JACC 2005; 45: 969-81.

3.Mahon NG, Murphy RT, MacRae CA et al. Echocardiographic evaluation in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy reveals preclinical disease. Ann Intern Med 2005; 143: 108-15.

4.Baig MK, Goldman JH, Caforio AL et al. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. JACC 1998; 31: 195-201.

5.Mahon NG, Sharma S, Elliot PM at al. Abnormal cardiopulmonary exercise variables in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy who have left ventricular enlargement. Heart 2000; 83:511-7.

6.Mahon NG, Hedman AE, Padula M et al. Fractal correlation properties of R-R interval dynamics in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2004: 151-8.

7.Yi G, Keeling PJ, Hnatkova K et al. Usefulness of signal-averaged electrocardiography in evaluation of idiopathic-dilated cardiomyopathy in families. Am J Cardiol 1997; 79:1203-7.

8.Mahon NG, Madden BP, Caforio AL et al. Immunohistochemical evidence of myocardial disease in apparently healthy relatives of patients with dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2002; 39: 455-62.

9.Caforio AL, Mahon NG, Baig MK et al. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. Circulation 2007; 115:76-83.

10.Matsumura Y, Elliot PM, Mahon NG et al. Familial dilated cardiomyopathy: assessment of left ventricular systolic and diastolic function using Doppler tissue imaging in asymptomatic relatives with left ventricular enlargement. Heart 2006; 92; 405-406.

11.Khositseth A, Ausayapao P. Left ventricular myocardial performance index in closely-related relatives of patients with dilated cardiomyopathy. Int J Card 2007 Mar 13 [Epub ahead of print]

12.Flotats A, Carrió I. Cardiac neurotransmission SPECT imaging. J Nucl Card 2004; 11: 587-602.

13.Schönberger J, Kühler L, Martins E et al. A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to

Rev Port Cardiol
Vol. 28 Janeiro 09 / January 09

chromosome 7q22.3 -31.1. Hum Gent 2005; 118: 451-7.

14.Vasan RS, Larson MG, Levy D et al. Distribution and categorization of echocardiographic measurements in relation to reference limits. Circulation 1997; 96:1863-73.

15.Shan DJ, DeMaria A, Kisslo J et al. Recommendation regarding quantitation in M-mode echocardiography: result of a survey of echocardiographic measurements. Circulation 1978; 44: 1072-83.

16.Hershberger RE, Ni H, Crispell KA. Familial dilated cardiomyopathy: echocardiographic diagnostic criteria for classification of family members as affected. J Card Fail 1999; 5: 203-12.

17. Somsen GA, Borm JJJ, Milliano PAR et al. Quantitation of myocardial iodine-123 MIBG uptake in SPET studies: a new approach using the left ventricular cavity and a blood sample as a reference. Eur J Nucl Med 1995; 22: 1149-54.

18. Parthenakis FI, Prassopoulos VK, Koukouraki SI et al. Segmental pattern of myocardial sympathetic denervation in idiopathic dilated cardiomyopathy: relationship to regional wall motion and myocardial perfusion abnormalities. J Nucl Card 2002; 9: 15-22.

19. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standard of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Circulation 1996; 93: 1043-65.

20. Repetto A, Serio A, Pasotti M et al. Rescreening of "healthy" relatives of patients with dilated cardiomyopathy identifies subgroups at risk of developing the disease. Eur Heart J 2004; 6 (supplement): F54-60.

21. Crispell KA, Hanson EL, Coates K et al. Periodic rescreening is indicated for family members at risk of developing familial dilated cardiomyopathy. JACC 2002;39 (9): 1503-7.

22. Yamada T, Shimonagata T, Fukunami M et al. Comparison of the prognostic value of cardiac iodine-123 metaiodobenzylguanidine imaging and heart rate variability in patients with chronic heart failure. JACC 2003; 41:231-8.

23. Imamura Y, Ando H, Mitsuoka W et al. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine images reflect intense myocardial adrenergic nervous activity in congestive heart failure independent of underlying cause. JACC 1995; 26:1594-9.

24. Merlet P, Benvenuti C, Moyse D, et al. Prognostic value of MIBG imaging in idiopathic dilated cardiomyopathy. J Nucl Med 1999; 40:917-23.

25. Gerson MC, Mcguire N, Wagoner L. Sympathetic nervous system function as measured by I-123 metaiodobenzylguanidine predicts transplant-free survival in heart failure patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J Card Fail 2003; 9: 384-91.

26. Arora R, Ferrick K, Nakata T et al. I-123 MIBG imaging and heart rate variability analysis to predict the need for an implantable cardioverter defibrillator. J Nucl Card 2003¸10: 121-31.
27. Fukuchi K, Yasumura Y, Kiso K et al. Gated myocardial SPECT to predict response to ,-blocker therapy in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J Nucl Med 2004; 45:527-31.

28. Chizzola PR, Freitas HF, Marinho NV et al. The effect of ,-adrenergic receptor antagonism in cardiac sympathetic neuronal remodeling in patients with heart failure. Int J Card 2006; 106:29-34.

29. Wither T, Hindricks G, Lersh H et al. Regional myocardial sympathetic dysinnervation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. An analysis using 123I-metaiodobenzilguanidine scintigraphy. Circulation 1994, 89: 667-683.

30. Terai H, Shimizu M, Ino H et al. Cardiac sympathetic nerve activity in patients with hypertrophic cardiomyopathy with malignant ventricular tachyarrhythmias. J Nucl Card 2003; 10: 304-10.

31. Terai H, Shimizu M, Ino H et al. Changes in cardiac sympathetic nerve innervation and activity in pathophysiologic transition from typical to end-stage hypertrophic cardiomyopathy. J Nucl Med 2003; 44: 1612-17.

32. Somsen GA, Szabó BM, Veldhuisen DJ et al. Comparison between iodine 123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy and heart rate variability for the assessment of cardiac sympathetic activity in mild to moderate heart failure. Am Heart J 1997; 134: 456-8.

^{123}-I-MIBG AND CARDIAC ADRENERGIC ACTIVITY IN FAMILIAL DILATED CARDIOMYOPATHY

TITLE:

^{123}I-MIBG AND CARDIAC ADRENERGIC ACTIVITY IN FAMILIAL DILATED CARDIOMYOPATHY

AUTHORS AND AFFILIATION:

Elisabete Martins[*], Ana Oliveira[¶], José Silva-Cardoso[*§], Teresa Faria[¶], Teresa Pinho[*], Manuel Campelo[*], António Madureira[*], Isabel Ramos[*], Jorge G. Pereira[¶], Francisco Rocha-Gonçalves[§].

[*] Cardiology Department- São João Hospital, Porto, Portugal

[¶] Nuclear Medicine Department- São João Hospital, Porto, Portugal

[*] Radiology Department - São João Hospital, Porto, Portugal

[§] Porto University Medical School, Porto, Portugal

WORD COUNT: 1 069 words

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Elisabete Martins, MD
Serviço de Cardiologia, Hospital de São João
Avenida Hernani Monteiro, 4200 Porto
Portugal
Fax: (+351) 225512393
Phone: (+ 351) 93 4205538; 913230645; 226060644
E-mail: elisabetemartins09@gmail.com

FINANCIAL SUPPORT: This study was supported by a grant from "Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, Ministério da Saúde P.I. nº 64/2007".

Conflict of interest: none declared.

Familial dilated cardiomyopathy (FDCM) is characterized by genetic heterogeneity, incomplete age-dependent penetrance and a multifactorial pathogenesis[1]. Diagnosis is still dependent on clinical criteria and familial investigation [2].

On the other hand, several abnormalities have been described among asymptomatic relatives, such as isolated left ventricle (LV) enlargement [3]. These abnormalities give the opportunity to identify affected relatives, potential candidates to early therapeutic interventions. However, not even their presence, allows to infer carrier state or future progression of the disease.

We hypothesized that metaiodobenzylguanidine-I-123 (^{123}I-MIBG) cardiac uptake imaging, a tool for monitoring sympathetic activity, could be useful in the evaluation of family members, as it reflects pathophysiologic mechanisms involved in disease progression[4]. This evaluation could give prognostic data useful in this clinical setting.

Therefore, we assessed cardiac ^{123}I-MIBG imaging patterns in FDCM members (patients and asymptomatic relatives).

We evaluated 45 FDCM members, from 23 families, defined by the European Society of Cardiology criteria[2], 25 (56%) males, age of 43 years (36-51, interquartile range). One of the families has the disease locus located in chromosome 7q22.3-31.1[5].

All participants performed a 12-lead ECG and 2D-echocardiogram. Measurements were done according to the American Society of Echocardiography. Forty members also performed cardiac magnetic resonance (CMR) on a 3 Tesla scanner (Magneton trio, Siemens). Protocol included contrast-enhanced images, acquired 10-15 minutes after Intravenous gadobutrol (Gadovist®, 0.2mmol/Kg).

^{123}I-MIBG cardiac imaging protocol consisted of the intravenous administration of 370MBq (10mCi) of ^{123}I-MIBG. We used a dual-headed gamma camera (GE Millennium MG), equipped with low-energy high-resolution parallel-hole collimators, using a 20% window centered at the 159keV photo-peak. Images were then processed with dedicated software (QGS/QPS® on a Xeleris® workstation). No

attenuation correction was performed. Anterior projection planar thoracic images were obtained 20 minutes and 4 hours after tracer injection (early and late images, respectively). Heart/mediastinal ratio (H/M) and myocardial washout rate (WR) were obtained. Measurements were performed twice by two independent observers, blinded to the cardiac phenotype and genotype data. The final results were obtained by the mean of the average of each operator.

A blood sample was obtained for B-type natriuretic peptide (BNP) quantification (Architect system - Abbott) just before ^{123}I-MIBG administration.

Heart rate variability parameters were calculated, using a DigiTrack-Plus Recorder (Philips Medical Systems, USA) and a Philips Zymed Holter, Model 1810 Plus Software (Philips Medical Systems, USA).

All statistical analyses were performed with SPSS for Windows (V.16.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Categorical data were compared using Fisher`s exact test. Student`s *t* and Mann-Whitney tests were used to compare continuous variables.

Twenty nine (64%) familial members had ejection fraction (EF) < 50% (DCM patients), and sixteen had EF ≥ to 50%: 6 with reverse remodeling (previous LV systolic dysfunction) and 10 asymptomatic relatives.

An expected difference between both groups was observed in CMR indexed LV end-diastolic volumes [134ml/m^2 (100-161) vs 85ml/m^2 (73-95), p<0.01], LV [30% (25-45) vs 55% (55-64)] and right ventricular EF (48 ± 10% vs 55 ± 7%, p=0.01), late hiperenhenancement (8 patients vs none, p=0.03), plasma BNP [104pg/ml (18-354) vs 10pg/ml (10-16)], myocardial WR (43 ±11 vs 34 ± 9%, p=0.01) and late H/M ratio (1.73 ± 0.26 vs 1.89 ± 0.14, p=0.03), respectively. No heart variability parameter value was distinct between both groups.

We didn`t find significant differences in WR value and late H/M ratio between members with [47.2 % ± 11.3 and 1.6 (1.4-1.8)] and without [40.2% ± 11.3 and 1.7 (1.6-1.9)] delayed hyperenhancement on CMR (p=0.16 and p=0.22).

The majority (55%) of DCM patients were in NYHA class I and 90% were treated with beta-blockers. In this group, WR was higher than 30% (≥2 Standard Deviation) in 24 (83%) and late H/M was inferior to 1.7 in 11 (38%) patients (Fig.1). Myocardial WR and late H/M rate were both correlated with BNP (r=0.595, p=0.01; r=-0.622, p=0.01), LV EF (r=-668, p=0.01; r=0.685, p=0.01), LV diastolic (r=0.677, p=0.01; r=-0.584, p=0.01) and systolic (r=0.743, p=0.01; r=-0.660, p=0.01) indexed volumes and LV indexed mass (r=0.638, p=0.01; r=-0.471, p=0.05) on CMR imaging.

In the group with normal LV systolic function we found an abnormally high myocardial WR (>30%) in 11 (69%) participants: 5 with reverse remodeling, 4 of 5 identified carriers and in 2 relatives with normal echocardiograms and unknown carrier state. We didn`t find correlations between myocardial ^{123}I-MIBG WR and LV EF or indexed volumes or mass. However, ^{123}I-MIBG WR correlated with normalised low-frequency power (r=0.691, p=0.01) and low frequency/high frequency ratio (r=0.702, p=0.01) heart rate variability parameters.

During 558 days (432-863) of follow-up, six patients (21%) were submited to heart transplantation. WR was significantly different between transplanted (51±10%) and non-transplanted (41±11%) DCM patients (p=0.05), as was also the presence of late hyperenhancement on CMR (p=0.02).

None of those with EF>50% developed or had worsening of heart failure symptoms in this time interval.

Our study put in evidence the heterogeneity of ^{123}I-MIBG findings between FDCM members (with known and unknown disease).

We did find rapid WR in a high percentage of individuals with normal EF and this may reflect the increased adrenergic drive, related to the cardiac remodeling process. This hypothesis was somewhat corroborated by the presence of an elevated WR in individuals with reverse remodeling and in 4 locus disease carriers that, theoretically, have higher risk for DCM development.

In relatives with EF> 50%, a rapid WR could reflect specific histopathologic (and genetic) substract, that causes major interference with cardiac sympathetic nerve metabolism; alternatively, it could reflect the decreased contractility of cardiac myocytes, eventually detected by other diagnostic tools.

Late H/M ratio, an index of sympathetic denervation, is usually altered with more severe heart failure, so it`s not expected to be significantly changed at early stages of FDCM.

In the preserved systolic function group, we didn´t obtain correlations between WR and LV volumes. This result could be dependent on sample size or just reflect the great heterogeneity of sympathetic drive between individuals, even with identical LV dimensions and systolic function.

We found a positive correlation between WR and two heart variability indexes related to sympathetic activity only in the group with EF> 50%; this could reflect changes of the sympathovagal balance throughout different stages of disease, as already pointed by other authors.

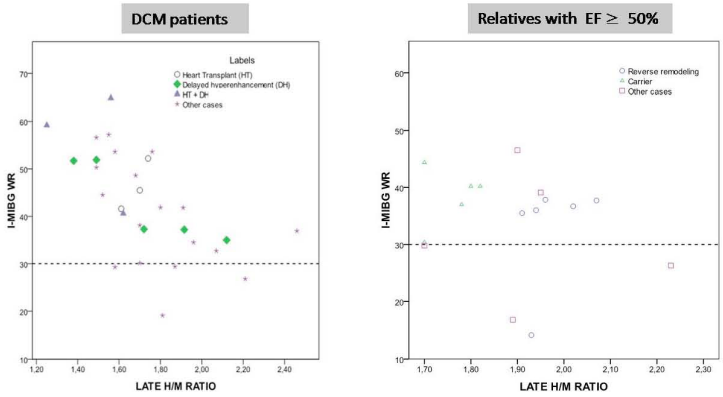
Because of the small number of patients in this study and the short-term follow-up, we can`t evaluate the prognostic value of the ^{123}I-MIBG scintigraphy parameters. These parameters could add complementary information to other morphofunctional imaging studies, guiding the start of early medical treatment or the clinical follow-up schedule of asymptomatic relatives.

References

1. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2005;45:969-81.
2. Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. Eur Heart J 1999;20:93-102.
3. Baig MK, Goldman JH, Caforio AL, Coonar AS, Keeling PJ, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. J Am Coll Cardiol 1998;31:195-201.

4. Camacho V, Carrio I. Targeting neuronal dysfunction and receptor imaging. Curr Opin Biotechnol 2007;18:60-4.
5. Schonberger J, Kuhler L, Martins E, Lindner TH, Silva-Cardoso J, Zimmer M. A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1. Hum Genet 2005;118:451-7.

Figure 1 - Cardiac ^{123}I-MIBG scintigraphy parameters in FDCM members



EF = Ejection Fraction; **FDCM** = Familial Dilated Cardiomyopathy; **H/M ratio**= Heart/ Mediastinal ratio; **WR**= Washout Rate

Distribution of scintigraphic parameters (H/M ratio= Heart/ Mediastinal ratio; WR= Washout Rate) according to EF (Ejection Fraction) of FDCM (Familial Dilated Cardiomyopathy) family members. **DCM patients**: relation with the presence of delayed hyperenhancement on magnetic resonance and occurrence of heart transplantation during follow-up. **Relatives with EF ≥ 50%**: relation with carrier state of asymptomatic members and evidence of reverse remodeling among patients.

Discussão dos resultados

Pois, finalmente, o que é o Homem na Natureza? Um nada em relação ao infinito, um tudo em relação ao nada, um meio entre o nada e tudo. Infinitamente longe de abranger os extremos… Que fará, então, senão aperceber (alguma) aparência do meio das coisas, num desespero eterno de não conhecer nem o seu princípio, nem o seu fim? Todas as coisas saíram do nada e foram levadas até ao infinito. Quem seguirá estas extraordinárias atitudes? O autor destas maravilhas compreende-as. Qualquer outro não o pode fazer.

Blaise Pascal

Tendo em ponderação os dois tipos de objectivos definidos, de natureza molecular e clínica, discutem-se, separadamente, os resultados obtidos. Acrescenta-se uma interpretação fisiopatológica da história natural da miocardiopatia dilatada genética e uma tentativa de integração no modelo molecular de remodelagem cardíaca estabelecido para a síndrome da insuficiência cardíaca.

Aproximações à caracterização molecular da miocardiopatia dilatada familiar

O nosso projecto iniciou-se pouco tempo após a descrição, de Kamisago e colaboradores, das primeiras mutações em genes de proteínas sarcoméricas, MYH7 e TNNT2, em doentes com miocardiopatia dilatada [94].

Estes resultados geraram novas perspectivas no entendimento da base molecular da doença, que deixava, assim, de ser encarada unicamente como secundária a disfunção do citoesqueleto, mas também devida, em certos casos, a um possível defeito do sarcómero, a unidade funcional frequentemente envolvida na variante hipertrófica da doença. Estes resultados foram, também, os principais determinantes da escolha dos genes que analisámos, numa primeira fase da investigação.

Efectivamente, uma mutação particular, a K210del da troponina T, que fora identificada em duas famílias distintas, pelo mesmo grupo de investigadores, e mais tarde noutros casos hereditários da doença [249-250], foi encontrada numa das nossas doentes, com história familiar da doença e submetida a transplante cardíaco aos 25 anos de idade.

O facto de esta mutação ter sido reconhecida em várias famílias, aparentemente não relacionadas, faz supor que possa ser relativamente frequente. Em geral, associa-se a mau prognóstico, condicionando uma evolução maligna, com risco de morte súbita e/ou progressão para insuficiência cardíaca em idades jovens.

A sua patogenicidade foi demonstrada em numerosos estudos funcionais, sendo talvez das mutações mais estudadas, em modelos *in vitro*, e com a qual foi estabelecido um modelo animal da doença. A sua presença associa-se a diminuição da sensibilidade ao cálcio dos miofilamentos contrácteis[181] e, no modelo de ratinho *knock-in*, a utilização de sensibilizadores ao cálcio obteve

particular benefício terapêutico[188]. Neste modelo foram igualmente documentados efeitos terapêuticos desiguais de diferentes tipos bloqueadores-beta [251].

Esta mutação na troponina T, foi identificada em 3% (1/33) dos nossos casos familiares, um valor expectável atendendo a que, na maioria das séries, em que foram analisados outros genes das proteínas do sarcómero, a percentagem de mutações, por gene, raramente ultrapassou este valor [83]. Curiosamente, não identificámos nenhuma mutação no gene MYH7, que recentemente foi associado a 10% dos casos familiares[82].

Numa segunda família, a mais numerosa da nossa série, identificámos um novo *locus* associado à doença, no cromossoma 7q22.3-31.1. Os estudos efectuados até ao momento, com o objectivo de reconhecer o gene localizado no referido *locus*, e portanto uma nova proteína envolvida na patogenia da miocardiopatia, não forneceram resultados positivos.

Foram sequenciadas as regiões codificantes de 3 genes: lamininas B1 e B4 (LAMB1, LAMB4) e *phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide* (PIK3CG), todos localizados no intervalo mínimo associado à doença. Estes genes foram considerados candidatos uma vez que são expressos no miocárdio, servindo as lamininas como importantes moléculas de ancoragem dos cardiomiócitos e de sinalização ao nível da matriz extracelular, e o PIK3CG, como modelador das uniões intercelulares mediadas pela E-caderina.

Apesar de não ter sido detectado o gene (mutação) em causa, a identificação do *locus*, permitiu a optimização do seguimento clínico dos familiares assintomáticos, estando as reavaliações periódicas restringidas aos indivíduos portadores do haplótipo associado à doença.

A região codificante do gene do fosfolamban (PLN) também foi sequenciada por nós em 37 doentes com miocardiopatia dilatada idiopática e 13 casos familiares da doença, não tendo sido encontrada nenhuma mutação. A opção pelo PLN esteve relacionada com a simplicidade técnica do procedimento e por não existirem, na altura, resultados da análise deste gene em séries de doentes com miocardiopatia dilatada. Conhecia-se apenas a mutação R9C descrita num caso familiar de doença [98]. Hoje, sabe-se que as mutações no PLN são raramente identificadas em casos familiares ou esporádicos de miocardiopatia dilatada [82, 252].

De uma forma global, em termos de diagnóstico molecular, os nossos resultados, espelham a dificuldade que existe actualmente na identificação de mutações em doentes com miocardiopatia dilatada, mesmo naqueles com história familiar da doença. A heterogeneidade genética justifica a necessidade de efectuar estudos extensos que devem incluir a análise de numerosos genes, em múltiplas famílias. Este desiderato pretende ser cumprido, por nós, numa fase ulterior da investigação, através da realização de um estudo multicêntrico, cuja metodologia está parcialmente discriminada, na publicação em anexo nº II.

Convém salientar que, os nossos casos familiares podem não representar a generalidade de doentes com miocardiopatia dilatada genética, podendo ilustrar, maioritariamente, aqueles que são portadores de mutações mais malignas ou com maior penetrância. Nesta última circunstância, é mais provável uma evolução clínica desfavorável, com necessidade de referenciação a um hospital central, e a existência de uma história familiar da doença.

A inclusão de doentes com miopatias hereditárias, onde se incluem as distrofias musculares, permitiu-nos observar um subgrupo de casos de miocardiopatia dilatada, também de origem genética, em que existe a possibilidade de obter um diagnóstico molecular nas situações mais comuns, como a distrofia de Duchenne e de Becker, a distrofia facioescapulohumeral e as distrofias miotónicas [253-254].

Apesar da reduzida dimensão da amostra, os nossos resultados reflectem, em termos relativos, a frequência de adultos com distrofias musculares que manifestam a doença a nível cardíaco.
Sabe-se que a percentagem de envolvimento cardíaco é superior a 75% nas distrofinopatias e distrofia miotónica tipo 1, superior a 50% nalguns subtipos de distrofia das cinturas e de cerca de 12% na distrofia facioescapulohumeral [72].

Alguns destes doentes, que ainda não manifestam a doença cardíaca, devem ser provavelmente equiparados, em termos de risco, aos indivíduos portadores assintomáticos, de famílias com miocardiopatia dilatada dita "isolada".

Aproximações à caracterização clínica da miocardiopatia dilatada familiar

Prognóstico das famílias afectadas

A evolução clínica dos membros das famílias genotipadas, foi descrita, isoladamente, em numerosos trabalhos, mas poucos foram aqueles que avaliaram o prognóstico global de doentes com miocardiopatia dilatada genética, descriminando o tipo de intervenção farmacológica aplicada.

Em 1995, duas publicações apontavam para um prognóstico mais grave das formas familiares, relativamente aos casos idiopáticos da doença [255-256].

Num desses trabalhos os autores fizeram uso do rastreio radiológico anual de tuberculose pulmonar na Hungria, tendo verificado que o início da cardiomegalia, nos 31 casos familiares, precedia os sintomas de insuficiência cardíaca, em 8 a 10 anos, correspondendo à designada fase "latente" da doença.

Em 2003, Grunig, publicou o resultado do seguimento de uma série de doentes, em que apenas 8% estavam medicados com bloqueadores-beta. A sobrevida aos 5 anos, dos 39 casos familiares, foi também inferior (45%) à dos casos esporádicos (58%) [257].

Mais recentemente, num estudo retrospectivo da clínica Mayo, envolvendo 30 casos familiares, a sobrevida, aos 5 anos, foi idêntica (54%) à dos doentes com a forma idiopática. Neste trabalho não se identificou qualquer característica clínica que permitisse distinguir os casos hereditários; a fracção de ejecção inferior a 30% foi a única variável associada significativamente à mortalidade[258].

Na nossa experiência, apesar da optimização da terapêutica farmacológica, com antagonistas dos sistemas neuro-hormonais, a mortalidade dos doentes é elevada, da ordem dos 30% aos 5 anos. Este valor, ligeiramente inferior ao da mortalidade referida nos estudos prévios, pode reflectir algum benefício da aplicação das recomendações mais recentes para o tratamento da insuficiência cardíaca.

Contudo, mantém-se a percepção de que a miocardiopatia dilatada familiar tem mau prognóstico, pelo menos num quarto dos doentes, existindo a necessidade de investigar novas alternativas terapêuticas, cujo desenvolvimento, pode, por seu turno, estar dependente da investigação molecular nesta área.

Uma outra possibilidade de melhoria do prognóstico pode ser através da antecipação do início da terapêutica médica, para uma fase prévia à da disfunção ventricular revelada por ecocardiografia. Esta segunda hipótese está subjacente ao objectivo da segunda fase da nossa investigação.

Identificação de factores de risco de progressão da doença

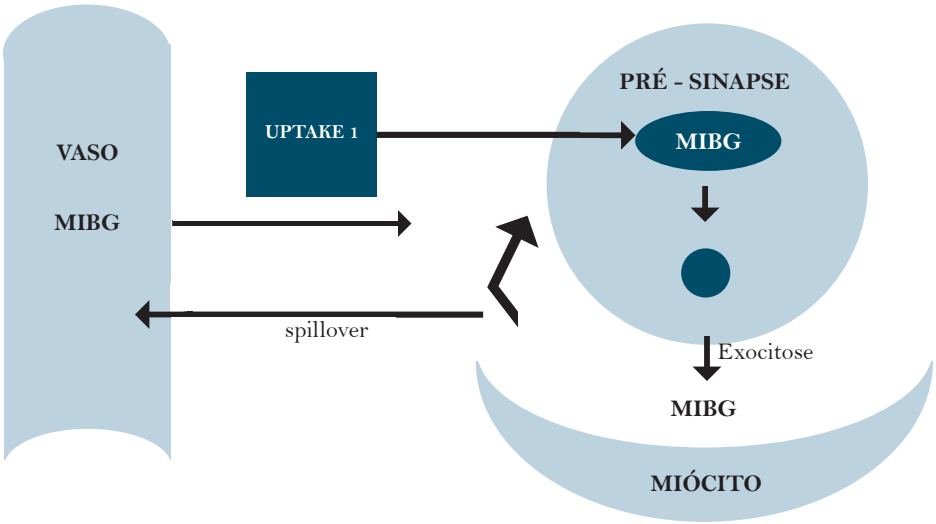
Caracterização da actividade adrenérgica cardíaca

Um dos nossos objectivos foi o de avaliar a actividade adrenérgica cardíaca, em diferentes elementos familiares, com ou sem critérios de doença, utilizando a cintigrafia cardíaca com I-123-metaiodobenzilguanidina (^{123}I-MIBG).

Este método de imagem destaca-se dos demais, por permitir o estudo da fisiologia da enervação simpática do miocárdio, *in vivo* (Figura 4), em diferentes circunstâncias. Desta forma, vai ao encontro da necessidade actual de identificar novos marcadores do processo de remodelagem cardíaca, que devem incluir não só parâmetros de carácter morfofuncional, mas também bio-químicos, metabólicos e moleculares [259-261].

A utilização deste exame tem-se mantido algo restrita a centros de investigação, sobretudo pelos custos que acarreta. Aguarda-se também uma padronização, entre os diferentes centros de referência, para que possa ser utilizado, por rotina, na prática clínica[262].

Figura 4 | Metabolismo da metaiodobenzilguanidina (MIBG) ao nível da fenda sináptica.



A metaidobenzilguanidina (MIGB) funciona como um falso neurotransmissor, que utiliza o mesmo mecanismo de captação que a noradrenalina ao nível da região pré-sináptica (*uptake-1*). Acumula-se ao nível das vesículas de armazenamento de noradrenalina e é libertada por exocitose. A sua retenção a nível dos terminais simpáticos, durante várias horas, correlaciona-se com os achados obtidos nas imagens da cintigrafia.

As duas razões principais que fundamentaram a escolha deste método, não invasivo, foram:

a a demonstração prévia do valor prognóstico desta avaliação, em diversos contextos clínicos;

b a hipótese deste exame, ao permitir detectar a hiperactividade adrenérgica cardíaca, poder ser um instrumento útil na identificação dos indivíduos com maior risco de progressão da doença, incluindo os familiares assintomáticos.

O valor prognóstico da cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG foi demonstrado em doentes com insuficiência cardíaca [263-265], nomeadamente na avaliação de risco arrítmico, de morte súbita ou progressão da doença [266]. É um exame que pode auxiliar na avaliação pré-transplante cardíaco [267] ou na decisão de implantar um cardiodesfibrilhador [268-272]. Pode permitir monitorizar a resposta à terapêutica farmacológica, nomeadamente aos bloqueadores-beta [273-275], existindo uma correlação significativa entre as alterações dos parâmetros da cintigrafia e os de remodelagem do ventrículo esquerdo, como o volume e a função ventricular, durante o tratamento.

Noutras cardiopatias, como a doença valvular [276], cardiopatia isquémica[277], hipertensão arterial[278] e miocardiopatia hipertrófica [279-280], este exame parece ter valor preditivo na determinação do risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

Relativamente à hipótese colocada, de que a cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG, poderia ter particular interesse na abordagem clínica das miocardiopatias dilatadas genéticas, considerámos que:

a Nos indivíduos afectados, poderia servir para avaliar o risco de progressão da doença ou de morte súbita, que é elevado na presença de algumas mutações (ex. laminopatias);

b Entre os familiares assintomáticos, poderia identificar aqueles com maior risco de expressão fenotípica da doença e que, eventualmente, poderiam beneficiar com o início precoce de terapêutica médica, nomeadamente, com bloqueadores-beta.

Figura 5 | Possível utilidade clínica da cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG, na miocardiopatia dilatada familiar.

Ecocardiograma	Parâmetros da cintigrafia com MIBG	Classificação dos indivíduos	Implicações na prática clínica
Miocardiopatia dilatada	**Desnervação funcional** *Maior % Washout*	→ **Risco de progressão da IC ou de morte súbita**	→ **Vigilância clínica mais frequente? Implantação de CDI?**
Ecocardiograma normal ou com alterações *minor*	**Hiperactividade adrenérgica cardíaca**	→ **Afectado, sem disfunção sistólica?**	→ **Bloqueadores-beta?**
	Normais	→ **Não - afectado**	→ **Vigilância**

CDI - Cardiodesfibrilhador implantável; **IC** - Insuficiência Cardíaca; **MIBG** - Metaidobenzilguanidina.

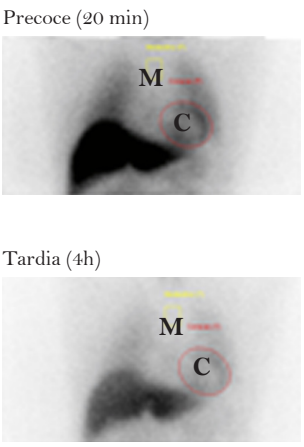
Neste contexto, avaliámos os elementos de 23 famílias distintas (n=45), incluindo doentes e familiares assintomáticos.

Conforme esperado, verificámos que os indivíduos com critérios de miocardiopatia dilatada [n=29, fracção de ejecção por ressonância magnética=30% (25-45)] apresentavam as alterações mais significativas da actividade adrenérgica cardíaca, com valores da razão tardia coração/mediastino de 1.73±0,26 e percentagem de *washout* de 43±11%.

A presença de realce tardio, na ressonância magnética, foi documentada em 27% dos doentes. Durante um período de seguimento 558 (432-863) dias, foram transplantados 6 (21%) doentes, cujos valores de *washout* (51±10%) foram significativamente distintos dos restantes doentes com miocardiopatia dilatada (41±11%). A presença de realce tardio foi também distinta entre os dois grupos de doentes, transplantados e não transplantados (p=0.02)

É de salientar que, recentemente, o valor de *washout* superior a 27% e a razão coração/mediastino (tardia) inferior a 1,75 foram associados, respectivamente, a risco de morte súbita e de eventos cardíacos *major*, na população de doentes com insuficiência cardíaca [267, 281].

Figura 6 | Principais índices calculados na cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG.



C = Coração

M = Mediastino

Razão C/M = C/M

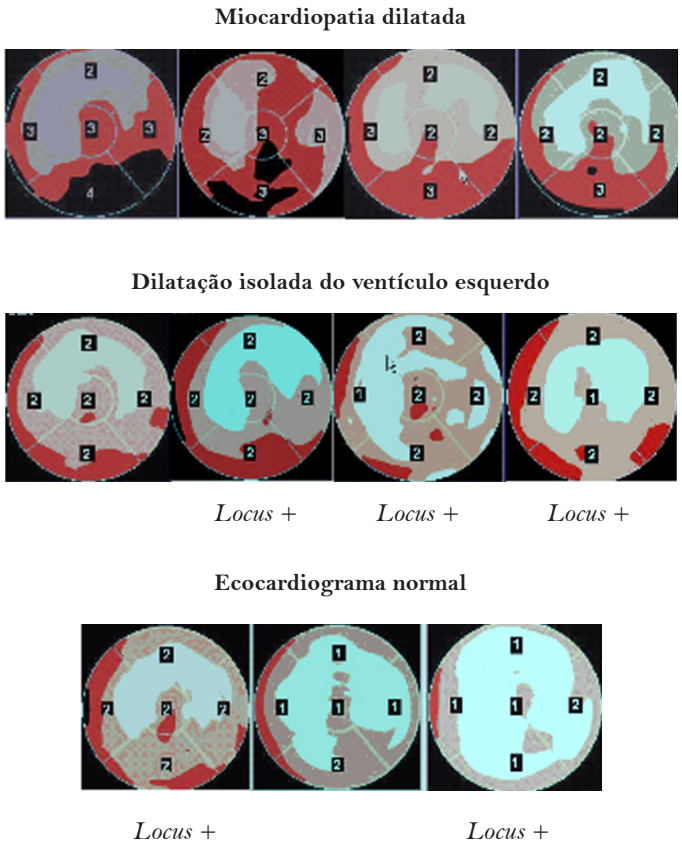
$$\text{\% de Washout} = \frac{\text{Imagem Precoce (C - M) - Imagem Tardia (C - M)}}{\text{Imagem Precoce (C - M)}} \times 100(\%)$$

Mais surpreendente, foi o resultado que obtivemos no grupo de indivíduos com fracção de ejecção normal (> 50%) e que incluía 6 doentes com remodelagem reversa, isto é, com recuperação da função ventricular, após instituição de terapêutica médica, e 10 familiares assintomáticos. Nenhum apresentava elevação do valor de BNP ou evidência de fibrose na ressonância magnética cardíaca. Valores anormalmente elevados de *washout* (> 30%) foram observados em 5 daqueles com recuperação da função e em 6 familiares assintomáticos (4 portadores do *locus* associado à doença (7q22.3-31.1) e 2 com ecocardiograma normal e sem diagnóstico molecular estabelecido).

Nestes indivíduos, a elevação da percentagem de *washout* poderá reflectir o aumento da actividade adrenérgica cardíaca, relacionada com a presença de um processo activo ou incipiente de remodelagem cardíaca. Esta interpretação é de certo modo apoiada pelo facto de ter sido identificada nos casos em que existiu disfunção ventricular prévia, e também entre os portadores assintomáticos, três deles com dilatação isolada do ventrículo esquerdo, uma vez que estes, teoricamente, têm maior risco de desenvolver a doença. A relevância clínica destes achados depende obviamente do alargamento da amostra e do período de seguimento de todos os indivíduos observados.

No entanto, podemos afirmar que estes resultados reforçam a ideia da heterogeneidade que existe entre os diferentes elementos familiares, nos quais a presença de hiperactividade adenérgica cardíaca poderá contribuir para a expressão clínica da doença (Figura 7).

Figura 7 | Mapas polares de 5 segmentos do ventrículo esquerdo, obtidos na cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG.



Os valores de 1 a 4 correspondem à distribuição relativa de graus de coloração ou captação do ^{123}I-MIBG, após comparação com as regiões de captação máxima, em cada caso.

Importância das alterações subclínicas entre os familiares assintomáticos

A detecção precoce do processo de remodelagem cardíaca é alvo de activa investigação, uma vez que pode permitir maximizar a eficácia das medidas terapêuticas. De um ponto vista clínico, pode ter um interesse maior ou equivalente ao do diagnóstico molecular, uma vez que a presença de uma mutação não garante a expressão fenotípica.

No caso da miocardiopatia dilatada hereditária, o seguimento dos familiares assintomáticos veio a revelar que estes possuem maior risco de desenvolver a doença e que, em alguns, é possível detectar alterações subclínicas [211]. Estas são de carácter morfológico, funcional ou serológico, embora, na maioria, seja desconhecido o seu verdadeiro significado fisiopatológico ou valor prognóstico independente (Quadro 5).

Quadro 5 | Alterações subclínicas entre os familiares assintomáticos.

Ecocardiograma	ECG de alta-resolução	Prova de esforço cardiorespiratória	Ressonância magnética cardíaca	Outras alterações
Dilatação isolada do ventrículo esquerdo[29]	Anomalia na análise espectral de frequência [232]	VO2 <a 80% do previsto [236]	Parâmetro de "estado de doença"> 0,45 [237]	Hipertrofia dos cardiomiócitos na histologia [283]
Diminuição das velocidades sistólicas do anel mitral por Doppler tecidular [231]	Potenciais tardios[282]			Presença de auto-anticorpos séricos [222, 284-286]
Índice de Tei> 0,35 [230]				Elevação da IL-2 sérica [235]

DTDVE - Diâmetro telediastólico do ventrículo esquerdo; **VO2** - Consumo máximo de oxigénio, obtido na prova de esforço cardiorespiratória.

Recentemente, demonstrou-se que a presença de auto-anticorpos anti-miocárdio em circulação tem valor prognóstico entre os familiares assintomáticos, com ou sem alterações ecocardiográficas[287].

Relativamente à presença de dilatação isolada (sem disfunção sistólica) do ventrículo esquerdo, que pode ser observada até 20% dos familiares, não parece ser uma variante do normal pelo facto de, em estudos que incluíram o diagnóstico genético, ter segregado com o *locus* da doença, por evoluir, entre 10 a 25% dos casos, para miocardiopatia dilatada, e por se associar, frequentemente, à presença de outro tipo de anomalias [213, 231-232, 236].

Mahom e colaboradores, ao seguirem parentes assintomáticos de doentes com miocardiopatia dilatada, verificaram que, ao fim de 53 meses, 10% daqueles com dilatação do ventrículo esquerdo ou diminuição da fracção de encurtamento, progrediram para miocardiopatia dilatada. Contudo, 42% dos mesmos registaram melhoria ou regressão destas mesmas alterações[213].

Na nossa avaliação, verificámos que 4 dos portadores do *locus* associado à doença, 3 deles com dilatação isolada do ventrículo esquerdo, apresentavam anomalias na cintigrafia com ^{123}I-MIBG, a sugerir a presença de hiperactividade adrenérgica cardíaca. Estas alterações levam-nos a admitir a hipótese de um eventual benefício da utilização de bloqueadores-beta neste estádio da doença.

Apesar de estes "endofenótipos" poderem vir a constituir possíveis marcadores de risco de doença, não está ainda preconizado o início precoce de terapêutica médica, na ausência de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo.

Só a futura correlação das anomalias identificadas, com os achados moleculares e o resultado do seguimento a longo prazo, permitirá a correcta interpretação dessas alterações, nomeadamente a identificação de doença precoce ou apenas de doença ligeira, não evolutiva.

Interpretação fisiopatológica

História natural da miocardiopatia dilatada familiar

A história natural da miocardiopatia dilatada familiar, excluindo-se as manifestações arrítmicas agudas, caracteriza-se habitualmente por um longo período de ausência de sintomas, no qual pode ser possível detectar alterações mais ou menos frustres, a nível do electrocardiograma, ecocardiograma, resposta clínica ao esforço, presença de auto-anticorpos ou mesmo hiperactividade adrenérgica cardíaca na cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG.

A doença manifesta-se frequentemente na idade adulta, com o aparecimento de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca, algumas vezes coincidente com a exposição a factores externos, nomeadamente as infecções [233, 288] ou a gravidez [22, 219, 289].

Neste contexto, é possível considerar quatro estádios distintos na evolução da doença (Figura 8):

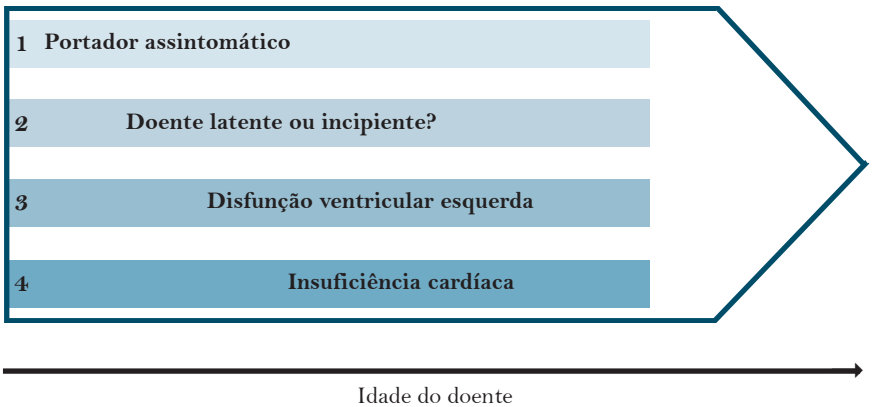
1º estado de portador assintomático;

2º doença em fase latente ou incipiente, em que podem ou não ser detectadas alterações subclínicas;

3º presença de disfunção ventricular;

4º manifestação de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca.

Figura 8 | História natural da miocardiopatia dilatada familiar.



A partir do 2º estádio, a deterioração da função cardíaca poderá ou não ocorrer e é possível haver melhoria da função contráctil, resultante da designada, por Barry Greenberg, "plasticidade" miocárdica [290]. O que determina a progressão ou a reversão do fenótipo, este último revelador das capacidades adaptativas do miocárdio, deve depender de factores de ordem genética, ambiental ou terapêutica.

Nos factores genéticos será de considerar, não só a mutação causal, mas também o papel de outros genes e de polimorfismos, nomeadamente os dos elementos dos sistemas chave neuro-hormonais, que estão activamente envolvidos nos mecanismos de remodelagem cardíaca na insuficiência cardíaca [291-292].

Nos adultos, a presença de comorbilidades, como a doença coronária, HTA, diabetes, e a exposição a factores ambientais, como o tabaco, álcool ou a dieta, podem contribuir para o desenvolvimento ou progressão da doença. A HTA e a diabetes podem modular significativamente a expressão fenotípica, dado que ambas as condições podem, por si só, induzir o processo de remodelagem [293-294].

Outra possibilidade é a de ser necessário um segundo "*hit ou multi-hit*", para que ocorra a manifestação da doença, de forma análoga ao que ocorre em certos modelos neoplásicos [295-296]. Esta teoria tem a apoiá-la a descrição recente de doentes com miocardiopatia hipertrófica, que são portadores de mais do que uma mutação patogénica, e nos quais as manifestações clínicas tendem a ser mais graves [38, 297-298]. Uma outra evidência, diz respeito à presença frequente de genoma vírico no miocárdio de indivíduos com miocardiopatia dilatada idiopática [221, 299-301]. No caso da exposição vírica, conhecem-se já algumas interacções genótipo-fenótipo. Por exemplo, num modelo animal de distrofinopatia, verifica-se que os ratinhos desenvolvem miocardiopatia dilatada particularmente grave quando são infectados por enterovírus, pois estes são capazes de produzir uma protease que cliva a distrofina [302-303].

O papel de cada um dos múltiplos factores considerados determinantes na expressão clínica da doença, dependerá da sua "intensidade" relativa, ou seja, da capacidade de alterarem os mecanismos homeostáticos que permitem a manutenção da função contráctil dos cardiomiócitos portadores de mutações (potencialmente) patogénicas (Quadro 6).

Quadro 6| Determinantes da expressão clínica da miocardiopatia dilatada familiar.

Exemplos de factores envolvidos na patogenia da miocardiopatia dilatada genética
Mutação (ões) patogénica (s)
Heteroplasmia, mosaicismo
Polimorfismos genéticos, SNP's
Influências epigenéticas
Resposta imunológica
Resposta inflamatória
Resposta neuro-hormonal
Género, envelhecimento, gravidez
Co-morbilidades, factores de risco cardiovascular
Exposição ambiental, incluindo factores dietéticos
Infecções
Factores psicológicos?

Nos próximos anos, a investigação molecular e clínica nesta área deverá contribuir para a melhor compreensão da etiopatogenia da miocardiopatia genética e provavelmente ajudará no desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico e terapêutica, algumas das quais potencialmente aplicáveis a doentes com miocardiopatia dilatada de outras etiologias.

Integração no modelo de remodelagem da insuficiência cardíaca

A miocardiopatia dilatada caracteriza-se pela presença de dilatação ventricular e depressão da contractilidade miocárdica, resultantes de um processo fisiopatológico designado por remodelagem cardíaca [304-305].

A remodelagem pode ser fisiológica ou patológica e esta última ocorre em resposta a variados estímulos anormais como, por exemplo, a isquemia, inflamação, infecção, sobrecarga de pressão ou de volume, deficiência nutricional ou toxicidade farmacológica. O evento ou "momento índex", que dá início a este processo, pode ser ou não facilmente demarcável no tempo, como é o caso das miocardiopatias secundárias à presença de hipertensão arterial ou diabetes ou as de origem genética [306-307].

A definição clássica de "*remodeling*" foi estabelecida por Cohn e colaboradores, no ano 2000, sendo caracterizada como um conjunto de modificações celulares e moleculares, que resultam da alteração da expressão génica das células cardíacas, e que se manifestam, do ponto de vista macroscópico, por alterações do tamanho, da forma e/ou da função dos ventrículos [308-309]. A evolução da doença deve-se às alterações progressivas destas variáveis, atingindo, a dada altura, uma expressão clínica e, por fim, conduzindo à morte do doente.

Assim, independentemente da etiologia, a miocardiopatia resulta sempre da alteração da expressão génica, que pode ser de 2 tipos fundamentais: alteração secundária à expressão anómala de genes normais[310]; alteração secundária à presença de mutações em genes que codificam proteínas com papel funcional ou estrutural a nível cardíaco [80].

No caso das miocardiopatias genéticas, admite-se que a presença de uma proteína anormal (dominância negativa) ou ausência da mesma (haploinsuficiência), sejam os mecanismos responsáveis pelo desencadear do processo fisiopatológico, alterando, secundariamente, a expressão de outras proteínas normalmente expressas no cardiomiócito. Cada mutação causal pode produzir efeitos mais os menos perturbadores da fisiologia celular normal, cujos detalhes podem ser difíceis de dissecar, dada a enorme inter-comunicação entre as diferentes vias de sinalização inter e intracelular. Essas vias de sinalização podem ou não confluir em pontos "nodais", nos quais pode ser possível actuar eficazmente do ponto de vista terapêutico.

Um outro aspecto a considerar, é o facto de a remodelagem envolver múltiplas células e compartimentos tecidulares. Para além dos miócitos, os fibroblastos, as células endoteliais, os monócitos-macrófagos e os leucócitos participam neste processo fisiopatológico. Os fibroblastos produzem factores de crescimento, com efeitos autócrinos e parácrinos, que podem estimular a hipertrofia dos cardiomiócitos. Além disso, desempenham um papel crucial na formação e manutenção da matriz extracelular, produzindo a fibronectina e o colagénio I e III e regulam a degradação das fibrilhas, através da produção de metaloproteinases e dos seus inibidores [311-312]. A ejecção de sangue pelo coração requer, não só, a geração da força contráctil pelos miofilamentos, mas também a respectiva transmissão para e através da matriz [313].

Um exemplo de envolvimento multicelular nas miocardiopatias genéticas é a alteração da integridade do citoesqueleto das células musculares lisas das artérias coronárias do ratinho, secundárias a mutações nos sarcoglicanos [173]. Num desses modelos, verificou-se que o vasoespasmo coronário e a isquemia resultantes contribuem para a progressão da doença miocárdica [314].

Em suma, a compreensão da remodelagem, a nível celular e molecular, exige a avaliação, em simultâneo, de múltiplos intervenientes e da sua sequência temporal, em diferentes modelos genotípicos humanos, animais ou celulares. Só assim será possível conceber estratégias terapêuticas eficazes que possam impedir a resposta hipertrófica maladaptativa.

As mutações que comprometam ou modifiquem a resposta hipertrófica também podem contribuir significativamente para a manifestação de cardiopatias de outras etiologias, condicionando o aparecimento de insuficiência cardíaca precoce, secundária à exposição a factores externos, de menor magnitude.

Seguidamente, descrevem-se alguns dos mecanismos envolvidos no processo de remodelagem miocárdica, contextualizando alguns dos achados identificados em doentes ou modelos animais com miocardiopatia dilatada genética. Algumas mutações parecem reproduzir, *ad initium*, as alterações moleculares que foram genericamente descritas em tecido de corações insuficientes, de múltiplas etiologias (Quadro 7).

Quadro 7 | Mecanismos envolvidos na remodelagem cardíaca.

Mecanismos envolvidos na remodelagem cardíaca	Correlatos na miocardiopatia dilatada genética
Hipertrofia dos cardiomiócitos	Activação de JNK e ERK na presença da mutação H222P da lâmina A/C.
Alteração dos miofilamentos	Diminuição da sensibilidade ao cálcio na presença de mutações da troponina e da tropomiosina.
Alteração do citoesqueleto	Formação de agregados proteícos e perturbação do sistema ubiquitina-proteossoma nas mutações na desmina. Aumento da proteólise e diminuição da afinidade para os ligandos, nas mutações da titina.
Perda de miócitos	Apoptose induzida por mutações da lâmina A/C.
Fibrose miocárdica	Fibrose induzida por mutações na lâmina A/C e no *locus* 10q25-26.
Inflamação e auto-imunidade	Nos familiares assintomáticos, sem disfunção ventricular esquerda, é possível detectar a presença de auto-anticorpos e elevação da IL-2.
Activação neuro-hormonal	Nos familiares assintomáticos, sem disfunção ventricular esquerda, pode ser possível detectar a presença de hiperactividade adrenérgica cardíaca.

Hipertrofia dos cardiomiócitos

O coração está geneticamente programado para manter uma tensão normal na parede, sendo capaz de alterar o seu programa genético em função dos estímulos ou agressões a que é submetido. Invariavelmente, tenta manter a função contráctil normal e o débito cardíaco, através de um processo de hipertrofia miocárdica. A hipertrofia adaptativa permite não só a geração de mais força contráctil (sístole), como a manutenção do *stress* de parede (diástole).

Em condições normais, ocorre hipertrofia fisiológica durante o crescimento, a gravidez ou secundariamente ao treino atlético. Nestes casos, para além do aumento da síntese das proteínas contrácteis, o leito vascular desenvolve-se proporcionalmente, de forma a acomodar a hipertrofia induzida pelo exercício. A hipertrofia fisiológica pressupõe a normalidade das funções sistólica e diastólica e a inibição da morte dos cardiomiócitos, contrariamente ao que ocorre na hipertrofia patológica [315-316].

Quando ocorre hipertrofia patológica, por exemplo, em resposta a sobrecarga de volume ou de pressão, a hipertrofia equilibra a sobrecarga hemodinâmica, normalizando o *stress* da parede ventricular, mas estas alterações "benéficas" são transitórias e o coração hipertrofiado acaba por dilatar e evoluir para um processo designado por "descompensação". A partir de determinado momento, a dilatação das cavidades, com aumento da pressão telediastólica, combinada com um adelgaçamento relativo das paredes contribui para um aumento dramático da sobrecarga diastólica nas paredes ventriculares.

Os miócitos cardíacos são células terminalmente diferenciadas (colocadas em G0, fora do ciclo celular), não tendo capacidade de se dividir, pelo menos de uma forma que, em termos numéricos, seja suficientemente expressiva, para que tenha repercussão clínica.

Os estímulos hipertróficos, ao reintroduzirem os miócitos no ciclo celular (fases G1 e S), não induzem a mitose, mas sim a ocorrência de apoptose. Desta forma, se a hipertrofia é, numa fase inicial, adaptativa, levando a um aumento das miofibrilhas, com aumento da força contráctil e redução do stress de parede, por contrapartida, cronicamente, é profundamente maladaptativa, dado que conduz à perda progressiva e inexorável do contingente miocitário.

Mais de uma centena de modelos animais de miocardiopatia hipertrófia, de hipertrofia cardíaca e de insuficiência cardíaca, contribuíram para o esclarecimento dos múltiplos mecanismos celulares envolvidos nas respostas hipertróficas [317].

Sabe-se que numerosos estímulos hipertróficos convergem para as mesmas cascatas de sinalização intracelular, isto é, múltiplas vias paralelas de cinases e fosfatases que agem como transdutores bioquímicos e que medeiam as alterações coordenadas do perfil genético, com aumento das taxas de transcrição de ARN e da síntese proteica [318-319].

Variados estímulos hipertróficos, incluindo a sobrecarga mecânica, neuro-hormonas (ex. endotelina-1, noradrenalina, angiotensina II), citoquinas e factores de crescimento, são capazes de induzir a resposta hipertrófica através da activação das proteínas cinases activadas por mitogéneos (MAPK) [320]. As MAPK são reguladas por variados agonistas extracelulares e/ou agressores celulares, sendo capazes de fosforilar uma variedade de factores de transcrição, reprogramando a expressão genética e aumentando a síntese proteica.

Não é ainda claro se as vias de sinalização intracelular, que medeiam o programa hipertrófico nas miocardiopatias genéticas, são semelhantes às envolvidas noutras etiologias. Por exemplo, no modelo animal com a mutação humana H222P na lâmina A/C objectivou-se uma activação (fosforilação) precoce e translocação nuclear das cinases JNK e ERK1/2, a preceder a ocorrência da dilatação e disfunção ventriculares [321]. A importância desta alteração foi corroborada pelo efeito observado após a administração sistémica de um inibidor da activação das ERK que impediu o desenvolvimento da miocardiopatia[322]. Uma hipótese ponderada foi a de que, a lâmina nuclear possa servir como um armazém de substratos da via MEK-ERK e esta função possa ficar comprometida na presença de mutações no gene LMNA.

Nos casos das mutações que afectem proteínas do citoesqueleto celular, é possível que o estímulo hipertrófico tenha início em proteínas que actuam como sensores celulares biomecânicos, como é o caso das integrinas, localizadas no sarcolema, ou em componentes do disco-Z do sarcómero.

Assim, ao nível dos costâmeros, sabe-se que a activação das integrinas, por diferentes ligandos extracelulares (colagénio, fibronectina, laminina), é capaz de induzir múltiplas vias de sinalização intracelular, como a ERK 1/2 e a Akt/GSK3β [323], através da acção de proteínas adaptadoras, como a vinculina, proteína na qual também foram identificadas mutações patogénicas em casos familiares de miocardiopatia dilatada.

Quando as mutações afectam proteínas envolvidas no metabolismo do cálcio intracelular, pode estar predominantemente comprometida a via da calcineurina [324]. A calcineurina é uma fosfatase capaz de activar o factor de transcrição NFAT, que por sua vez activa os factores GATA 4 e MEF2C, que medeiam a hipertrofia patológica. As mutações na MLP, proteína localizada nos discos-Z e que interage directamente com a calcineurina, podem, desta forma, condicionar uma resposta hipertrófica anormal induzida pelo estiramento do sarcómero [325-326].

Alteração dos miofilamentos contrácteis

No coração humano, durante a transição da hipertrofia compensadora para descompensação cardíaca, ocorrem alterações estruturais progressivas, destacando-se a reorganização dos miofilamentos e do citoesqueleto, a degenerescência e morte celular dos miócitos e a fibrose intersticial [327].

Relativamente às alterações miofilamentares, para além da alteração da organização miofibrilar, com rarefacção dos sarcómeros, é possível documentar uma redução significativa da actividade ATPásica miofibrilhar e da taxa de formação de ligações cruzadas actina-miosina, o que contribui para a redução da força contráctil [328-329]. Uma das possíveis explicações, para a diminuição da actividade miofibrilhar, é a alteração da sensibilidade ao cálcio dos miofilamentos, que parece resultar da modificação do estado de fosforilação das proteínas contrácteis, pelas proteínas cinases A (PKA) e C (PKC) [330-331].

Na miocardiopatia dilatada genética, secundária a mutações em algumas proteínas do sarcómero, foi precisamente demonstrada a redução da sensibilidade ao cálcio dos miofilamentos[180, 182, 332-334]. Este efeito foi amplamente documentado para mutações da troponina T, incluindo aquela identificada num dos nossos casos familiares (K210del) [181]. No ratinho *knock-in* para esta mutação, a utilização de um sensibilizador ao cálcio, o pimobendan, foi particularmente eficaz na prevenção da progressão da miocardiopatia dilatada, ao contrário do efeito produzido pela anrinona, agonistas ou antagonistas beta-adrenérgicos [188]. Este resultado coloca em perspectiva a possibilidade de, no futuro, o diagnóstico molecular ou apenas o reconhecimento das repercussões funcionais das proteínas disfuncionantes, poderem vir a ser utilizados na individualização da terapêutica farmacológica a aplicar a estes doentes.

É interessante referir que os efeitos produzidos pelas mutações nos mesmos genes, mas de doentes com miocardiopatia hipertrófica ou restritiva são geralmente opostos, isto é, associam-se a um aumento da sensibilidade ao cálcio e da actividade ATPásica [185, 335-336]. Não se conhecem quais e como estão diferencialmente envolvidas as vias de sinalização intracelular, que condicionam processos aparentemente tão distintos de remodelagem ventricular.

Alteração do citoesqueleto

A remodelagem do citoesqueleto celular, com diminuição da transmissão da força contráctil, é um achado comum na miocardiopatia dilatada, independentemente da etiologia, sobretudo nos estádios terminais da doença. Por exemplo, ocorrem alterações secundárias da distrofina em doentes com insuficiência cardíaca de várias etiologias, incluindo a isquémica, que podem ou não melhorar com a utilização temporária de dispositivos de assistência ventricular mecânica [337-340].

Na miocardiopatia dilatada idiopática, há um aumento da expressão e desorganização espacial de desmina [341-342], provavelmente pela necessidade de contrabalançar o aumento da sobrecarga da parede, embora não se possa excluir que este incremento possa contribuir, por si só, para a disfunção ventricular [343-345].

No caso da titina, o maior componente do citoesqueleto do sarcómero, sabe-se que existe um aumento da sua proteólise na insuficiência cardíaca terminal [346] e também secundariamente a certas exposições, como à doxorubicina ou por acção da radiação-X, em doentes submetidos a irradiação torácica [347-348].

Estes exemplos ilustram a possibilidade de, na presença de mutações da distrofina, desmina ou titina, a exposição a agentes agressores, mesmo que de menor magnitude, possa condicionar a expressão ou a gravidade da doença cardíaca.

Alteração no metabolismo do cálcio

A contracção muscular inicia-se pela libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático para o citosol[349]. O relaxamento depende da recaptação do cálcio para o retículo, pela isoforma cardíaca da bomba de cálcio SERCA2a (sarcoplasmatic endotelial reticulum calcium-ATPase).

Uma marca comum dos cardiomiócitos de corações insuficientes é a anomalia da homeostasia do cálcio. O aumento de cálcio diastólico pode resultar da diminuição da actividade da SERCA ou do aumento da sua inibição pelo fosfolamban (PLN). Por seu turno, a redução dos níveis de expressão do fosfolamban e do seu grau de fosforilação influenciam profundamente a actividade da SERCA [350].

Nos casos de miocardiopatia dilatada secundárias a mutações do fosfolamban, parece ocorrer precisamente uma inibição da actividade da SERCA2a[98], o que se correlaciona com os resultados obtidos em numerosos modelos animais, que mostraram a associação da inibição da SERCA2a com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca [351].

Perda de miócitos

No miocárdio, a perda difusa de miócitos afecta significativamente a função ventricular e essa perda pode ocorrer por dois mecanismos principais distintos: a apoptose e a necrose. Dependendo das condições intra e extracelulares, a taxa de morte celular pelos dois processos é altamente variável.

A apoptose no coração normal é extremamente rara, cerca de 0,001%, mas pode aumentar significativamente na insuficiência cardíaca (0,08-0,25%), nomeadamente nos períodos de exacerbação da doença [352].

É um processo que inclui várias etapas, e que culmina na activação das caspases, quer pela via intrínseca, através da libertação mitocondrial do citocromo-c, quer pela via extrínseca, via activação de receptores localizados na superfície celular. As caspases são cisteina-proteases que clivam proteínas estruturais do citoplasma e do núcleo, incluindo a polimerase do ADN, a lâmina nuclear, a PKC ou proteínas do aparelho contráctil do miócito, contribuindo para a disfunção sistólica [353-354].

Conforme referido anteriormente, a apoptose parece ser um mecanismo importante, relacionado com o aparecimento das alterações electrofisiológicas precoces, nos doentes com laminopatias. Em ratinhos portadores de mutações na lâmina A/C, foi possível verificar a ocorrência de apoptose precoce, nas células do nó auriculoventricular, antes da dilatação e disfunção ventriculares [200].

Sabe-se que a lâmina A/C normal é capaz de sequestrar o proto-oncogene c-fos ao nível do envelope nuclear, afectando a sua dimerização com o c-Jun, e desta forma inibir a ligação do activador da transcrição pró-apoptótico AP-1 ao ADN. Num outro modelo, *lamin-null*, foi demonstrada a necessidade da lâmina normal para a sobrevivência pós-natal dos miócitos do tecido de condução[355].

Um outro tipo de morte regulada, a autofágica, é independente das caspases e morfologicamente caracteriza-se pela presença de múltiplos vacúolos autofágicos. A autofagia ineficiente parece ter um papel crítico no desenvolvimento de alterações miocárdicas relacionadas com o envelhecimento e em certas doenças de armazenamento lisossómico, também hereditárias e que podem envolver o miocárdio, como a doença de Fabry, Pompe e de Danon [356-358].

Fibrose Miocárdica

A presença de fibrose contribui significativamente para o aumento da rigidez miocárdica, uma medida da função diastólica.

Praticamente todos os doentes com insuficiência cardíaca apresentam excessiva deposição de colagénio na matriz extracelular, embora o grau de fibrose seja muito variável e esteja relacionado com a duração da doença. Paralelamente ao aumento da fibrose, ocorre perda dos elementos microvasculares o que contribui para a perda celular progressiva.

Vários factores podem afectar a remodelagem da matriz extracelular e, apesar desta ser um "órgão dinâmico", a presença de fibrose significativa não é compatível com uma recuperação funcional.

A fibrose pode ser reparativa ou de substituição, devida a perda de miócitos, servindo para restituir a integridade do tecido cardíaco perdido, por exemplo, após um enfarte tecidular. A fibrose pode ainda ser proliferativa, secundária à reacção dos fibroblastos ao aumento de citoquinas. Os fibrobastos cardíacos, contrariamente aos cardiomiócitos, conseguem, sob estímulos proliferativos, atingir a fase final da mitose e dividir-se, aumentando assim o seu contingente.

São múltiplos os factores envolvidos na fibrose reactiva e reparativa. Neuro-hormonas como a angiotensina II, a aldosterona e o TGF-β são agentes profibróticos, enquanto o peptideo natriurético tipo-B (BNP) tem propriedades antifibróticas [359-360]. Recentemente verificou-se que os microRNAs (miR-133 e miR-30), isto é, RNAs não codificantes, capazes de regular a expressão genética, através da hibridização com o ARN mensageiro, também são importantes na regulação da matriz [361].

A ressonância magnética permite detectar a fibrose miocádica *in vivo*, através da avaliação da presença de realce tardio após administração de gadolíneo [362]. Por este método documentou-se a expansão da matriz extracelular em casos de miocardiopatia dilatada idiopática ou familiar[362-363].

Na presença de mutações da lâmina A/C, a fibrose miocárdica parece constituir um evento precoce na evolução da doença, podendo ser o substrato da disfunção diastólica e do aumento significativo das dimensões auriculares, observado em alguns dos doentes. Frequentemente envolve o sistema de condução cardíaco, sendo predominante na porção basal do septo interventricular[364-365]. Desconhecem-se, ainda os mecanismos moleculares que justificam este fenótipo"pró-fibrótico".

No caso da miocardiopatia na distrofia muscular de Duchenne e de Becker também é frequente identificar-se a presença de fibrose por ressonância [366-368]. Um aumento da expressão de genes pró-fibróticos, como o NOx4 e Lox foi documentado num modelo animal de distrofinopatia. O Lox é uma enzima que estabelece as ligações cruzadas entre o colagénio e a elastina e o Nox4 é um gene que é activado em resposta ao TGF-β.

Activação neuro-hormonal

Na presença de disfunção ventricular esquerda, ocorre activação de uma complexa cascata de mecanismos neuro-hormonais que visam a preservação da função cardíaca, mas que, paradoxalmente, contribuem para a progressão do processo de remodelagem.

O impacto positivo da terapêutica médica com inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) e do sistema adrenérgico, em doentes com insuficiência cardíaca de diversas etiologias e em modelos animais de miocardiopatia genética, veio corroborar a importância fisiopatológica destas neuro-hormonas na progressão da doença.

Vários polimorfismos genéticos foram identificados nos diferentes intervenientes destes sistemas, sendo os respectivos genes, candidatos por excelência na investigação molecular de doentes com miocardiopatia dilatada. Até ao momento, a maioria dos estudos de susceptibilidade genética aponta mais para um papel destes polimorfismos na modulação da expressão clínica (genes modificadores) do que na determinação de aumento de risco de desenvolvimento da doença (genes de susceptibilidade).

Os resultados mais consistentes foram os obtidos com as variantes genéticas do SRA e do sistema adrenérgico.

No caso do SRA, são considerados, classicamente, como genótipos "pró-hipertróficos": D/I ACE, A/C1666 AT1, A/G1903 quimase A, M235T angiotensinogénio, C/T344 na sintetase da aldosterona (CYP11B2). Vários destes polimorfismos foram implicados no aumento da hipertrofia cardíaca em resposta ao treino do exercício e à HTA, assim como na menor sobrevida e na evolução para transplante cardíaco, em doentes com insuficiência cardíaca [369-371].

Na miocardiopatia hipertrófica, a associação de dois ou mais genótipos hipertróficos, associou-se a maior grau de hipertrofia septal, obstrução da câmara de saída do ventrículo esquerdo e à progressão da hipertrofia. Curiosamente, o efeito do genótipo DD da ECA, parece depender da mutação em causa, isto é, determina o grau de hipertrofia na presença de mutações no gene MYBPC3, mas não nas mutações do gene MYH7 [372-376].

No caso da miocardiopatia dilatada familiar, desconhece-se ainda qual o papel modulador do SRA na expressão clínica da doença. Um estudo efectuado em doentes com miocardiopatia dilatada idiopática, mostrou a inexistência de associação entre os polimorfismos I/D da ACE, T174M e M235T do angiotensinogénio, A153G e A+39C do receptor AT1 e T344C da CYP11B2 e a presença ou gravidade da doença cardíaca, o que não é necessariamente equivalente a relacioná-los com a doença de origem genética [377].

Relativamente ao sistema adrenérgico, nos últimos anos têm sido identificados numerosos polimorfismos nos receptores, que condicionam alterações funcionais, algumas com significado clínico [378-379]. Por exemplo, os alelos Gly49 e Arg389 no receptor β1 induzem uma dessensibilização pelo agonista, tendo sido associados a menor risco de insuficiência cardíaca em doentes com miocardiopatia dilatada. Os alelos Gly49 no receptor β1 e o Gly16Gly no β2 foram associados a risco acrescido de miocardiopatia dilatada [380-384].

Nos doentes com miocardiopatia dilatada genética também é desconhecido o papel que estes polimorfismos desempenham na expressão clínica da doença. No entanto, na nossa avaliação por cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG, é possível que, tenhamos, indirectamente, mensurado a modulação do sistema adrenérgico, que em última análise também depende da presença dos respectivos polimorfismos.

Aplicando esta última metodologia foi possível detectar, em doentes com insuficiência cardíaca, diferenças resultantes da presença do polimorfismo Del322-325 do receptor adrenérgico α2C [385].

Citoquinas

Os cardiomiócitos são células capazes de sintetizar um portefólio de citoquinas, nomeadamente o factor de necrose tumoral alfa (TNF-α) e elementos da família das interleucinas 1 e 6, em resposta a virtualmente qualquer agressão cardíaca. A produção de citoquinas pode ocorrer na completa ausência de activação do sistema imunitário.

São muito significativas as alterações produzidas pelas citoquinas a nível cardíaco, incluindo-se a indução da hipertrofia miocitária, a expressão de genes fetais, efeitos inotrópicos negativos, assim como a morte celular por apoptose. Devido aos seus efeitos pleiotrópicos, os resultados da acção das citoquinas podem divergir, em função da sua concentração ou duração da acção [386-387].

Por outro lado, existem várias interacções entre os sistemas neuro-hormonais e as citoquinas, condicionando que, parte dos efeitos adversos das neuro-hormonas clássicas possa ser atribuído à acção destes mediadores. Por exemplo, a angiotensina II é capaz de activar respostas inflamatórias numa variedade de tipos celulares, através da activação do NF-Kb. Por seu turno, a hiperexpressão de TNF-α é capaz de ampliar a sensibilidade dos fibroblastos aos efeitos pró-fibróticos da angiotensina II, por exemplo, aumentando a densidade dos receptores AT1 [388-390].

Estes factos realçam a redundância e inter-comunicação que existe entre os sistemas biológicos e explicam o fenómeno de "escape neuro-hormonal", isto é, a progressão da remodelagem ventricular, apesar do bloqueio das neuro-hormonas clássicas. É provável que, em condições patológicas ou então, na presença de mutações patogénicas, os *outcomes* celulares possam ser relativamente específicos, isto é, a resposta do miócito possa ser determinada pela actividade relativa de várias moléculas sinalizadoras activas.

Um outro aspecto importante é o papel que as citoquinas desempenham na regulação da resposta tecidular às infecções víricas, nomeadamente nas miocardites. A elevada prevalência (67%) de genoma vírico, identificado em corações de doentes com miocardiopatia dilatada, leva a supor que estes agentes e, portanto, as citoquinas, possam estar significativamente envolvidos na fisiopatologia da doença, incluindo nas formas hereditárias [300]. A este respeito, foram descritos casos familiares de "miocardite", que apoiam a existência de factores hereditários de susceptibilidade para estas infecções [391].

Concentrações elevadas de IL-2 foram também identificadas em 65% de doentes com miocardiopatia dilatada e em 60% dos seus familiares que apresentavam dilatação do ventrículo esquerdo, comparativamente a 5% em doentes com miocardiopatia isquémica e a 15% controlos normais [235]. Apesar de não provarem uma relação causal, este dado apoia a suposição de que os mediadores inflamatórios estejam envolvidos na patogenia da doença hereditária.

Mecanismos auto-imunes

A hipótese da patogenia auto-imune das miocardiopatias dilatadas genéticas foi apoiada por alguns trabalhos iniciais que revelaram uma maior prevalência do haplótipo HLA DR4 e a agregação de doenças auto-imunes, entre os casos familiares da doença [393-397]. Outros autores constataram a presença de auto-anticorpos numa percentagem de doentes com miocardiopatia dilatada idiopática e em familiares com dilatação isolada do ventrículo esquerdo [234, 284-285].

A presença destes anticorpos pode dever-se a mecanismos de mimetismo molecular, por exemplo, entre alguns epítopos de agentes infecciosos e a miosina cardíaca, ou serem secundários à necrose tecidular produzida por variados tipos de agressões [233]. Os auto-anticorpos foram identificados contra diferentes elementos celulares, específicos ou não do músculo cardíaco, incluindo

a cadeia pesada da α e β miosinas, receptores adrenérgicos β1, receptores muscarinicos M2 ou as mitocôndrias [398-400].

Relativamente aos auto-anticorpos anti-receptores β1, sabe-se que estes são muito prevalentes na generalidade de doentes com miocardiopatia dilatada (30-90%) e podem estimular o receptor, podendo influenciar a contractilidade dos miócitos e assim contribuir para a patogenia da insuficiência cardíaca [401-402]. Podem induzir a apoptose e estimular as MAPK, por mecanismos distintos e potencialmente sinérgicos com os agonistas-beta, podendo ser diferencialmente afectados pela terapêutica com os bloqueadores-beta [403-406]. A sua patogenicidade foi corroborada em modelos de miocardiopatia dilatada induzida pela transferência de anti-soro específico contra os receptores β1 e por ensaios clínicos que mostraram o benefício terapêutico da imunoadsorção, em doentes com miocardiopatia dilatada [407-410].

Recentemente, verificou-se que a presença de auto-anticorpos tem valor prognóstico entre os familiares assintomáticos, estando relacionada com o risco de progressão para miocardiopatia dilatada aos 5 anos [287]. A ausência desses auto-anticorpos, em combinação com a normalidade do ecocardiograma, apresenta um elevado valor preditivo negativo (98%) para o desenvolvimento da doença. Assim, tal como acontece noutras doenças auto-imunes, a identificação de anticorpos circulantes pode revelar-se útil no diagnóstico e no prognóstico, entre os indivíduos em risco e estes podem, eventualmente, beneficiar com a utilização de terapêuticas imunossupressoras ou imunomoduladoras.

Contributo da investigação das miocardias dilatadas familiares para o modelo molecular de remodelagem ventricular

Até ao momento, a investigação das miocardiopatias dilatadas familiares tem percorrido um caminho algo individualizado, consignado ao da investigação translacional, própria das doenças consideradas raras na população geral. Com efeito, os avanços qualitativos mais expressivos têm ficado a cargo da genética, biologia molecular e da anatomopatologia.

No entanto, as recentes propostas de classificação das miocardiopatias das Sociedades Europeia e Americana de Cardiologia, vieram dar um novo alento à investigação clínica das miocardiopatias genéticas, e isto deve-se a um variado conjunto de factores.

A possibilidade de cura da miocardiopatia dilatada encontra-se ainda longe do horizonte próximo e uma percentagem significativa de doentes morre nos dias de hoje por insuficiência cardíaca avançada ou morte súbita inesperada, apesar dos avanços da terapêutica médica [411].

O estudo das miocardiopatias familiares tem vindo a acrescentar novos dados na compreensão fisiopatológica dos mecanismos de remodelagem, permitindo:

1. Reconhecer a insuficiência cardíaca como o resultado de uma relação complexa entre factores genéticos, modificadores moleculares e estímulos ambientais;

2. Prolongar a história natural da doença, estendendo-a a longo período de ausência de sintomas e de sinais clínicos;

3. Identificar marcadores pré-clínicos da doença, com valor prognóstico, como as alterações ecocardiográficas *minor*, a presença de auto-anticorpos ou, eventualmente, indícios da activação precoce neuro-hormonal;

4. Confirmar a existência de marcadores genéticos e associações fenotípicas de risco, como as alterações da condução nos portadores de mutações da lâmina A/C;

5. Salientar uma futura aplicação da farmacogenética, demonstrando a eficácia na resposta individualizada a fármacos, como, por exemplo, dos sensibilizadores ao cálcio na presença de mutações da troponina T.

A futura dissecção dos mecanismos subcelulares envolvidos nas miocardiopatias genéticas poderá vir a possibilitar a identificação de novas moléculas-chave, possíveis alvos terapêuticos inovadores, que possam vir a ser aplicados no tratamento da generalidade de doentes com insuficiência cardíaca refractária, de outras etiologias.

O futuro desenvolvimento de estudos com *microarrays*, ou "*micro-chips*", na área da genómica e proteómica, aplicados a modelos animais e tecido humano, obtidos em fases distintas da doença e em variadas condições experimentais, irá provavelmente permitir decifrar as vias moleculares envolvidas, podendo contribuir para a subclassificação (molecular) das miocardiopatias, e desta forma acrescentar informação com valor prognóstico e/ou útil na decisão terapêutica. A expectativa ideal é a possibilidade de uma adaptação individual ou "*fine-tuning*" da terapêutica médica, isto é, um avanço na designada medicina personalizada.

A possibilidade de transferir para o miocárdio os genes deficitários ou aqueles capazes e induzir a produção de factores salutares parece uma ideia atraente, no entanto, tem-se confrontado com várias dificuldades técnicas, como a escolha do vector, do modo de administração ideal, até à identificação de alvos moleculares a atingir. Num futuro próximo, algumas das estratégias promissoras, incluem a atenuação dos efeitos da remodelagem através da promoção ou transferência génica de factores angiogénicos, inibidores da apoptose, como a hormona de crescimento, bcl-2 ou IGF-1, ou factores moduladores da função contráctil como os inibidores do fosfolamban [412-416].

Outra modalidade terapêutica, com potencial aplicação nesta área, é a designada medicina regenerativa, ou seja, terapêutica celular utilizando células progenitoras. As populações celulares podem ter origem na medula óssea ou serem células progenitoras adultas multipotentes. A sua transdiferenciação no miocárdio requer obviamente o conhecimento prévio e manipulação dos factores locais necessários para a sua ocorrência [418-421]. Os resultados da aplicação desta estratégia são ainda preliminares e referentes, sobretudo, à cardiopatia isquémica. Na insuficiência cardíaca crónica a experiência é ainda muito escassa.

Genericamente, é possível afirmar que a investigação das miocardiopatias genéticas irá contribuir significativamente para o enriquecimento do modelo molecular de remodelagem da insuficiência cardíaca e muito provavelmente irá fornecer novas pistas para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e/ou de abordagem terapêutica, aplicáveis à generalidade de doentes com miocardiopatia dilatada, mesmo que de outras etiologias.

Resumo e Conclusões

No projecto de investigação subjacente à presente dissertação, os objectivos principais visaram a caracterização clínica e molecular de famílias com miocardioptia dilatada genética. O critério principal de inclusão dos casos-índex foi a presença de miocardiopatia dilatada "idiopática" em dois ou mais elementos na mesma família.

De uma amostra inicial de 370 doentes com insuficiência cardíaca de diversas etiologias, seguidos numa consulta de cardiologia num hospital terciário, identificámos 50 doentes com critérios de doença familiar. Destes, a maioria (94%) apresentou-se na forma de miocardioptia dilatada isolada, isto é, sem sub-fenótipos associados. A idade média dos doentes foi de 40±12 anos, sendo a maioria do sexo masculino (68%). Na primeira consulta de inclusão no estudo, 90% encontravam-se em classe I ou II de NYHA. Durante os 8 anos de observação, 4 doentes faleceram, 9 foram submetidos a transplante cardíaco e 1 implantou um cardiodesfibrilhador para prevenção secundária de morte súbita. O diagnóstico molecular incidiu sobre as regiões codificantes de três genes distintos (MYH7, TNNT, PLN), tendo sido identificada uma mutação no exão 13 da troponina T cardíaca (K210del). Numa outra família foi possível identificar o *locus* associado à doença no cromossoma 7q22.3-31.1. Trinta e cinco doentes e dez familiares assintomáticos realizaram cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG, com o objectivo de caracterizar a actividade adrenérgica cardíaca. A maioria efectuou também ressonância magnética cardíaca, para avaliar a presença e o padrão de realce tardio, após administração de gadolíneo. Através da cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG documentámos a presença de hiperactividade adrenérgica cardíaca em 86% dos doentes e 60% dos familiares assintomáticos. A ressonância magnética objectivou a presença de fibrose miocárdica em 27% dos doentes, com diversos padrões de distribuição miocárdica.

Foi igualmente avaliada uma pequena amostra de doentes com miopatias esqueléticas, 75% com alterações genéticas identificadas. Dos 24 doentes observados, 25% apresentava disfunção ventricular esquerda ou remodelagem ventricular, incluindo doentes com as distrofias musculares de Duchenne, de Becker, das cinturas e com distrofia miotónica de Steinert.

Os contributos principais da nossa investigação nesta área foram:

- Aumentámos o portefólio de genes associados à doença, tendo sido identificado um novo *locus* no cromossoma 7;

- Corroborámos o mau prognóstico associado à presença da mutação K210del da troponina T, numa família com história de morte súbita e progressão para insuficiência cardíaca refractária em idades jovens;

- Documentámos, pela primeira vez, a presença de alterações na cintigrafia cardíaca com ^{123}I-MIBG, em doentes com miocardiopatia dilatada genética e seus familiares assintomáticos, colocando a hipótese deste exame vir a ser útil na estratificação de risco e eventualmente nas decisões terapêuticas a aplicar nestas famílias;

- Verificámos que o grau de hiperactividade adrenérgica na cintigrafia com ^{123}I-MIBG, associada à presença de realce tardio na ressonância magnética cardíaca, parece correlacionar-se com o estádio evolutivo da doença e,eventualmente, com o mau prognóstico dos indivíduos afectados;

- Confirmámos a elevada taxa de mortalidade dos indivíduos com miocardiopatia dilatada genética, apesar da optimização da terapêutica actualmente consignada para o tratamento da insuficiência cardíaca.

Numa perspectiva clínica, podemos afirmar que foram vários os ensinamentos resultantes da investigação de famílias com miocardiopatia dilatada genética, nos quais se incluem os nossos resultados. Enumeram-se, de seguida, alguns dos pontos considerados fundamentais:

- A obtenção de informações relativas aos antecedentes familiares é muito relevante para o reconhecimento da etiologia genética e idealmente, deve incluir a observação clínica de familiares em primeiro grau de indivíduos com doença considerada idiopática. Nos centros hospitalares que atendem estes doentes deve ter-se em conta este volume adicional de indivíduos, que pode exigir reavaliações periódicas;

- O facto da miocardiopatia dilatada "idiopática", mesmo em adultos, poder ser transmitida à descendência, deve ser tido em conta no aconselhamento familiar que é dado a estes indivíduos;

- Apesar da estimativa actual da prevalência da miocardiopatia dilatada familiar apontar para um valor inferior a 1:2000, e assim ser considerada uma doença rara, ainda não conhecemos a verdadeira frequência desta doença, uma vez que não dispomos de marcadores genéticos fidedignos, aplicáveis em larga escala. Por outro lado, existe a percepção de que a miocardiopatia, mesmo considerada secundária a outras etiologias, possa ser significativamente modulada por factores genéticos;

- A exposição a factores ambientais, como os agentes infecciosos, ou a modificação de estados fisiológicos, como a gravidez, podem ser os factores precipitantes das manifestações clínicas, e nestas circunstâncias a miocardiopatia dilatada deverá ser encarada como tendo uma origem "mista";

- Critérios meramente clínicos, como a história familiar e a forma de apresentação clínica, devem ser tidos em conta na decisão de implantar de cardiodesfibrilhadores em doentes com miocardiopatia dilatada familiar;

- Apesar da identificação da mutação causal poder, por si só, associar-se ao prognóstico, a aplicação do diagnóstico molecular na prática clínica encontra-se dificultada pela enorme diversidade de genes envolvidos e pela incapacidade de prever, na maioria das situações, a evolução clínica entre os portadores assintomáticos;

- Entre estes portadores assintomáticos, a detecção ou não de alterações ecocardiográficas e electrocardiográficas consideradas *minor*, não os isenta de risco de morte súbita ou de evolução para a miocardiopatia dilatada. Aguarda-se pela disponibilidade de métodos validados que permitam melhorar a estratificação de risco nestes indivíduos, nomeadamente que permitam a detecção precoce da expressão fenotípica da doença, e portanto, que condicionem a antecipação da terapêutica médica;

- A redução da incidência de morte súbita e de insuficiência cardíaca de causa genética implica necessariamente a observação de doentes com miopatias esqueléticas, o que exige uma estreita colaboração entre cardiologistas e neurologistas.

Summary and Conclusions

In the project underlying the present dissertation, the main objectives were the clinical and molecular characterization of families with genetic dilated cardiomyopathy.

The inclusion criterion of the index-cases was the presence of "idiopathic" dilated cardiomyopathy in two or more relatives in the same family.

From an initial sample of 370 patients with heart failure of several etiologies, followed in a cardiology department of a tertiary hospital, 50 patients with criteria of familial disease were identified. Of these, 94% presented with isolated dilated cardiomyopathy, without associated sub-phenotypes.

The medium age of the patients was of 40±12 years, with a male predominance (68%).

In the first medical visit, 90% were in NYHA class I or II.

During the 8 years of the study, 4 patients died, 9 were submitted to cardiac transplantation and 1 implanted a defibrillator, for secondary prevention of sudden cardiac death.

The molecular diagnosis included coding regions of three different genes (MYH7, TNNT, PLN) where a mutation in the exon 13 of the cardiac troponin T (K210del) has been identified.

In another family it was possible to identify the disease locus in the cromossome 7q22.3-31.1.

Aiming to characterize cardiac adrenergic activity, thirty five patients and ten asymptomatic relatives performed cardiac scintigraphy with I-123 metaiodobenzylguanidine (MIBG).

Most o them also performed cardiac magnetic resonance, in order to evaluate the presence of late hyperenhancement, after gadolinium administration.

Through the cardiac scintigraphy, we documented the presence of adrenergic hyperactivity in 86% of the patients and 60% of the asymptomatic relatives.

Cardiac magnetic resonance detected the presence of myocardial fibrosis in 27% of the patients, with different patterns of distribution.

A smaller sample of patients with skeletal myopathies was also evaluated and in 75% of the cases genetic alterations were identified. Of the 24 observed patients, including patients with Duchenne, Becker and limb-girdle muscular dystrophies and myotonic dystrophy of Steinert, 25% presented left ventricular dysfunction or remodeling.

The main contributions of our research in this field were:

- Increase of the variety of genes associated with the disease, having identified a new locus at the chromosome 7;

- Corroborated the bad prognosis associated to the presence of the K210del mutation in the troponin T, in a family with history of sudden cardiac death and heart failure progression at younger ages;

- Documented, for the first time, the presence of alterations in the cardiac scintigraphy with I-123-MIBG, in patients with genetic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives, discussing the role of this exam in the risk assessment and eventually in therapeutic decisions to be applied in these families;

- Verified that the degree of adrenergic hyperactivity in the scintigraphy with I-123-MIBG, associated with the presence of late hyperenhancement in the cardiac magnetic resonance, are correlated with disease progression stage, and eventually, with a worse prognosis of the affected individuals;

- Confirmed the high mortality rate in patients with genetic dilated cardiomyopathy, in spite of optimal heart failure medical therapy.

In a clinical perspective, it can be stated that diverse range of knowledge resulted from investigation of families with genetic dilated cardiomyopathy, in which our results are included. Below, some fundamental points are listed:

- Family history is very relevant for the recognition of the genetic etiology and ideally the clinical observation of first degree relatives of the "idiopathic" cases should be included in daily practice. Hospital centers that assist these patients should consider this additional volume of individuals, that could demand periodic evaluations;

- The fact that "idiopathic" cardiomyopathy, even in adults, could be transmitted to the descendence should be in mind in the family counseling that is given to these patients;

- In spite of the fact that the actual estimative of prevalence of familial dilated cardiomyopathy appears to be inferior to 1:2000, and that it is considered a rare disease, we still don`t know the real frequency of this illness, since we don't have trustworthy genetic markers, applicable in a large scale. Additionally, there is the perception that the cardiomyopathy, even considered secondary to other etiologies, can be significantly modulated by genetic factors.

- The exposition to environmental factors, as infectious agents, or the modification of physiological states, as pregnancy, could trigger factors for clinical manifestations and, in these circumstances the origin of dilated cardiomyopathy should be faced as "mixed".

- Exclusively clinical criteria, as family history and clinical presentation, should be taken in consideration in the decision of whether to implant or not a cardioverter defibrillator in patients with familial dilated cardiomyopathy;

- Despite the identification of a pathogenic mutation, the clinical application of the molecular diagnosis is hard due to the enormous diversity of the involved genes and to the incapacity of foreseeing, in most cases, the clinical evolution of the asymptomatic carriers;

- Among asymptomatic carriers, the detection or not of minor echocardiographic or electrocardiographic abnormalities, does not exclude sudden death risk or the progression to dilated cardiomyopathy. We are waiting for validated methods that could improve the risk assessment in these individuals, that would permit the early detection of phenotypic expression of the disease, and therefore, could anticipate medical therapeutic interventions;

- The reduction of the incidence of sudden death and heart failure of genetic cause implies necessarily the observation of patients with skeletal myopathies, which demands a close collaboration between cardiologists and neurologists.

Anexos

Familial dilated cardiomyopathy

ARTIGO DE REVISÃO

Miocardiopatia Dilatada Familiar [107]

ELISABETE MARTINS, JOSÉ SILVA CARDOSO, CASSIANO ABREU-LIMA
Serviço de Cardiologia do Hospital de São João, Porto
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto
Unidade de Investigação e Desenvolvimento Cardiovascular do Porto, Porto

Rev Port Cardiol 2002; 21 (12): 1487-1503

RESUMO

A miocardiopatia dilatada é uma doença do miocárdio caracterizada por dilatação ventricular e depressão da função sistólica, constituindo a causa mais frequente de insuficiência cardíaca. Recentemente, a miocardiopatia dilatada deixou de ser considerada uma doença exclusivamente esporádica e idiopática. De facto, segundo a Organização Mundial de Saúde, a designação de miocardiopatia dilatada inclui não apenas a forma idiopática, mas também, entre outras, a miocardiopatia isquémica e a hipertensiva. Estima-se que cerca 30 % dos indivíduos com miocardiopatia dilatada idiopática tem uma forma familiar de transmissão da doença. O padrão de transmissão hereditária mais frequente é o autossómico dominante, sendo menos comuns as formas associadas ao cromossoma X, autossómicas recessivas e de transmissão mitocondrial. Os genes ou loci responsáveis pela dilatação cardíaca são variados, codificando proteínas do sarcómero, do citoesqueleto ou mesmo da lâmina nuclear. As interacções das proteínas mutadas com outros factores como os agentes infecciosos ou o álcool, podem contribuir para a variedade de sinais e sintomas de apresentação desta forma de miocardiopatia. A Sociedade Europeia de Cardiologia propôs recentemente uma definição e um protocolo para o estudo da miocardiopatia dilatada familiar. A investigação genética das miocardiopatias dilatadas permitirá aprofundar o conhecimento da sua etiopatogenia e poderá contribuir para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

Palavras-Chave
Miocardiopatia dilatada; Genética; Miocardiopatia dilatada familiar

ABSTRACT

Familial Dilated Cardiomyopathy

Dilated cardiomyopathy is a disorder affecting heart muscle, characterized by ventricular dilation and reduced systolic function. It represents the most common cause of heart failure. Until recently, dilated cardiomyopathy was considered an exclusively sporadic and idiopathic disease. Now, as defined by the World Health Organization, cardiomyopathy includes not only the idiopathic form, but secondary ones such as ischemic or hypertensive. It is estimated that familial occurrence accounts for 30 % of cases of idiopathic dilated cardiomyopathy. The most common mode of inheritance is the autosomal dominant type. The X-linked, autosomal recessive and mitochondrial forms are less common. Different genes or loci are responsible for the cardiac dilatation, and code for sarcomeric, cytoskeleton and nuclear lamina proteins. The molecular interactions of the mutated proteins with factors such as infectious agents or alcohol could explain the variety of presenting signs and symptoms of this type of cardiomyopathy. Recently the European Society of Cardiology published a definition and a protocol for the study of familial dilated cardiomyopathies. Genetic research in the field of dilated cardiomyopathy can increase our understanding of its pathogenesis and lead to new treatment modalities for the disease.

Key words
Idiopathic dilated cardiomyopathy; Genetics; Familial dilated cardiomyopathy

Recebido para publicação: Junho de 2002 • Aceite para publicação: Julho de 2002
Received for publication: June 2002 • Accepted for publication: July 2002

INTRODUÇÃO

A miocardiopatia dilatada, uma doença do músculo cardíaco, caracterizada por dilatação ventricular e disfunção sistólica [1], representa uma causa frequente de insuficiência cardíaca e de transplante cardíaco, particularmente em doentes jovens, tendo uma prevalência de cerca de 36/100 000 nos EUA [2]. Até à década de 80 a miocardiopatia dilatada foi considerada uma doença esporádica, de etiopatogenia multifactorial, idiopática em cerca de 50 % dos casos. A descrição dos primeiros casos de miocardiopatia dilatada com transmissão familiar constituiu um ponto de viragem na forma como a miocardiopatia dilatada se pôde perspectivar, de forma idêntica ao que ocorreu com a síndroma de QT longo e a miocardiopatia hipertrófica. Actualmente considera-se que cerca 30 % dos casos de miocardiopatia dilatada, considerados idiopáticos, são familiares [3, 4], e este valor está certamente subvalorizado dado a escassez de marcadores clínicos disponíveis associados a esta condição.

Alguns estudos prospectivos que tentaram identificar parâmetros que permitissem distinguir os casos familiares dos casos esporádicos, mostraram que os primeiros têm idade mais baixa, tendem a ter valores de fracção de ejecção mais elevados e, em análises morfométricas de tecido cardíaco, fibrose miocárdica mais significativa [5].

De facto, o maior obstáculo ao diagnóstico das miocardiopatias dilatadas familiares prende-se com a variedade e a inespecificidade das manifestações clínicas. O espectro clínico é muito vasto e inclui não só dilatação ventricular sintomática, como disfunção ventricular esquerda assintomática, alterações da condução cardíaca, arritmias ventriculares e supraventriculares responsáveis respectivamente, pela ocorrência de morte súbita e de acidente vascular cerebral. A dificuldade da identificação das formas familiares de miocardiopatia dilatada deve-se não só a esta diversidade clínica, aliada à pequena penetrância dos genes envolvidos [6] (ver glossário), mas também à atribuição da dilatação cardíaca a outras causas, sobretudo nos doentes idosos e ao estudo insuficiente dos familiares.

À luz dos conhecimentos actuais, a miocardiopatia dilatada surge como uma doença clínica e molecularmente heterogénea, em que a dilatação ventricular pode ser a expressão final de mutações em vários genes distintos, maioritariamente de genes que codificam proteínas do citoesqueleto e que pode ser modelada por vários outros genes modificadores, nomeadamente os que

INTRODUCTION

Dilated cardiomyopathy, a disease of cardiac muscle characterized by ventricular dilatation and systolic dysfunction [1], is a common cause of heart failure and heart transplantation, particularly in young patients, with a prevalence of around 36 per 100 000 in the USA [2]. Until the 1980s, dilated cardiomyopathy was considered a sporadic disease, of multifactorial etiopathogenesis, and idiopathic in approximately 50 % of cases. The description of the first cases of familial transmission of this disease was a turning point in the way dilated cardiomyopathy was viewed, as had happened with long QT syndrome and hypertrophic cardiomyopathy. Around 30 % of cases of dilated cardiomyopathy considered idiopathic are now thought to be familial [3, 4], a figure that is certainly an underestimate given the lack of available clinical markers for this condition.

Various prospective studies designed to identify parameters that could be used to distinguish familial from sporadic cases have shown that the former patients are younger, and they tend to have higher ejection fractions and more significant myocardial fibrosis on morphometric analysis of cardiac tissue [5].

The greatest obstacle to diagnosis of familial dilated cardiomyopathy is the variety and non-specific nature of its clinical manifestations. The clinical spectrum is very wide and includes not only symptomatic ventricular dilatation but also asymptomatic left ventricular dysfunction, abnormalities in cardiac conduction, and ventricular and supraventricular arrhythmias that can cause sudden death and stroke respectively. The difficulty in identifying familial forms of dilated cardiomyopathy is due not only to this clinical diversity, together with the limited penetrance (see Glossary) of the genes involved [6], but also to cardiac dilatation being attributed to other causes, especially in the elderly, and to inadequate study of family history.

In the light of current knowledge, dilated cardiomyopathy is a clinically and molecularly heterogeneous disease, in which ventricular dilatation may be the final expression of mutations in several different genes, mainly those that code for cytoskeleton proteins, and that may be modulated by various other modifying genes, particularly those that determine immune responses [5].

IDENTIFICATION OF FAMILIAL DILATED CARDIOMYOPATHY

a) *Diagnostic criteria for familial dilated cardiomyopathy*

determinam respostas imunológicas [5].

IDENTIFICAÇÃO DAS MIOCARDIOPATIAS DILATADAS FAMILIARES

a) Critérios de diagnóstico de miocardiopatia dilatada familiar

A Sociedade Europeia de Cardiologia propôs recentemente critérios para a definição de miocardiopatia dilatada familiar. A presença destes deve orientar para o estudo clínico e molecular das famílias envolvidas. A miocardiopatia dilatada é definida por estes autores pela presença de uma fracção de ejecção <0,45 ou fracção de encurtamento <0,25 e diâmetro telediastólico do ventrículo esquerdo >117 % do previsto para a idade e superfície corporal [6]. Nos doentes com miocardiopatia dilatada idiopática propõem-se como critérios de diagnóstico de miocardiopatia dilatada familiar a presença de dois ou mais indivíduos afectados na família, ou de um familiar de 1.º grau com história bem documentada de morte súbita inexplicada antes dos 35 anos de idade. São critérios de exclusão do diagnóstico de miocardiopatia dilatada idiopática e portanto de miocardiopatia dilatada familiar a presença de: *a*) pressão arterial persistentemente >160/100 mmHg e/ou com lesão de órgãos alvo, *b*) doença coronária significativa, definida como obstrução superior a 50 % do lume dos vasos principais, *c*) história de consumo elevado de álcool (>40 g/dia na mulher e >80 g/dia no homem) por mais de 5 anos, com remissão da miocardiopatia dilatada ao fim de 6 meses de abstinência alcoólica, *d*) doença cardíaca congénita, e) arritmias supraventriculares rápidas e sustentadas, *f*) cor *pulmonale*, *g*) doença pericárdica, *h*) doenças sistémicas.

É de notar que outros autores utilizaram, em estudos de prevalência de miocardiopatia dilatada familiar, outros critérios de exclusão, nomeadamente a presença de doença valvular [5, 7].

A história de miocardite não é considerada critério de exclusão. A auto-imunidade e, portanto, a susceptibilidade individual para inflamação cardíaca por agentes microbianos parece ser um factor importante, até pela presença de anticorpos anti-miocitários nos casos de miocardiopatia dilatada familiar [5]. Assim, a predisposição para doenças víricas pode ser considerada uma variante de doença cardíaca hereditária [8, 9]. De igual forma, alguns autores consideram relevante para o diagnóstico de miocardiopatia dilatada familiar a presença de miocardiopatia em doentes com Diabetes *Mellitus* tipo 2 ou colite ulcerosa pelo facto de já se conhecer a predisposição

The European Society of Cardiology recently proposed criteria for the definition of familial dilated cardiomyopathy. Fulfillment of these criteria should be followed by the clinical and molecular study of the families involved. According to these authors, dilated cardiomyopathy is defined by the presence of an ejection fraction of <0.45 or fractional shortening of <0.25 and a left ventricular end-diastolic diameter of >117 % of that expected for the patient's age and body surface area [6]. In patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, the proposed diagnostic criteria for the familial form of the disease are the existence of two or more affected family members, or of one first-degree relative with a documented history of unexplained sudden death before 35 years of age. Exclusion criteria for a diagnosis of idiopathic, and hence familial, dilated cardiomyopathy are: *a*) blood pressure persistently >160/100 mmHg and/or target organ damage; *b*) significant coronary artery disease, defined as more than 50 % obstruction of the lumen of the main vessels; *c*) history of high alcohol consumption (>40 g/day for women and >80 g/day for men) for more than 5 years, with remission of dilated cardiomyopathy after 6 months of abstinence from alcohol; *d*) congenital heart disease; *e*) rapid and sustained supraventricular arrhythmias; *f*) cor pulmonale; *g*) pericardial disease; and *h*) systemic diseases.

It should be noted that in studies on the prevalence of familial dilated cardiomyopathy, some authors have used other exclusion criteria, particularly the presence of valve disease [5, 7].

A history of myocarditis is not considered an exclusion criterion. Autoimmunity, and hence an individual's susceptibility to cardiac inflammation of microbial origin, appears to be an important factor, including the presence of anti-myocyte antibodies in cases of familiar dilated cardiomyopathy [5]. Thus, a predisposition for viral diseases can be considered a variant of hereditary heart disease [8, 9]. In the same way, some authors consider the presence of cardiomyopathy in patients with type 2 diabetes mellitus or of ulcerative colitis relevant for a diagnosis of familiar dilated cardiomyopathy, since there is a known genetic predisposition for these two conditions [7].

b) *Diagnostic procedure in familiar dilated cardiomyopathy*

1. *Clinical and laboratory assessment of the proband* – Once a possible case of familial dilated cardiomyopathy has been identified, the basic investigation of the proband, that is the individual patient who

genética para estas duas condições [7].

b) Procedimento diagnóstico nas miocardiopatias dilatadas familiares

1. *Avaliação clínica e laboratorial do probando* – Uma vez identificado um caso de miocardiopatia dilatada possivelmente familiar, a investigação básica do probando, isto é, do indivíduo doente a partir do qual é iniciado o estudo familiar, inclui exame neuromuscular cuidadoso, radiografia torácica, ecocardiograma, electrocardiograma, Holter, prova de esforço e bioquímica com doseamento de creatinocinase. Os indivíduos com mais de 35 anos devem ser submetidos a coronariografia [6].

2. *Avaliação clínica e laboratorial dos familiares* – Deverá também ser realizado o estudo dos elementos familiares através de exame físico, electrocardiograma e ecocardiograma [6].

Os indivíduos da família devem ser posteriormente classificados do ponto de vista fenotípico em afectados, não afectados ou em portadores de fenótipo desconhecido [6]. Esta última designação inclui as crianças com menos de 16 anos, dado não ser possível excluir a futura manifestação clínica da doença.

3. *Árvores genealógicas* – A construção da árvore genealógica, principalmente em famílias numerosas, pode permitir compreender o padrão de transmissão hereditária [10]. Em linhas gerais, se o pai transmite a doença a filhos e a filhas e a doença aparece em múltiplas gerações, à partida será uma doença autossómica dominante [10], em que a presença de um único gene mutado basta para produzir o fenótipo.

Se for a mãe a transmitir a doença aos filhos de ambos os sexos deve considerar-se a possibilidade de se tratar de doença mitocondrial, sobretudo se os filhos rapazes não transmitirem a doença [10]. Isto deve-se ao facto da transmissão do ADN mitocondrial ocorrer apenas através dos gâmetas femininos. Se os elementos afectados forem exclusivamente do sexo masculino a doença estará provavelmente associada ao cromossoma X, mas o facto de existirem mulheres afectadas não exclui esta possibilidade, dado que nestas mulheres pode ocorrer inactivação predominante do cromossoma X «normal» (sem a mutação), hipótese designada por *lionismo* miocárdico [10]. A história de consanguinidade favorece a hipótese de se tratar de uma doença recessiva, dado que aumenta a probabilidade de homozigotia para um gene mutante pouco frequente [11].

4. *Biópsia endomiocárdica* – A biópsia endomiocárdica quando efectuada, pode permitir o diagnóstico de miocardite

triggered the familial study, should include careful neuromuscular examination, chest X-ray, echocardiogram, electrocardiogram, Holter monitoring, and exercise and biochemical testing with measurement of creatine kinase. Individuals over 35 years of age should undergo coronary angiography [6].

2. *Clinical and laboratory assessment of family members* – These should also undergo physical examination, electrocardiogram and echocardiogram [6].

Family members should subsequently be classified in terms of phenotype as affected, unaffected, or not known [6]. The latter classification would include all children under 16 years of age, since it is impossible to exclude clinical manifestation of the disease at a later date.

3. *Genealogical trees* – Drawing up a genealogical tree, particularly for a large family, may enable the pattern of hereditary transmission to be detected [10]. In general, if the father transmits the disease to both sons and daughters and it appears in several generations, then the disease will be autosomal dominant [10], with the presence of a single mutated gene being sufficient to produce the phenotype.

If it is the mother who transmits the condition to both sons and daughters, then the possibility must be considered that it is mitochondrial in origin, especially if the sons do not transmit the disease [10], since transmission of mitochondrial DNA only occurs through female gametes. If only male family members are affected, the disease is probably X-linked; however, if there are also affected females this possibility is not necessarily excluded, since in these women there may have been predominant inactivation of the "normal" X chromosome (without the mutation), a phenomenon called myocardial lyonization [10]. A history of consanguinity would support the hypothesis that it is a recessive disease, given that it increases the likelihood of homozygosis of a rare gene mutation [11].

4. *Endomyocardial biopsy* – An endomyocardial biopsy can lead to a diagnosis of viral myocarditis or identify a cause of dilated cardiomyopathy that contraindicates possible heart transplantation, as well as contributing to a molecular diagnosis of familial dilated cardiomyopathy. For example, in dilated cardiomyopathy caused by mutations in the dystrophin gene [12], examination of myocardial tissue with an electron microscope will show prominent lesions of the sarcolemma that are non-specific to this condition [10]; however, assessment by immunocytochemistry using antibodies against different domains of the

vírica, pode identificar causas de miocardiopatia dilatada que contra-indiquem a eventual transplantação cardíaca e também pode orientar no sentido do diagnóstico molecular das miocardiopatias dilatadas familiares. Assim, por exemplo, nos casos de miocardiopatia dilatada devida a mutações do gene da distrofina [12], a observação do tecido miocárdico por microscopia electrónica mostrará lesões proeminentes do sarcolema, não específicas desta situação [10]; no entanto, a avaliação por imunocitoquímica utilizando anticorpos contra diferentes domínios da proteína distrofina, em amostras congeladas de tecido miocárdico, permitirá documentar alterações na expressão da proteína, o que justificará a pesquisa subsequente de mutações no gene respectivo a partir de leucócitos do sangue periférico [12].

No caso das doenças mitocondriais a microscopia electrónica mostrará mitocôndrias alteradas, gigantes, com inclusões intramitocondriais [10]. As reacções histoenzimáticas podem demonstrar a diminuição da actividade enzimática [13].

5. *Análise de "linkage" genético* – Nos casos de miocardiopatia dilatada familiar, em famílias suficientemente numerosas, e em que não existe qualquer evidência do envolvimento de um determinado gene, é possível tentar uma identificação do *locus* através da análise de *linkage* genético [6]. O termo *linkage* genético refere-se à tendência de dois *loci*, no mesmo cromossoma, para serem herdados conjuntamente. Quanto mais próximos estiverem, maior o seu *linkage* e menor a frequência de recombi-nação meiótica entre eles. Na análise de *linkage* analizam-se as frequências de recombinação de marcadores com localizações cromossó- micas conhecidas, (ex. micro-satélites), para determinar o *locus* cromossómico associado à presença de miocardiopatia dilatada [14].

6. *"Screening" de mutações* – Nas famílias menos numerosas e nos casos esporádicos de miocardiopatia dilatada, sem história familiar, é possível proceder-se à pesquisa de mutações em genes descritos noutras famílias. Tal pesquisa deverá ser orientada pelas características clínicas, marcadores morfológicos e/ou imunocitoquímicos, de forma a limitar o espectro da análise genética [10]. Esta abordagem poderá revelar a presença de mutações *de novo* desses mesmos genes ou a presença de polimorfismos associados a risco aumentado de desenvolvimento de miocardiopatia dilatada [15, 16].

dystrophin protein, in frozen samples of myocardial tissue, will enable alterations in the expression of the protein to be detected, which will indicate a subsequent search for mutations in the corresponding gene based on leukocytes from peripheral blood [12].

In the case of mitochondrial disorders, electron microscopy will show giant, abnormal mitochondria, with intramitochondrial inclusions [10]. Histological and enzymatic reactions can demonstrate a reduction in enzyme activity [13].

5. *Analysis of genetic linkage* – In cases of familial dilated cardiomyopathy, when there is no evidence that a particular gene is involved, it may be possible in sufficiently large families to identify the locus through analysis of genetic linkage [6]. This term refers to the tendency for two loci on the same chromosome to be inherited together. The closer they are, the greater the degree of linkage and the rarer the occurrence of meiotic recombination between them. In linkage analysis, the frequency of recombination of markers with known chromosome locations (for example micro-satellites) is analyzed, in order to determine the locus on the chromosome associated with the presence of dilated cardiomyopathy [14].

6. *Screening for mutations* – In smaller families and in cases of sporadic dilated cardiomyopathy with no family history, it is possible to search for gene mutations that have been described in other families. This search should be guided by clinical characteristics and morphological and/or immunocytochemical markers so as to limit the range of genetic analysis [10]. This approach may reveal the presence of novel mutations in these genes or the presence of polymorphisms associated with increased risk for developing dilated cardiomyopathy [15, 16].

CLINICAL PATTERNS OF FAMILIAL DILATED CARDIOMYOPATHY

The familial forms of dilated cardiomyopathy may have various patterns of hereditary transmission [11], of which five subtypes have already been identified. The most common is autosomal dominant, accounting for more than 50 % of cases, followed by autosomal recessive (<20 % of cases) [4], X-linked, maternal transmission through mitochondrial DNA, and finally those cases yet to be classified since the chromosome regions responsible for the disease have not been identified. Despite the clinical and genetic heterogeneity of familial dilated cardiomyopathy, within the above sub- types, certain phenotype-genotype correlations or patterns have

PADRÕES CLÍNICOS DE MIOCARDIOPATIA DILATADA FAMILIAR

As formas familiares de miocardiopatia dilatada podem ter vários padrões de transmissão hereditária [11], estando actualmente identificados 5 subtipos: a forma mais comum é a autossómica dominante correspondendo a mais de metade dos casos, seguida pelas formas autossómica recessiva (<20 % dos casos) [4], a miocardiopatia dilatada ligada ao cromossoma X, a de transmissão materna, por envolvimento do ADN mitocondrial, e os casos ainda não classificados por não terem sido identificadas as regiões cromossómicas responsáveis pela doença. Apesar da heterogeneidade clínica e genética das miocardiopatias dilatadas familiares, e dentro destes subtipos, foi possível identificar algumas correlações fenótipo-genótipo ou padrões de miocardiopatia dilatada familiar em que a presença de algumas particularidades clínicas ou morfológicas pode antecipar o tipo de gene envolvido.

a) Formas autossómicas dominantes com envolvimento cardíaco isolado (sem miopatia esquelética) e sem lesão do sistema de condução. Neste tipo de miocardiopatia dilatada familiar foram identificadas alterações genéticas em *loci* dos cromossomas 9q13-22 [17], 1q32 [18], 10q21-23 [19], 2q31 [20], 15q14 (gene da actina) [21] e 2q35 (gene da desmina) [22].

A apresentação fenotípica destas formas pode incluir a chamada «*mildly dilated cardiomyopathy*» (caracterizada por disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, mantendo estes diâmetros normais), o prolapso mitral, a presença de alterações da contractilidade segmentar do ventrículo esquerdo, ou mesmo de aneurisma do ventrículo esquerdo [5, 7]. Estas últimas alterações induzem, por vezes erradamente, o diagnóstico de miocardiopatia isquémica e podem apenas traduzir alterações em genes que regulam o desenvolvimento cardíaco [7].

Neste grupo de miocardiopatias dilatadas é também frequente a presença de auto-anticorpos anti-miocárdio. Esta presença, que também pode ocorrer em indivíduos não afectados, chega a atingir 70 % dos afectados. A presença destes anticorpos em doentes com miocardiopatia dilatada idiopática sugere a activação do sistema imunológico o qual, apesar de não ser directamente patogénico, poderá servir como um marcador da ocorrência de miocardiopatia dilatada entre os familiares [5].

b) Formas autossómicas dominantes com envolvimento been identified, in which the presence of particular clinical or morphological characteristics may predict the type of gene involved.

a) Autosomal dominant forms with isolated cardiac involvement (without skeletal myopathy) and with no damage to the conduction system – In this type of familial dilated cardiomyopathy genetic alterations have been identified at loci on chromosomes 9q13-22 [17], 1q32 [18], 10q21-23 [19], 2q31 [20], 15q14 (actin gene) [21] and 2q35 (desmin gene) [22].

The phenotypic presentation of these forms may include mildly dilated cardiomyopathy (characterized by left ventricular systolic dysfunction, with normal diameter being maintained), mitral valve prolapse, abnormalities in left ventricular segmental contractility or even left ventricular aneurysm [5, 7]. The latter alterations sometimes lead to an incorrect diagnosis of ischemic cardiomyopathy, when in fact they may only reflect changes in genes that regulate cardiac development [7].

Anti-myocardial antibodies are also frequently present in these forms of dilated cardiomyopathy, occurring in up to 70 % of those affected; they can also occur in unaffected individuals. The presence of these antibodies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy suggests that the immune system has been activated which, while not pathogenic *per se*, may serve as a marker of the occurrence of dilated cardiomyopathy among family members [5].

b) Autosomal dominant forms with isolated cardiac involvement and with damage to the cardiac conduction system – These account for around 3 % [5] of cases of familial dilated cardiomyopathy, and loci have been identified on chromosomes 1p1-1q1 [23], 3p22-p25 [24], and 2q14-q22 [25]. The clinical evolution tends to occur in relatively distinct phases. The onset of the disease is usually characterized by sinus bradycardia, increased PR, right bundle branch block and frequent supraventricular premature beats. Later on, 2nd- and 3rd-degree atrioventricular block, left bundle branch block, and atrial flutter or fibrillation occur, with ventricular arrhythmias at a more advanced stage. At this stage, episodes of syncope are frequent, requiring implantation of a pacemaker, as are thromboembolic episodes and even sudden death. Cardiac dilatation occurs after alterations in cardiac conduction [5, 7].

c) Autosomal dominant familial cardiomyopathy associated with skeletal myopathy, with or without damage to the conduction system – In

cardíaco isolado e com lesão do sistema de condução cardíaco. Nestes casos, que correspondem a cerca de 3% [5] dos casos de miocardiopatia dilatada familiar, foram identificados *loci* nos cromossomas 1p1-1q1 [23], 3p22-p25 [24], 2q14-q22 [25]. A evolução clínica tende a ocorrer em fases relativamente distintas. O início da doença caracteriza-se habitualmente pela presença de bradicardia sinusal, PR aumentado, bloqueio de ramo direito e extra-sístoles supraventriculares frequentes. Ulteriormente ocorrem bloqueios auriculoventriculares do 2.º e 3.º graus, bloqueio do ramo esquerdo, *flutter* ou fibrilhação auricular e, numa fase mais avançada, arritmias ventriculares. Neste contexto, são frequentes os episódios de síncope, com necessidade de colocação de *pacemaker*, os episódios tromboembólicos, e mesmo a morte súbita. A dilatação cardíaca ocorre posteriormente às alterações da condução cardíaca [5, 7].

c) Miocardiopatia familiar autossómica dominante associada a miopatia esquelética, com ou sem lesão do sistema de condução. Nestes casos, com uma frequência de cerca de 8% [5], foram identificados *loci* nos cromossomas 6q23 [26] e 1q11-21 (*lamina A/C*) [27]. Nestas miocardiopatias familiares o característico aumento dos valores da isoforma muscular da creatinocinase, considerado um marcador sensível de lesão muscular, pode não estar presente ou o seu valor pode variar no mesmo indivíduo em fases distintas da doença [5]. Este grupo de doentes pode apresentar um espectro de manifestações clínicas que se sobrepõem às das distrofias musculares clássicas, nomeadamente miopatias semelhantes à de Emery-Dreifuss ou das cinturas [27]. A miopatia associada à miocardiopatia dilatada resultante da mutação no *locus* 6q23 surge habitualmente no adulto e tende a ocorrer posteriormente às alterações cardíacas. É de realçar que nas distrofias musculares a dilatação cardíaca é considerada um evento secundário [28].

d) Miocardiopatia dilatada familiar associada ao cromossoma X. Este grupo engloba os casos devidos a mutações nos genes da distrofina (*loci* Xp21) [12, 29] e da tafazina (*loci* Xq28) [30].

Nas miocardiopatias dilatadas devidas a mutações na distrofina, predominam os homens; a doença é habitualmente diagnosticada na juventude e tem progressão rápida [7]. O fenótipo cardíaco é predominante, ao contrário das distrofias musculares de Duchenne e de Becker que também são causadas por mutações do gene da distrofina. A miopatia esquelética é clinicamente irrelevante detectando-se apenas um

these cases, accounting for around 8% [5], loci on chromosomes 6q23 [26] and 1q11-21 (lamin A/C) [27] have been identified. In this form of the disorder, the characteristic rise in values of the muscle isoform of creatine kinase, considered a sensitive marker of muscle damage, may not be present or its level may vary in the same individual at different stages of the disease [5]. This group of patients may present a range of clinical manifestations that are similar to those of classic muscular dystrophies, notably myopathies like Emery-Dreifuss or limb-girdle muscular dystrophies [27]. The myopathy associated with dilated cardiomyopathy resulting from a mutation at locus 6q23 usually appears in adulthood and tends to occur after cardiac alterations. It should be noted that in muscular dystrophies, cardiac dilatation is considered a secondary event [28].

d) X-linked familial dilated cardiomyopathy – This group includes cases caused by mutations in the dystrophin (locus Xp21) [12, 29] and tafazzin (locus Xq28) [30] genes.

Dilated cardiomyopathy caused by mutations in the dystrophin gene occur predominantly in men; the disease is generally diagnosed in childhood or adolescence and progresses rapidly [7]. The cardiac phenotype is predominant, in contrast to Duchenne and Becker muscular dystrophies, which are also caused by mutations in the dystrophin gene. Skeletal myopathy is clinically irrelevant, with only a rise in the muscle isoform of creatine kinase being detected [10]. As noted above, female carriers of the mutation may be affected, but the disease appears later in life and evolves more slowly.

Mutations at the tafazzin locus are mainly related to cases of infantile dilated cardiomyopathies, which include Barth syndrome, isolated cardiac dilatation, and cases of X-linked endocardial fibroelastosis [30]. Mutations at this locus also appear to be associated with a particular form of cardiomyopathy called *isolated noncompaction of the left ventricular myocardium* [31]. This entity is characterized by ventricular dilatation with marked trabeculation of the left ventricle, and episodes of systemic embolization and ventricular arrhythmias are common [32].

e) Mitochondrial cardiomyopathies are cases of dilated cardiomyopathy caused by mutations in mitochondrial genes coding for proteins that are crucial for the cell's energy production [13, 33]. Mitochondria are the only cytoplasmic organelles that possess their own DNA. Molecules of normal and mutated mitochondrial DNA may coexist in patients' tissues, a situation termed

aumento da isoforma muscular da creatinocinase [10]. As mulheres, portadoras da mutação, podem ser afectadas, como já referido, mas a doença manifesta-se mais tarde e evolui mais lentamente.

As mutações no *locus* da tafazina relacionam-se sobretudo com casos de miocardiopatia dilatada da infância onde se incluem o síndrome de Barth, a dilatação cardíaca isolada e casos de fibroelastose endocárdica ligada ao cromossoma X [30]. Uma mutação neste *locus* parece também associar-se a uma forma particular de miocardiopatia designada por *não compactação isolada do ventrículo esquerdo* [31]. Esta entidade caracteriza-se por dilatação ventricular com trabeculação proeminente do ventrículo esquerdo, sendo frequentes os episódios de embolização sistémica e as arritmias ventriculares [32].

e) *As miocardiopatias mitocondriais,* correspondem aos casos de miocardiopatia dilatada devidos a mutações dos genes mitocondriais que codificam proteínas cruciais para a produção energética da célula [13, 33]. As mitocôndrias são os únicos organelos do citoplasma a possuir ADN próprio. Nos tecidos dos doentes podem coexistir moléculas de ADN mitocondrial normal ou mutado, situação designada por heteroplasmia. O fenótipo clínico pode variar de tecido para tecido dependendo da proporção de ADN normal/mutado [13]. Este material genético é herdado apenas a partir dos gâmetas femininos, isto é, o zigoto só possui mitocondrias provenientes do óvulo. No entanto, as alterações do ADN mitocondrial podem também associar-se a defeito do ADN nuclear, logo um padrão de transmissão here- ditária distinto não exclui a presença de doença mitocondrial [10]. A miocardiopatia mitocondrial associa-se frequentemente a miopatia esquelética, encefalopatia e surdez neurosensorial [34], devidas às necessidades energéticas quer tecido muscular e encefálico, quer do aparelho coclear [13].

f) Outros padrões. Recentemente foram descritas formas isoladas de miocardiopatia dilatada em que uma das características é a rápida progressão da doença, sendo frequentes a miocardiopatia *peri-partum* e a morte súbita ou a necessidade de transplante cardíaco em doentes jovens [35]. Algumas destas famílias têm mutações em genes de proteínas sarcoméricas como é o caso da cadeia pesada b da miosina (14q12) e da troponina T (1q3) [35]. Anteriormente considerava-se que este conjunto de genes apenas estavam em causa nos casos de miocardiopatia hipertrófica.

As formas de miocardiopatia dilatada heteroplasmy. The clinical phenotype may vary from tissue to tissue depending on the ratio of normal to mutated DNA [13]. This genetic material is inherited only from female gametes, as the zygote only receives mitochondria from the ovum. However, abnormalities in mitochondrial DNA may also be associated with defects in nuclear DNA, and therefore a different pattern of hereditary transmission does not exclude the possibility of mitochondrial disease [10]. Mitochondrial cardiomyopathy is frequently associated with skeletal myopathy, encephalopathy and sensorineural hearing loss [34], due to the energy requirements of both muscle and brain tissue and of the cochlear apparatus [13].

f) Other patterns – Isolated forms of dilated cardiomyopathy have recently been described. Rapid progression of the disease is one characteristic and peripartum cardiomyopathy and sudden death are common, as is the need for heart transplantation in young patients [35]. Some of these families have mutations in sarcomeric protein genes, such as those for b-myosin heavy chain (14q12) and troponin T (1q3) [35]. This group of genes had previously been thought to be involved only in cases of hypertrophic cardiomyopathy.

Forms of familial dilated cardiomyopathy with autosomal recessive inheritance generally affect younger people, of both sexes, and progress more rapidly to death or heart transplantation [5].

Other distinct forms of familial dilated cardiomyopathy have been described, including those with damage predominantly of the right ventricle, as in right ventricle arrhythmogenic cardiomyopathy (or dysplasia), for which there is a family history in 30% of cases [36], and familial Uhl anomaly [37].

PATHOGENESIS OF FAMILIAL DILATED CARDIOMYOPATHY: GENES AND PROTEINS

Understanding the etiopathogenesis of hereditary cardiomyopathies requires a knowledge of the proteins that make up the sarcomere and cytoskeleton, as well as the currently known ways in which the signal is transmitted at the inter and intracellular level.

a) Basic components of myocytes: a summary review

Among the basic components of myocytes, the most important are the sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, mitochondria, sarcomeres, cytoskeleton, and the nuclear apparatus.

The sarcolemma is responsible for maintaining cellular integrity and for ion exchange between the cell and the

familiar com padrão de transmissão autossómico recessivo, caracterizam-se habitualmente por afectar indivíduos jovens, de ambos os sexos, e a progredirem de forma mais rápida para a morte ou transplante cardíaco [5].

Outros casos particulares de miocardiopatia dilatada familiar já descritos correspondem a formas com lesão predominante do ventrículo direito, como a miocardiopatia (ou displasia) arritmogénica do ventrículo direito, em que existe uma história familiar em cerca de 30 % dos casos [36], e a anomalia familiar de Uhl [37].

PATOGÉNESE DA MIOCARDIOPATIA DILATADA FAMILIAR: GENES E PROTEÍNAS

A compreensão da etiopatogenia das miocardiopatias hereditárias envolve o conhecimento das proteínas que constituem o sarcómero e o citoesqueleto para além das vias actualmente conhecidas de tradução de sinal a nível inter e intracelular.

a) Componentes fundamentais dos miócitos: revisão sumária

Entre os componentes fundamentais dos miócitos ressaltam pela sua importância, o sarcolema, o retículo sarcoplasmático, as mitocôndrias, os sarcómeros, o citoesqueleto e o aparelho nuclear.

O sarcolema é responsável pela manutenção da integridade celular, pelas trocas iónicas entre a célula e o meio extracelular, entre outros fenómenos. É nele que se localizam muitos receptores e onde se iniciam as cadeias de tradução de sinal para o interior do miócito [38].

O retículo sarcoplasmático é fundamentalmente responsável pelo acoplamento activação-contracção, sendo o regulador principal dos fluxos de cálcio de e para o citoplasma [38].

As mitocôndrias, entre outras funções, são responsáveis pelos processos de fosforilação oxidativa que fornecem energia necessária à contracção celular. Os sarcómeros são as unidades responsáveis por essa contracção e são constituídos pelos elementos contrácteis de actina, miosina e um conjunto de proteínas reguladoras da contracção como as troponinas I, C e T e a tropomiosina [36].

Finalmente, o citoesqueleto é constituído por um conjunto de proteínas estruturais, que para além de manterem as relações espaciais dos organelos e a estrutura interna do miócito, participam também nos processos de tradução dos sinais para o interior da célula. Entre estas proteínas incluem-se a distrofina, e a desmina [38].

extracellular matrix, among other functions. It contains many receptors and it is here that the chains that transmit signals to the interior of the myocyte begin [38].

The sarcoplasmic reticulum is essential in activation-contraction coupling, which is the main regulator of calcium flow to and from the cytoplasm [38].

Among other functions, the mitochondria are responsible for oxidative phosphorylation, which provides the energy required for cellular contraction. The sarcomeres are the units actually responsible for this contraction and are composed of the contractile elements actin and myosin and a group of contraction regulatory proteins including troponin I, C and T and tropomyosin [36].

Finally, the cytoskeleton is made up of a group of structural proteins that, besides maintaining the spatial relationships between the organelles and the internal structure of the myocyte, also participate in the processes of signal transmission to the interior of the cell. These proteins include dystrophin and desmin [38].

b) Genes associated with different forms of familial dilated cardiomyopathy

It is known that familial dilated cardiomyopathy may be associated with mutations in genes that code for various types of cellular proteins such as those of the cytoskeleton (dystrophin and desmin), sarcomere (actin, myosin and troponin T), and the nuclear membrane (lamin A/C), as well as for tafazzin and genes coded for by mitochondrial DNA.

1. *Dystrophin* (Xp21) is a cytoskeleton protein located under the sarcolemma. It stabilizes the sarcomere by linking actin to the extracellular matrix via a group of transmembrane glycoproteins called the dystroglycan complex [36]. Dystrophin mutations are responsible not only for Duchenne and Becker muscular dystrophies, but also for X-linked dilated cardiomyopathy. In the latter, as already mentioned, cardiomyopathy is predominant and abnormalities in skeletal muscle are mild or absent. Frequently, the dystrophin gene mutations responsible for dilated cardiomyopathy are deletions or mutations in the promoter region and in primary exons [29] or at other locations (Becker type) [12]. Depending on the location of the mutation, abnormalities may occur in the quantity of protein expressed or in its conformation, at locations that are essential for cardiac myocyte function [36].

2. *The dystroglycan complex* establishes the link between dystrophin

b) Genes associados às várias formas de miocardiopatia dilatada familiar

Sabe-se que a miocardiopatia dilatada familiar pode associar-se a mutações em genes que codificam variados tipos de proteínas celulares como proteínas do citoesqueleto (distrofina e desmina), do sarcómero (actina, miosina e troponina T), da membrana nuclear (lâmina A/C), para além da tafazina e dos genes codificados pelo ADN mitocondrial.

1. *A distrofina* (Xp21) é uma proteína do citoesqueleto que tem uma localização subsarcolémica. Estabiliza o sarcómero unindo a actina à matriz extracelular através de um conjunto de glicoproteínas transmembranares designadas por *complexo glicoproteico associado à distrofina*[36]. As mutações da distrofina são responsáveis não só pelas distrofias musculares de Duchenne e Becker, mas também pela miocardiopatia dilatada ligada ao cromossoma X. Nesta última situação, como já foi referido, a

and a 2-laminin – an extracellular matrix protein – and is made up of multiple proteins coded for by autosomal genes such as a- and b-dystroglycan, a-, b-, g-, and d-sarcoglycan, and a- and b-syntrophin[36, 39]. Most primary sarcoglycan disorders are associated with muscular dystrophies. However, secondary defects are also found in these proteins in some types of dystrophin gene mutation, as is the case with the mutation in exon 29, which results in secondary defects in the b- and d-sarcoglycan of cardiac muscle[39]. In the BIO 14.6 animal model, a deletion in d-sarcoglycan causes muscular dystrophy associated with dilated cardiomyopathy, which suggests that mutations in these proteins may be directly implicated in the genesis of some cases of familial dilated cardiomyopathy[39].

3. *Desmin* (2q35) surrounds the actin filaments of the Z bands, joining them to the plasma membrane, and bonds to the

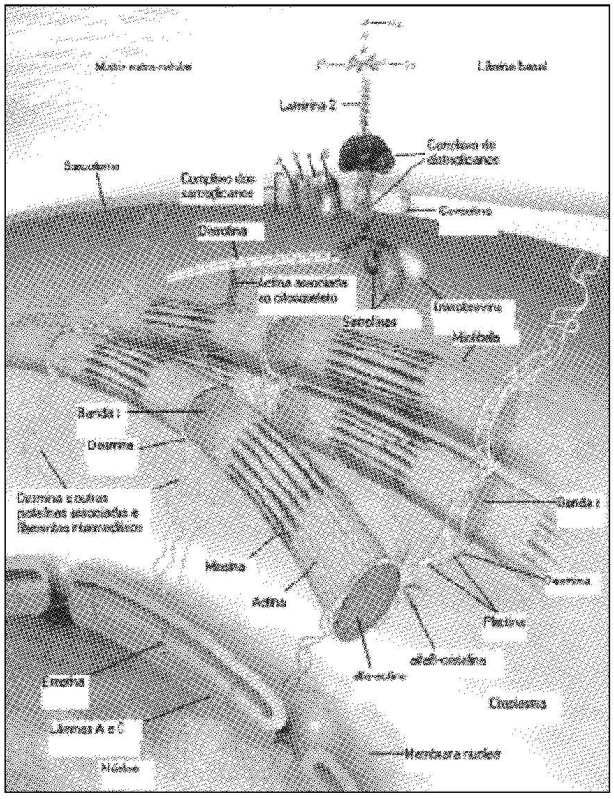


Fig. 1 Modificada de N Eng J Med 2000;342:778.

Fig. 1 Modified from N Eng J Med 2000;342:778.

miocardiopatia é predominante e a alteração do músculo esquelético é discreta ou ausente. As alterações do gene da distrofina responsáveis pela miocardiopatia dilatada são, frequentemente, delecções e mutações pontuais na região promotora e nos primeiros exões [29], ou noutras localizações (tipo Becker) [12]. Conforme a localização da mutação, podem ocorrer alterações na quantidade de proteína expressa ou alterações na sua conformação, em locais que são essenciais para a função a nível dos miócitos cardíacos [36].

2. *O complexo glicoproteico associado à distrofina* estabelece a ligação da distrofina à a2-laminina – uma proteína da matriz extracelular – e é constituído por múltiplas proteínas codificadas por genes autossómicos como são os a e b distroglicanos, a, b, g, d-sarcoglicanos, e as sintrofina- a e b [36, 39]. A grande maioria das «sarcoglicanopatias» primárias está associada a distrofias musculares. No entanto é possível identificar deficiências secundárias destas proteínas em alguns tipos de mutações do gene da distrofina, como é o caso da mutação no exão 29 da distrofina que condiciona deficiência secundária dos b e d sarcoglicanos a nível do músculo cardíaco [39]. No modelo animal BIO 14.6, com delecção ao nível do d-sarcoglicano, ocorre distrofia muscular associada a miocardiopatia dilatada, o que coloca a hipótese de mutações nestas proteínas poderem estar directamente implicadas na génese de alguns casos de miocardiopatia dilatada familiar [39].

3. A *desmina* (2q35) circunda os filamentos de actina nas linhas Z unindo-os à membrana plasmática e associa-se aos discos intercalados, além de se ligar à membrana nuclear e a outros organelos [36]. É portanto uma proteína essencial na estabilização dos sarcómeros e na transmissão da força contráctil. As mutações da desmina foram inicialmente descritas como associadas a um grupo heterogéneo de miopatias hereditárias ou esporádicas, em que é frequente a afectação do sistema de condução cardíaco [40]. Mais recentemente foi descrito um caso de miocardiopatia dilatada «pura», sem miopatia esquelética, por mutações do gene da desmina num domínio diferente do das «desminopatias» clássicas [22].

4. A *actina* (15q14) é uma proteína altamente conservada, existindo várias isoformas: cardíaca, esquelética, vascular, entérica e tipos não musculares [41]. A nível muscular, a actina não é só um componente principal do citoesqueleto como também constitui os filamentos finos dos sarcómeros, sendo essencial para a contracção muscular [41].

intercalated discs, besides being connected to the nuclear membrane and other organelles [36]. It is therefore an essential protein for the stabilization of sarcomeres and the transmission of contractile force. Desmin mutations were initially described as being associated with a heterogeneous group of hereditary and sporadic cardiomyopathies, in which the cardiac conduction system is frequently affected [40]. More recently, a case of "pure" dilated cardiomyopathy without skeletal myopathy has been described, caused by mutations in the desmin gene in a different domain from the classic desmin disorders [22].

4. *Actin* (15q14) is a highly conserved protein with various isoforms: cardiac, skeletal, vascular, enteric and non-muscle types [41]. Actin is not only an important component of the cytoskeleton but also makes up the thin sarcomere filaments that are essential for muscle contraction [41].

Olson et al. [21] demonstrated that two actin gene missense mutations were the cause of dilated cardiomyopathy in two families. In fact, the actin and desmin genes were the first to be identified as a cause of autosomal dominant familial dilated cardiomyopathy. This led to a search for mutations in these two genes in various populations. In studies screening for actin gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy, it was found that many of the mutations were polymorphisms, with many of them being present even in normal individuals [41, 42]. Curiously, the two mutations described by Olson were not found in these series [41, 42]. It should be noted that actin mutations involving linkage sites to myosin result in a hypertrophic cardiomyopathy phenotype [35] and thus the actin gene was the first to be described in which the presence of different mutations can be associated with two distinct types of cardiomyopathy.

5- *b-myosin heavy chain and troponin T* – The possibility of mutations in the same gene having such different phenotypic repercussions as hypertrophic and dilated cardiomyopathy was also shown by the description of families with dilated cardiomyopathy caused by mutations in sarcomeric protein genes. Mutations in b-myosin heavy chain (14q11.2-12) and troponin T(1q3) [35] both appear to reduce the efficiency of sarcomeric contraction. Thus, the Ser532Pro missense mutation in myosin heavy chain appears to cause alterations in the stereospecific interactions between actin and myosin, while the Phe764Leu mutation in the same gene seems to affect one of the hinge points of myosin, which undergoes changes in shape

Olson et al.[21] mostrou que duas mutações *missense* no gene da actina eram a causa de miocardiopatia dilatada em duas famílias. De facto, os genes da actina e desmina foram os primeiros genes a serem identificados como causa de miocardiopatia dilatada familiar de transmissão autossómica dominante. Isto conduziu à pesquisa de mutações nestes dois genes em vários tipos de populações. Nesses estudos de rastreio de mutações no gene da actina em doentes com miocardiopatia dilatada, verificou-se que muitas das mutações eram polimorfismos estando muitas delas presentes mesmo em indivíduos normais[41, 42]. Curiosamente, as 2 mutações descritas por Olson, não foram encontradas nessas mesmas séries[41, 42]. É de realçar que as mutações da actina, envolvendo os locais de ligação à miosina, resultam em fenótipo de miocardiopatia hipertrófica[36] e assim o gene da actina foi o primeiro gene descrito em que a presença de diferentes mutações pode associar-se a dois tipos distintos de miocardiopatia.

5. *Cadeia pesada b da miosina e troponina T* – A possibilidade de mutações num mesmo gene poderem ter repercussões fenotípicas tão distintas como sejam a miocardiopatia hipertrófica ou dilatada, foi também posta em evidência pela descrição de famílias com miocardiopatia dilatada devida a mutações em genes de proteínas sarcoméricas. Quer as mutações no gene da cadeia pesada b da miosina (14q11.2-12), quer no gene da troponina T(1q3)[35], parecem diminuir a eficácia da contracção sarcomérica. Assim, na mutação *missense* Ser532Pro da cadeia pesada da miosina parece ocorrer alteração das interacções estereoespecíficas entre a actina e a miosina enquanto a mutação Phe764Leu do mesmo gene, parece afectar um dos pontos flexíveis da miosina que sofre alterações da forma durante o ciclo contráctil[35]. Em duas outras famílias com miocardiopatia dilatada foi encontrada uma delecção de três nucleotídeos, com eliminação de um aminoácido de lisina no gene da troponina T[35]. Este resíduo de lisina ocorre numa região habitualmente com 6 lisinas, que permite a ligação à troponina C. Pensa-se que esta perda reduz as interacções iónicas com diminuição da activação da ATPase da miosina[35].

6. O gene da *lâmina A/C (1q21)* codifica 2 proteínas da lâmina nuclear, lâminas A e C, resultantes de um mecanismo de *splicing* alternativo (ver glossário). A lâmina nuclear é uma camada fibrosa do lado nucleoplasmático da membrana nuclear[43]. As lâminas formam dímeros e interagem com a

during the contraction cycle[35]. In two other families with dilated cardiomyopathy deletion of three nucleotides was found, thus eliminating one lysine of the troponin T gene[35]. This lysine residue occurs in a region that normally has 6 lysines that bind to troponin C. It is thought that this loss reduces ionic interactions and hence activation of myosin ATPase[35].

6. *The lamin A/C gene (1q21)* codes for two nuclear lamin proteins, lamin A and C, through the mechanism of alternative splicing (see Glossary). Nuclear lamin makes up a fibrous layer on the nucleoplasm side of the nuclear membrane[43]. The lamins form dimers and interact with chromatin and with the proteins of the inner nuclear membrane, as is the case with emerin[43]. Mutations in lamin A/C are associated with various clinical settings, including isolated forms of dilated cardiomyopathy with abnormalities of the cardiac conduction system[27], dilated cardiomyopathy associated with muscular dystrophy[27], and the autosomal dominant form of Emery-Dreifuss muscular dystrophy[27, 36]. The classic form of the latter, which is often accompanied by dilated cardiomyopathy with abnormalities in cardiac conduction, is X-linked and is caused by mutations in a different gene, that for emerin[28]. The interaction between lamin and emerin in the nuclear membrane explains a certain degree of overlapping of phenotypes, although the signaling pathway that results in cardiac dilatation is not known. It is therefore not known how abnormalities in nuclear membrane function can lead to dilated cardiomyopathy.

7. Locus Xq28 on the X chromosome, initially designated G4.5, codes for various tafazzin proteins, through the mechanism of alternative splicing[44]. The function of tafazzins is not yet known; they are not homologous with other proteins and have a complex pattern of expression in skeletal and cardiac muscle tissue. Some have a hydrophobic amino-terminal residue that enables them to anchor to membranes, while others are cytoplasm proteins. It is known, however, that they must play an important role given the clinical implications of mutations, which are associated with diseases that develop early in life[30].

CONCLUSION

The genetic study of familial dilated cardiomyopathies is of great importance since it will enable light to be thrown on their pathogenesis and significantly extend our understanding of the complex network of interrelations involved in the pathogenesis of heart failure. However, we are only in the early stages of such

cromatina e com as proteínas da membrana nuclear interna, como é o caso da emerina [43]. As mutações da lâmina A/C estão associadas a espectros clínicos variados que englobam formas isoladas de miocardiopatia dilatada com alterações do sistema de condução cardíaca [27], miocardiopatia dilatada associada a distrofia muscular [27] e a forma autossómica dominante da distrofia muscular de Emery-Dreifuss [27, 36]. A forma clássica da distrofia muscular de Emery-Dreifuss, que muitas vezes se acompanha de miocardiopatia dilatada com alterações da condução cardíaca, está associada ao cromossoma X e deve-se a mutações de um gene diferente, o da emerina [28]. A interacção entre as proteínas lâmina e emerina a nível da membrana nuclear, explica alguma sobreposição dos fenótipos, embora seja desconhecida a via de sinalização que conduz à dilatação cardíaca, isto é, de que forma a miocardiopatia dilatada pode resultar de alterações da função da membrana nuclear.

7. O *locus* Xq28 do cromossoma X, inicialmente designado por G4.5, codifica várias proteínas, as tafazinas, através do mecanismo de *splicing* alternativo [44]. A função das tafazinas ainda é desconhecida, não têm homologia com outras proteínas e têm um padrão de expressão a nível do tecido muscular esquelético e cardíaco complexo. Algumas têm um resíduo amino terminal hidrofóbico que lhes permite a ancoragem a membranas, outras são proteínas citoplasmáticas. Sabe-se, no entanto, que devem desempenhar um papel importante pelas suas implicações clínicas, estando associadas a doença que se manifesta em idades precoces [30].

CONCLUSÃO

O estudo genético das miocardiopatias dilatadas familiares reveste-se de extrema importância dado que permitirá fazer luz sobre a sua patogenia alargando, de forma decisiva, a compreensão da complexa rede de inter-relações envolvida na patogénese da insuficiência cardíaca. Contudo, estamos ainda no limiar desta exploração e as hipóteses de trabalho estão ainda longe de estar consolidadas. De uma forma geral julga-se que mutações que afectem a contracção sarcomérica conduzem a miocardiopatia hipertrófica, enquanto que mutações que afectem a transmissão da força contráctil estão associadas a dilatação cardíaca [41].

Esta ideia foi contudo posta em causa pela descoberta recente, acima referida, de alterações em genes codificadores de proteínas dos sarcómeros, associados

investigations and working hypotheses are still a long way from being confirmed. In general, it is thought that mutations affecting sarcomeric contraction lead to hypertrophic cardiomyopathy, while those affecting transmission of contractile force are associated with cardiac dilatation [41].

However, as mentioned above, this idea has been called into question by the recent discovery that alterations in genes that code for sarcomeric proteins are associated with not only hypertrophic but also dilated cardiomyopathy.

Thus, besides the gene itself, the location of the mutation would appear to be an important factor to be taken into account in understanding its biophysical consequences, since different signaling pathways are generated, leading to either hypertrophy or ventricular dilatation. Although the percentage of cases that can be attributed to each type of mutation is not known, it appears that mutations in sarcomeric proteins are more prevalent in cases of early onset dilated cardiomyopathy.

Despite the data available, the complex network of mechanisms governing onset and progression of dilated cardiomyopathy is still not fully understood, particularly the way in which other genes, polymorphisms and environmental factors can shape phenotypic expression, and the manner in which secondary alterations occur in neuroendocrine systems, which may or may not affect the progression of the disease and its response to therapy.

It should be emphasized that the long and laborious journey towards an understanding of cardiomyopathies is being undertaken in parallel with an understanding of the pathophysiology of another important group of diseases, the muscular dystrophies.

With our current state of knowledge, what is required is a systematic investigation of cases of familial dilated cardiomyopathy, so as to identify asymptomatic family members, 20 % of whom may present a dilated cardiomyopathy phenotype [45]. It would then be possible to begin early therapy in these individuals, with the aim of delaying the progression of the disease.

It is also important to follow up these patients closely, since it is not known if their prognosis is different from that of other forms of dilated cardiomyopathy. Besides prognosis, such follow-up could also help to clarify their response to classic therapies for heart failure and to establish the relation with important factors in the expression and/or progression of the disease, such as alcohol consumption, pregnancy and occurrence of myocarditis.

The identification of familial forms of

não só a miocardiopatia hipertrófica mas também a miocardiopatia dilatada.

Desta forma, para além do gene, o local da mutação parece ser um factor importante a ter em conta para o entendimento das suas consequências biofísicas, gerando vias de sinalização diferentes no sentido da remodelagem para hipertrofia ou para a dilatação ventricular. Embora seja desconhecida a percentagem de casos atribuíveis a cada tipo de mutação, parece que as mutações em proteínas sarcoméricas serão mais prevalentes nos casos de miocardiopatia dilatada com manifestação em idades jovens.

Apesar destes dados, mantém-se ainda desconhecida toda a complexa rede de mecanismos de início e de progressão para miocardiopatia dilatada, nomeadamente a forma como outros genes, polimorfismos ou factores ambientais podem modelar a expressão fenotípica, a forma como estão alterados secundariamente os sistemas neuro-endócrinos, contribuindo ou não para a progressão da doença e eventual resposta à terapêutica.

É de salientar que este longo e laborioso percurso no entendimento das miocardiopatias cursa em paralelo com o conhecimento da fisiopatologia de outro importante grupo de patologias que são as distrofias musculares.

No estado actual de conhecimento, pretende-se que seja efectuada uma pesquisa sistemática dos casos de miocardiopatia dilatada familiar, de forma a permitir a identificação dos familiares assintomáticos, 20 % dos quais podem apresentar fenótipo de miocardiopatia dilatada [45]. Nestes, é possível a instituição precoce de terapêutica específica com o intuito de retardar a progressão da doença.

Outra questão importante é a de fazer um seguimento apertado destes doentes, pois não se sabe se o seu prognóstico é distinto das outras formas de miocardiopatia dilatada. Para além do prognóstico, tal seguimento pode ajudar a esclarecer a resposta às terapêuticas clássicas da insuficiência cardíaca e permitir estabelecer uma relação com factores importantes na expressão e/ou progressão da doença como é o consumo de álcool, a gravidez ou a ocorrência de miocardite.

A identificação das formas familiares de miocardiopatia dilatada permite desde já o aconselhamento genético, particularmente importante nas variantes autossómicas dominantes em que o risco de transmissão da doença é de 50 %. Tal aconselhamento pode ser facilitado pela descoberta do *locus* em causa, ou melhor, se forem identificados o gene e a

dilated cardiomyopathy means that genetic counseling is already possible, which is particularly important for autosomal dominant variants in which the risk of transmitting the disease is 50 %. Such counseling would be facilitated by the discovery of the locus involved, or better still identification of the specific gene and mutation.

It should also be borne in mind that a proportion of cases of idiopathic dilated cardiomyopathy that are considered sporadic may in fact be genetic in origin; this situation may arise either through novel mutations or because limited penetrance, which masks carrier status in small families, has led to these cases not being recognized as familial.

The clarification of genetic factors implicated in the etiopathogenesis of the disease has led to a modification of the traditional classification of cardiomyopathies into hypertrophic, dilated and restrictive forms. The establishment of appropriate sub-categories within each of the above groups, based on genetic etiology, will obviously have implications for diagnosis, prognosis and therapy in these situations. A thorough understanding of the genes and mutations responsible for familial dilated cardiomyopathy will in the future improve diagnostic ability, facilitate genetic counseling, increase knowledge of the pathogenesis of the disease, and provide a starting point for new pharmacological treatments as well as the possible development of gene therapies, though these are still some way in the future.

GLOSSARY

Sarcolemma: myocyte cell membrane

Exon: segment of a eukaryotic gene that reaches the cytoplasm in the form of functional or mature RNA

Intron: DNA sequence and primary RNA transcripts that are removed by splicing, i.e. they are not part of mature messenger RNA

Locus: location of a gene on the chromosome (plural: loci)

Missense mutation: a mutation that alters the amino acid sequence of a protein

Penetrance of a gene: percentage of individuals carrying the mutated gene who display the corresponding abnormal phenotype

Polymorphisms: variations in the genetic code present in the normal population, with no direct relation to the appearance of disease

Conserved protein: a protein with a high degree of homology between different animal species

RNA splicing: mechanism that

Pedido de separatas para:
Address for reprints:

ELISABETE MARTINS
Rua do Campo Alegre 1252, 1.ºE
4150-174 PORTO
Tel: 226 060 644 – Tlm: 93 420 5538
e-mail: bernardes_med@hotmail.com

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Richardson P, Mckenna W, Bristow MR, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. Circulation 1996; 93:841-2.

2. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. Circulation 1989;80:564-72.

3. Michels VV, Moll PP, Miller FA, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 1992; 326:77-82.

4. Keeling PJ, Gang G, Smith G, et al. Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. Br Heart J 1995;73: 417-21.

5. Mestroni L, Rocco C, Gregori D, et al. Familial Dilated Cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. J Am Coll Cardiol 1999;181-90.

6. Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Eur Heart J 1999;20:93-102.

7. Grunig E, Tasman J, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus H. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1998;31:186-94.

8. Mestroni L, Krajinovic M, Severini GM, et al.

Familial dilated cardiomyopathy. Br Heart J 1994;72:S35-S41.

9. Caforio ALP, Keeling PJ, Zachara E, et al. Evidence from family studies for autoimmunity in dilated cardiomyopathy. Lancet 1994;344:773-7.

10. Arbustini E, Morbini P, Pilotto A, Gavazzi A, Tavazzi L. Familial dilated cardiomyopathy: from clinical presentation to molecular genetics. Eur Heart J 2000; 21:1825-32.

11. McMinn TR, Ross J. Hereditary Dilated Cardiomyopathy. Clin. Cardiol 1995;18:7-15.

12. Muntoni F, Di Lenarda A, Porcu M, et al. Dystrophin gene abnormalities in two patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Heart 1997;78:608-12.

13. Vilarinho L, Cardoso ML, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das citopatias mitocondriais. ArquiMed 1997;11:75-81.

14. Glick BR, Pasternak JJ. Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA; 1998. American Society for Microbiology.

15. Charron Ph, Tesson F, Poinier O, et al. Identification of a genetic risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 1999;20:1587-91.

16. Tiret L, Mallet C, Poirier O, et al. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy. The CARDIGENE study. J Am Coll Cardiol 2000;35:29-35.

17. Krajinovic M, Pinamonti B, Sinagra G, et al. Linkage of Familial Dilated Cardiomyopathy to Chromosome 9. Am. J. Hum Genet 1995;57:846-52.

18. Durand JB, Bachinski LL, Beeling LC, et al. Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32. Circulation 1995;92:3387-9.

19. Bowles KR, Gajarski R, Porter P, et al. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. J. Clin Invest 1996;98:1355-60.

20. Siu BL, Niimura H, Osborne JA, et al. Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31. Circulation 1999;99:1022-6.

21. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Taiys, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. Science 1998;280:750-2.

22. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, et al. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. Circulation 1999;100:461-4.

23. Kass S, Macrae C, Graber HL, et al. A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. Nature Genet 1994;7: 546-51.

24. Olson TM, Keating MT. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. J Clin Invest 1996;97:528-32.

25. Jung M, Poepping I, Perrot A, et al. Investigation of family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. Am J. Hum. Genet 1999;65:1068-77.

26. Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally E. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. Am J. Hum Genet 1997;61:909-17.

27. Brodsky G, Muntoni F, Miocic S, Sinagra G, Sewry C, Mestroni L. Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. Circulation 2000;101:473-6.

28. Emery A. The muscular dystrophies. Lancet 2002;359: 687-95.

29. Muntoni F, Cau M, Ganau A, et al. Deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. N Eng J Med 1993;329:921-5.

30. Adamo P, Fassone L, Gedeon A, et al. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. Am J Hum Gent 1997;61:862-7.

31. Bleyl SB, Mumford BR, Brown-Harrison MC, et al. Xq28-linked noncompaction of the left ventricular myocardium: prenatal diagnosis and pathologic analysis of affected individuals. Am J Med Genet 1997;72:257-65.

32. Morrow WR. Cardiomyopathy and heart transplantation in children. Curr Opin Cardiol 2000;15:216-23.

33. Leonard JV, Schapira AHV. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. Lancet 2000; 355:299-304.

34. Santorelli FM, Mak SC, Schalawi M, et al. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA (lys) gene (G8363A). Am J Hum Genet 1996;56:933-9.

35. Kamisago M, Sharma SD, et al. Mutations in Sarcomere Protein Genes as a cause of Dilated Cardiomyopathy. N Engl J Med 2000;343:1688-96.

36. Franz WF, Muller OJ, Katus HA. Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. Lancet 2001;358: 1627-37.

37. Diggelmann V, Baur HR. Familial Uhl anomaly in the adult. Am Cardiol 1984;53:1402-3.

38. Katz AM. Heart failure: pathophysiology, molecular biology and clinical management. Lippincott Williams & Wilkins 1999:71.

39. Franz W-M, Muller M, et al. Association of nonsense mutation of dystrophin gene with disruption of sarcoglycan complex in X-linked dilated cardiomyopathy. Lancet 2000; 355:1781-5.

40. Dalakas MC, Park KJ, Semino-Mora C, Lee SH, Sivakumar K, Goldfarb L. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. N Engl J Med 2000;342:770-80.

41. Takai Eiji, Akita H, Shiga N, et al. Mutational Analysis of the Cardiac Actin Gene in Familial and Sporadic Dilated Cardiomyopathy. Am J Med Genet 1999;86:325-7.

42. Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, et al. Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a European population of dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 2000;21: 1872-6.

43. Manilal S, Sewry CA, Pereboev A, et al. Distribution of emerin and lamins in the heart and implications for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Hum Molec Genet 1999;8: 353-9.

44. Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D. A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth Syndrome. Nature Genet 1996;12:385-9.

45. Baig MK, Goldman JH, Caforio ALP, et al. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. J Am Coll Cardiol 1998;31:195-201.

Portuguese study of familial dilated cardiomyopathyes. The Fátima study.

Estudo Português de Miocardiopatias Dilatadas Familiares. Estudo FATIMA [76]

ELISABETE MARTINS[1], JOSÉ SILVA-CARDOSO[1], MANUEL BICHO[2], MAFALDA BOURBON[3], FÁTIMA CEIA[4], M. JOSÉ REBOCHO[5], BRENDA MOURA[1], CÂNDIDA FONSECA[4], MARIA JOSÉ CORREIA[6], DULCE BRITO[6], CARLOS PERDIGÃO[7], HUGO MADEIRA[6], CASSIANO ABREU-LIMA[1]

1 Serviço de Cardiologia-Hospital de São João, Faculdade de Medicina do Porto, Porto, Portugal; 2 Serviço de Genética, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal; 3 INSA, Instituto Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal; 4 Serviço de Medicina III, Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar Ocidental de Lisboa Ocidental e Faculdade de Ciência Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; 5 Serviço de Cardiologia, Hospital de Santa Cruz, Carnaxide, Portugal; 6 Serviço de Cardiologia-Hospital Santa Maria, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal; 7 Serviço de Cardiologia, Hospital de S. Bernardo-Centro Hospitalar de Setúbal, Setúbal, Portugal

Rev Port Cardiol 2008; 27 (9): 1029-1042

RESUMO

A miocardiopatia dilatada (MCD) é uma doença do músculo cardíaco caracterizada pela dilatação ventricular e compromisso da função sistólica, sendo possível identificar, numa percentagem superior a 30% dos casos, uma origem familiar ou genética. Dada a penetrância dependente da idade, manifesta-se muitas vezes em adultos por sinais ou sintomas de insuficiência cardíaca, arritmias ou morte súbita. O padrão autossómico dominante predomina, sendo possível identificar, nestes casos, mutações em genes de proteínas do citoesqueleto celular, sarcómero ou membrana nuclear.

Até ao momento, a maioria dos trabalhos visando o diagnóstico molecular nos casos de MCD foi realizada em famílias seleccionadas, ou em grupos mais abrangentes de doentes, mas rastreando mutações num número restrito de genes.

Consequentemente a epidemiologia das mutações nos casos familiares de MCD continua por esclarecer. É neste contexto que se coloca a necessidade de efectuar estudos multicêntricos, envolvendo uma pesquisa mutacional diversificada em várias familias e nos casos idiopáticos de MCD.

O presente artigo descreve a metodologia de um estudo multicêntrico que tem como objectivo a caracterização clínica e molecular de casos familiares de MCD na população portuguesa.

Palavras-Chave

Miocardiopatia Dilatada; Familiar; Genética

ABSTRACT

Portuguese Study of FAmilial dilaTed cardIoMyopAthy: the FATIMA study

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a myocardial disease, characterized by ventricular dilatation and impaired systolic function, that in more than 30% of cases has a familial or genetic origin.

Given its age-dependent penetrance, DCM frequently manifests in adults by signs or symptoms of heart failure, arrhythmias or sudden death. The predominant mode of inheritance is autosomal dominant, and in these cases mutations are identified in genes coding for cytoskeletal, sarcomeric or nuclear envelope proteins.

To date, most studies aimed at molecular diagnosis of DCM have been in selected families, or in larger groups of patients, but screening for mutations in a limited number of genes.

Consequently, the epidemiology of mutations in familial DCM remains unknown. There is thus a need for multicenter studies, involving screening for a wide range of mutations in several families and in cases of idiopathic DCM.

The present article describes the methodology of a multicenter study, aimed at clinical and molecular characterization of familial DCM patients in the Portuguese population.

Key words

Dilated cardiomyopathy; Familial; Genetics

Recebido para publicação: Abril de 2008 • Aceite para publicação: Maio de 2008
Received for publication: April 2008 • Accepted for publication: May 2008

Rev Port Cardiol
Vol. 27 Setembro 08 / September 08

INTRODUÇÃO

No modelo de classificação das miocardiopatias recentemente proposto pelo Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases da Sociedade Europeia de Cardiologia, as *miocardiopatias dilatadas* (MCD) constituem doenças do músculo cardíaco, caracterizadas pela dilatação e disfunção sistólica de um ou de ambos os ventrículos, na ausência de condições anormais de sobrecarga (hipertensão, doença valvular, cardiopatia congénita) ou de doença coronária suficientes para causar compromisso global da função ventricular [1]. São designadas como familiares ou genéticas, se a miocardiopatia ou outra característica fenotípica atribuída à mesma mutação está presente noutro elemento da familia do probando, ou se for identificada uma mutação de novo, num caso esporádico de MCD, isto é, sem história familiar da doença.

Em 1999, a Sociedade Europeia de Cardiologia tinha já inumerado os critérios clínicos (caracteristicas fenotípicas) a ter em conta na identificação das MCD familiares (MCDF) [2]. Segundo estas orientações, perante um caso "idiopático" de MCD, são dois os critérios *major* para a considerar de causa genética: 1º MCD noutro familiar ou, 2º- a ocorrência de morte súbita inexplicada antes dos 35 anos de idade num parente em 1º grau.

Na ausência destes 2 critérios, é ainda possível classificar a MCD como familiar se, após a observação dos elementos da família, algum deles reunir critérios para ser considerado *afectado* (com expressão fenotípica) pela doença. A condição de afectado é definida pela presença de 3 critérios *minor*, ou de 1 critério *minor* conjuntamente com diametros do ventrículo esquerdo superiores a 117% do previsto para a idade e superfície corporal, segundo a equação de Henry [3]. São considerados critérios *minor* a presença de: a) taquiarritmias inexplicadas antes dos 50 anos, quer supraventriculares (fibrilhação auricular ou outras sustentadas), quer ventriculares (> 1000 extra-sístoles /24 horas ou ≥ 3 com frequência > 120 bpm); b) perturbações da condução inexplicadas (bloqueio aurículoventricular do 2º ou 3º grau, bloqueio completo de ramo esquerdo, doença do nó sinusal); c) dilatação isolada do ventrículo esquerdo (aqui definida por diametros superiores a 112% do valor previsto); d) disfunção sistólica

INTRODUCTION

In the classification of cardiomyopathies recently proposed by the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases, dilated cardiomyopathy (DCM) is a myocardial disease characterized by dilatation and systolic dysfunction of one or both ventricles, in the absence of abnormal load conditions (such as in hypertension, valve disease, or congenital heart disease) or coronary artery disease of sufficient severity to cause global impairment of ventricular function [1]. It is classified as familial or genetic when the cardiomyopathy or other phenotypic characteristic attributed to the same mutation is present in another member of the proband's family, or when a *de novo* mutation is identified in a case of sporadic DCM, in other words with no family history of the disease.

In 1999, the European Society of Cardiology (ESC) published clinical criteria (phenotypic characteristics) for identifying familial DCM [2]. According to these guidelines, there are two main criteria for considering cases of idiopathic DCM to be of genetic origin: 1) DCM in a family member, or 2) unexplained sudden death before the age of 35 in a first-degree relative.

In the absence of these two criteria, DCM can still be classified as familial if following assessment of family members, any individual has criteria to be considered affected, in other words with phenotypic expression of the disease. This is defined as the presence of three minor criteria, or one minor criterion together with left ventricular diameter of more than 117% of that predicted for age and body surface area according to the Henry equation [3]. The minor criteria are: a) unexplained tachyarrhythmia before the age of 50, either supraventricular (atrial fibrillation or other sustained arrhythmia), or ventricular (>1000 extrasystoles/24 hours or ≥3 with heart rate of >120 bpm); b) unexplained conduction disease (second or third degree atrioventricular block, left bundle branch block, or sinus node dysfunction); c) isolated left ventricular dilatation (defined as a diameter of more than 112% of the predicted value); d) systolic dysfunction (ejection fraction of less than 50% and/or fractional shortening of less than 28%); e) unexplained sudden death or stroke before the age of 50; and f) segmental wall motion abnormalities in the

(fracção ejecção inferior a 50% e/ou fracção de encurtamento inferior a 28%), e) morte súbita ou acidente vascular cerebral inexplicados (AVC) antes dos 50 anos de idade; f) alterações da contractilidade segmentar na ausência de perturbações da condução ou de doença coronária.

Devido ao facto de actualmente o diagnóstico das MCDF ser ainda estabelecido por critérios clínicos inespecificos, existe apenas uma ideia imprecisa da sua frequência relativa entre os casos "idiopáticos" da doença. Ainda assim estima-se que mais do que 30% destes são de facto familiares. Esta percentagem deriva de estudos realizados maioritariamente na década de 90, nos quais familiares de doentes com miocardiopatia dilatada idiopática foram avaliados do ponto de vista clínico e ecocardiográfico. Michels et al, em 1992, encontrou uma prevalência de MCDF de 20% após observar 315 familiares de 59 casos - índex [4]. Keeling, em 1995, avaliou 236 sujeitos (incluindo casos - index e seus familiares), tendo identificado uma percentagem de MCDF de 25% [5]. Grunig em 1998, após observar 970 parentes de 445 casos - índex, obteve uma frequência de 35% [6]. Em 1999, Mestroni descreveu subtipos (fenótipos) de MCDF e obteve uma percentagem de 65% de MCDF entre os 281 parentes de 60 probandos observados [7]. Das associações fenotípicas descritas pelos dois últimos autores é de realçar a possibilidade da ocorrência concomitante de MCD e miopatia esquelética, MCD e defeitos de condução ou de MCD e surdez neuro-sensorial.

A identificação destas associações fenotípicas pode ser útil para orientação do diagnóstico molecular. São frequentes as mutações no gene da lâmina nuclear quando existe perturbação da condução cardíaca, ou história de morte súbita [8]. As mutações do complexo glicoproteico associado à distrofina podem estar presentes quando existe miopatia esquelética concomitante [9]. Foi identificada uma mutação no gene do cofactor de transcrição Eye4, na presença de MCD e surdez neuro-sensorial [10].

Apesar destas associações, a aplicação do diagnóstico molecular na prática clínica encontra-se dificultada pela grande heterogeneidade das mutações envolvidas nas MCDF. Foram descritas até ao momento mutações em mais de 20 genes, as quais são, na grande

absence of conduction disturbances or coronary artery disease.

Since at present a diagnosis of familial DCM is made on the basis of nonspecific clinical criteria, its relative frequency among "idiopathic" cases of the disease remains unknown. Even so, it is estimated that over 30% of such cases are in fact familial. This figure is based on studies mainly carried out in the 1990s, in which relatives of patients with idiopathic DCM were assessed clinically and echocardiographically. In 1992, Michels et al. found a prevalence of familial DCM of 20% on assessment of 315 relatives of 59 index patients [4]. Keeling et al., in 1995, assessed 236 individuals (index patients and relatives) and found familial DCM in 25% [5]. In 1998, Grunig et al. studied 970 relatives of 445 index patients and found a frequency of 35% [6], while in 1999, Mestroni et al. studied subtypes (phenotypes) of familial DCM and reported 65% of such cases among 281 relatives of the 60 probands observed [7]. The phenotypic associations described by the latter two authors include DCM concomitant with skeletal myopathy, conduction defects and sensorineural deafness.

Identification of these phenotypic associations may assist in molecular diagnosis. Mutations in the nuclear lamin gene are common in cases of conduction system disease or a history of sudden death [8], and mutations in the delta-sarcoglycan gene encoding a protein of the dystrophin-associated glycoprotein complex may be present in cases with concomitant skeletal myopathy [9]. A mutation in the EYA4 transcriptional coactivator has been identified in DCM with sensorineural hearing loss [10].

Despite such associations, applying molecular diagnosis in clinical practice is hindered by the great variety of mutations involved in familial DCM. To date mutations have been described in over 20 genes, most of which are "private", i.e. exclusive to a single family [11, 12]. Mutations have been found in genes coding for sarcomeric [13], cytoskeletal [14], and nuclear envelope [15] proteins, and even ion channel proteins [16, 17] in cases of familial DCM.

Given this situation, there is clearly still insufficient data on the prevalence, molecular basis and prognosis of this form of primary cardiomyopathy, as well as on the impact of environmental factors and medical therapy on the

Rev Port Cardiol
Vol. 27 Setembro 08 / September 08

maioria, distintas ("exclusivas") entre as várias famílias [11, 12]. Perante um caso de MCDF é possível encontrar mutações em proteínas do sarcómero [13], do citosqueleto celular [14], da membrana nuclear [15], ou mesmo dos canais iónicos [16,17].

Face ao exposto, torna-se evidente que existem ainda dados insuficientes sobre a prevalência, a base molecular e o prognóstico da doença, bem como sobre o impacto de factores ambientais e da terapêutica médica na história natural desta forma de miocardiopatia primária. A realização de trabalhos de investigação nesta área, nomeadamente a caracterização clínica e molecular dos casos familiares de MCDF na população portuguesa, reveste-se pois de actualidade e de interesse científico.

OBJECTIVOS

São objectivos deste estudo multicêntrico sobre miocardiopatias dilatadas familiares:

1. Estimar a frequência de casos familiares de MCD entre os doentes com MCD idiopática;
2. Caracterizar as formas de apresentação clínica;
3. Determinar a incidência de novos casos de MCD entre os familiares do caso-index;
4. Obter dados sobre o prognóstico dos doentes com MCDF;
5. Determinar a frequência relativa dos genes/mutações implicadas nas MCDF na população portuguesa;
6. Estimular a cooperação entre os centros nacionais com particular interesse em miocardiopatias, promovendo a realização de novos estudos de carácter multicêntrico.

FASES DO ESTUDO

Estão contempladas 3 etapas no protocolo do estudo.

1ª Etapa - Recrutamento e caracterização clínica dos casos - índex (probandos) e colheita de sangue periférico para a extracção de ADN.

2ª Etapa - Observação/caracterização dos familiares de 1º grau com idade superior a 18 anos, que dêem o seu consentimento para a participação no estudo.

3ª Etapa - Seguimento a longo prazo, com a natural history of the disease. It is for this reason that further studies, particularly those aimed at the clinical and molecular characterization of familial DCM in the Portuguese population, are of considerable interest.

OBJECTIVES

The objectives of this multicenter study on familial dilated cardiomyopathy are:

1. To estimate the prevalence of familial DCM among patients with idiopathic DCM;
2. To characterize the forms of clinical presentation;
3. To determine the incidence of new cases of DCM among relatives of index cases;
4. To obtain data on the prognosis of patients with familial DCM;
5. To determine the relative frequency of the genes and mutations involved in familial DCM in the Portuguese population;
6. To promote cooperation between national centers with a particular interest in cardiomyopathies so as to encourage further multicenter studies.

STUDY PHASES

The study protocol has three phases:

Phase 1 - Recruitment and clinical characterization of index cases (probands), with peripheral blood collection for DNA analysis;

Phase 2 - Observation and characterization of first-degree relatives aged over 18 who have given their consent to participation in the study;

Phase 3 - Long-term follow-up, focusing on the clinical evolution of the probands and the family members initially assessed; results of genetic studies.

METHODS

Ethics

The study will be submitted to the Project Coordination Center and the Ethics Committee of the Portuguese Society of Cardiology, with emphasis on protecting the anonymity of clinical data. It will then be sent for approval to the Scientific Research Ethics Committee (CEIC).

determinação da evolução clínica do probando e dos familiares inicialmente avaliados; obtenção dos resultados do estudo genético.

METODOLOGIA

Ética

O estudo será submetido ao Centro Coordenador de Projectos e à Comissão de Ética da Sociedade Portuguesa de Cardiologia, com a tónica na protecção do anonimato dos dados clínicos. Posteriormente será enviado para aprovação pela Comissão de Ética para a Investigação Científica (CEIC).

Será obtido o consentimento informado de cada familiar observado, incluindo a autorização relativa à colheita de sangue periférico para a extracção de ADN.

Selecção dos Centros Participantes

Serão convidados a participar todos os centros que reúnam capacidades técnicas para o seguimento de MCDF. Tal implica a presença de recursos humanos experientes e motivados para a avaliação de doentes com miocardiopatias e a disponibilidade dos recursos tecnológicos necessários à condução do estudo. A análise molecular será efectuada num laboratório central.

Critérios de Inclusão e de Exclusão

A) Serão **incluídos** neste estudo, como CASOS - ÍNDEX (probandos), os indivíduos com mais de 18 anos de idade que tenham:

1. O diagnóstico inicial de **MCD idiopática e idade inferior ou igual a 50 anos**
2. Critérios diagnósticos de **MCDF**, independentemente da idade actual.

O diagnóstico de **MCD** será estabelecido pela presença de disfunção sistólica e dilatação do ventrículo esquerdo, caracterizadas, respectivamente, pela presença de uma fracção de ejecção inferior a 45% e/ou fracção de encurtamento inferior a 25% e um diâmetro telediastólico igual ou superior ao percentil 98. Os valores destes percentis, que variam de acordo com o sexo e a altura do indivíduo, podem ser obtidos consultando as tabelas constituídas a partir do estudo Framingham[18].

A **MCD será considerada IDIOPÁTICA** se não existir evidência de causa secundária ou adquirida da doença (*Tabela I*). A realização ou

Informed consent will be obtained from each family member assessed, including authorization for peripheral blood collection for DNA analysis.

Selection of centers

The centers invited to participate will be all those with the necessary resources for follow-up assessment of familial DCM, including the availability of personnel with interest and experience in assessing patients with cardiomyopathies and the technical resources required to conduct the study. Molecular analyses will be carried out by a central laboratory.

Inclusion and exclusion criteria

a) The index cases to be included in the study will be individuals aged over 18 with:

1. an initial diagnosis of idiopathic DCM and who are aged 50 or under;
2. diagnostic criteria for familial DCM, irrespective of current age.

The diagnosis of DCM will be established on the basis of systolic dysfunction and left ventricular dilatation, characterized respectively by ejection fraction of less than 45% and/or fractional shortening of less than 25%, and end-diastolic diameter at or above the 98th percentile. The values of these percentiles, which vary according to gender and height, can be obtained by consulting the tables constructed on the basis of the Framingham Heart Study[18].

DCM will be considered idiopathic in the absence of evidence of a secondary or acquired cause of the disease (*Table I*). Coronary angiography or ischemia testing will be performed at the discretion of the investigators depending on the patients' age, gender and risk factors.

b) Exclusion criteria are listed in *Table I*.

Initial assessment of index cases

Initial baseline assessment of each proband must include the information shown in *Table II*.

Family history

The probands will be asked to complete a questionnaire on their family history, which should be recorded in the form of a genealogical tree whenever possible.

The questionnaire should be detailed, and include signs and symptoms that may indicate the presence of heart failure, syncope, sudden death,

Rev Port Cardiol
Vol. 27 Setembro 08 / September 08

não de coronariorafia/teste de isquemia fica ao critério dos investigadores de acordo com a idade, sexo e factores de risco do doente.

B) Os **critérios de exclusão** estão discriminados no *Quadro I.*

Quadro I. ***Critérios de exclusão.*** *Não serão incluídos no estudo doentes com miocardiopatias secundárias e/ou específicas, de acordo com as definições da presente tabela*

- **Doença coronária:** história de enfarte do miocárdio ou estenose igual ou superior a 50% num vaso epicárdico *major*
- **Hipertensão arterial:** valor confirmado, em diferentes avaliações, de pressão arterial sistólica superior a 160 mmHg e/ou diastólica superior a 100 mmHg, uso de terapêutica hipotensora ou lesão de orgão-alvo
- **História de consumo excessivo de álcool:** superior a 30g/dia nos homens e superior a 40g/dia nas mulheres
- **Doença valvular intrínseca** (não inclui a insuficiência mitral secundária a dilatação do anel auriculoventricular)
- **Miocardite:** secundária a agentes infecciosos ou drogas (ex. cocaína)
- **Miocardiopatia de stress ("Tako-Tsubo")** - disfunção sistólica transitória e regional do ventrículo esquerdo, envolvendo os sementos médio-apicais, na ausência de estenoses significativas das artérias epicárdicas
- **Doença metabólica ou endócrina** (inclui a diabetes *mellitus*)
- **Doença infiltrativas** (ex.amiloidose) **ou de armazenamento** (ex. hemocromatose, doença de Fabry).
- **Doença neuromuscular ou neurológica** (Ataxia de Friedreich, distrofias musculares, neurofibromatose, esclerose tuberosa)
- **Doença auto-imune ou do tecido conjuntivo** (Lúpus Eritematoso Sistémico, dermatomiosite, artrite reumatóide, esclerodermia, poliarterite nodosa)
- **Doença cardíaca congénita**
- **Cor pulmonale**
- **Doença do pericárdio**
- **História de irradiação do torax, exposição a antraciclinas ou ciclofosfamida**

Quadro adaptado de: "Report of the 1995 World Health Organization/ International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies "(19);"Contemporary definitions and classification of cardiomyopathies"(20);"Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology working group on myocardial and pericardial diseases" (1).

Table I. ***Exclusion criteria.*** *Patients with secondary and/or specific cardiomyopathies as defined in the table will not be included in the study.*

- **Coronary artery disease:** previous myocardial infarction or ≥50% stenosis in a major epicardial vessel
- **Hypertension:** systolic blood pressure >160 mmHg or diastolic >100 mmHg confirmed in separate assessments, antihypertensive therapy, or target organ damage
- **History of excessive alcohol consumption:** >80 g/day for men and >40 g/day for women
- **Organic valvular disease** (excluding mitral regurgitation secondary to atrioventricular valve annular dilatation)
- **Myocarditis:** secondary to infection or drug abuse (e.g. cocaine)
- **Stress, or takotsubo, cardiomyopathy** - transient regional left ventricular systolic dysfunction, involving mid and apical segments, in the absence of significant stenosis of epicardial arteries
- **Metabolic or endocrine disease** (including diabetes)
- **Infiltrative** (eg. amyloidosis) **or storage disease** (eg. hemochromatosis, Fabry disease)
- **Neuromuscular or neurological disease** (Friedreich's ataxia, muscular dystrophy, neurofibromatosis, tuberous sclerosis)
- **Autoimmune or connective tissue disease** (systemic lupus erythematosus, dermatomyositis, rheumatoid arthritis, scleroderma, polyarteritis nodosa)
- **Congenital heart disease**
- **Cor pulmonale**
- **Pericardial disease**
- **History of chest irradiation or exposure to anthracyclines or cyclophosphamide**

Adapted from (19); (20); (1).

Observação Inicial dos Probandos

Em cada probando, aquando da observação inicial (basal), devem ser obtidos os dados constantes no *quadro II.*

História Familiar

O probando será questionado relativamente à história familiar e esta deve ser idealmente registada no formato de árvore genealógica.

O questionário deverá ser minucioso, incluindo sinais ou sintomas que possam corresponder à presença de insuficiência cardíaca, síncope, morte súbita, AVC, miopatia esquelética, implantação de dispositivos como stroke, skeletal myopathy, and implantation of devices such as pacemakers or cardioverter-defibrillators. The age at which symptoms or interventions occurred, and age at death or current age of the family members in question should be recorded.

Such findings should be confirmed through clinical records whenever possible, or a contact address obtained for confirmation at a later stage. If this is not possible, the reason should be recorded.

Echocardiogram

This exam is extremely important for selection and follow-up of cases.

Echocardiographic quantification of cardiac chambers will be performed according to the recommendations of the American Society of Echocardiography and European Association of Echocardiography [21]. The following will be assessed: left chamber dimensions (atrial and end-diastolic and end-systolic ventricular diameters), septal and left ventricular posterior wall thickness and fractional shortening, by M-mode echocardiography in parasternal long-axis

Quadro II. Informação basal a obter nos casos-index (probandos) de miocardiopatia dilatada

Dados Demográficos	Sintomas de apresentação	História familiar	Exame objectivo	ECG	Eco 2D	Bioquímica	DNA
Data de nascimento	Assintomático	Sinais ou	Peso (Kg)	Ritmo	AE (mm)	Data da	LMNA
Data ou idade do	Fadiga	sintomas de IC	Altura (cm)	FC (bpm)	DTDVE	colheita	MYH7
diagnóstico	Dispneia	Síncope	Pressão arterial	BAV (grau)	DTSVE	BNP	TNNT2
Sexo	Classe NYHA	MS	(mmHg)	Pré-excitação (S/N)	SIV	CK	Outros
CP da naturalidade	Dor torácica	AVC	Congestão	HVE (S/N)	PP		
CP da residência	Palpitações	Miopatia	pulmonar (S/N)	BRE/BRD (S/N)	Fenc.		
actual	Síncope	esquelética	Edema maleolar	Arritmias SV/V (S/N)	FE		
Data da 1ª consulta	Morte Súbita	*Pacemaker*	(S/N)	ARV	PVM		
Data da colheita		CDI					
dos dados							

Legenda: AE= Aurícula esquerda; ARV= Alterações da repolarização ventricular; AVC= Acidente Vascular Cerebral; BNP= B-type Natriuretic Peptide; CP= Código Postal; CK= Creatinocinase total; DTDVE= Diametro telediastólico do ventrículo esquerdo; DTSVE= Diametro telesistólico do ventrículo esquerdo; ECG= Electrocardiograma; Eco-2D= Ecocardiograma transtorácico bidimensional; FE= Fracção de ejecção; Fenc.= Fracção de encurtamento; IC= Insuficiência Cardíaca; LMNA= Lâmina nuclear A/C; MYH7= Cadeia pesada ,-miosina; MS= Morte súbita; N= Não; NYHA= New York Heart Association; PP= Parede Posterior; PVM= Prolapso da válvula mitral; S= Sim; SIV= Septo interventricular; SV= Supraventricular; TNNT2= Troponina T cardíaca; V= Ventricular

Table II. Baseline information to be obtained from index cases of dilated cardiomyopathy

Demographic data	Presenting symptoms	Family history	Physical exam	ECG	2D Echo	Bio-chemistry	DNA
Date of birth	Asymptomatic	Signs or	Weight (kg)	Rhythm	LA (mm)	Date of	LMNA
Date or age at diagnosis	Fatigue	symptoms of HF	Height (cm)	HR (bpm)	LVEDD	sampling	MYH7
Gender	Dyspnea	Syncope	Blood pressure	AVB (degree)	LVESD	BNP	TNNT2
Postal code: place of	NYHA class	SD	(mmHg)	Pre-excitation (Y/N)	IVS	CK	Other
birth	Chest pain	Stroke	Pulmonary	LVH (Y/N)	PW		
Postal code: current	Palpitations	Skeletal	congestion (Y/N)	LBBB/RBBB (Y/N)	FS		
residence	Syncope	myopathy	Ankle edema (Y/N)	SV/V arrhythmias	EF		
Date of 1st consult	SD	Pacemaker		(Y/N)	MVP		
Date of data collection		ICD		VRA			

2D echo: two-dimensional transthoracic echocardiogram; AVB: atrioventricular block; BNP: B-type natriuretic peptide; CK: total creatine kinase; ECG: electrocardiogram; EF: ejection fraction; FS: fractional shortening; HF: heart failure; HR: heart rate; ICD: implantable cardioverter-defibrillator; IVS: interventricular septum; LA: left atrium; LBBB: left bundle branch block; LVEDD; left ventricular end-diastolic diameter; LVESD: left ventricular end-systolic diameter; LVH: left ventricular hypertrophy; LMNA: nuclear lamin A/C; MVP: mitral valve prolapse; MYH7: ß-myosin heavy chain; NYHA: New York Heart Association; PW: posterior wall; SD: sudden death; SV/V: supraventricular/ventricular; TNNT2: cardiac troponin T; VRA: ventricular repolarization alterations; Y/N: Yes/No; RBBB: right bundle branch block.

pacemaker ou cardiodesfibrilhador. Deve ser registada a idade da ocorrência destes sintomas ou intervenções, a idade de falecimento ou a idade actual do(s) familiar(es) em causa.

Sempre que possível, e no caso de positividade de algum destes achados, deve ser tentada a sua confirmação através de registos clínicos, ou obtenção do endereço do contacto, para eventual confirmação numa fase posterior. No caso de tal não ser possível, deverá ser registado o motivo.

Ecocardiograma

O rigor desta avaliação reveste-se da maior importância para a selecção e seguimento dos casos.

Na avaliação ecocardiográfica, as medidas

view. Ejection fraction will be calculated in 4-chamber apical view by Simpson's method, with the value calculated as the mean of at least three measurements in each exam. The images will be recorded in digital format.

In cases of a poor acoustic window or technical difficulty in quantifying ejection fraction, a subjective assessment of ventricular function should be made, classified as mildly, moderately or severely impaired. Alternatively, ejection fraction can be obtained by other techniques such as myocardial perfusion scintigraphy, contrast angiography or magnetic resonance imaging.

The presence of mitral valve prolapse (defined as systolic displacement of more than 3 mm of one or both mitral leaflets beyond the plane of

Rev Port Cardiol
Vol. 27 Setembro 08 / September 08

das cavidades cardíacas serão obtidas segundo as normas da American Society of Echocardiography e European Association of Echocardiography [21]. Devem ser quantificadas as dimensões das cavidades esquerdas (diâmetro da aurícula, diâmetros ventricular telediastólico e telesistólico), as espessuras do septo e da parede posterior do ventrículo esquerdo e a fracção de encurtamento, em Modo-M, na incidência paraesternal eixo-longo. A fracção de ejecção será calculada na incidência apical 4 câmaras, pelo método de Simpson. Em cada avaliação o valor calculado deve resultar da média, no mínimo, de 3 determinações. O registo de imagem será realizado em suporte digital.

No caso de a janela acústica ser inadequada, ou de o equipamento não permitir a quantificação da fracção de ejecção, deverá ser efectuada uma avaliação subjectiva da função ventricular, considerada esta como ligeiramente, moderadamente ou gravemente comprometida. Alternativamente, poderá obter-se o valor da fracção de ejecção por outras técnicas como a cintigrafia de perfusão miocárdica, a angiografia de contraste ou a ressonância magnética nuclear.

A presença de prolapso da válvula mitral (definido como deslocamento sistólico, superior a 3 mm, de um ou de ambos os folhetos mitrais, para além do seu plano de inserção em incidência paraesternal eixo-longo), ou de alterações da contractilidade segmentar, que não sejam atribuíveis a perturbações da condução intraventricular, devem ser registados.

Electrocardiograma

Deve ser relatada a frequência cardíaca, o ritmo, a presença de perturbações da condução auriculoventricular ou intraventricular, padrão de pré-excitação, hipertrofia ventricular esquerda (tendo em conta o escalão etário), alterações da repolarização, ou de arritmias supra e/ou ventriculares.

Doseamentos de BNP e CK

No caso de terem sido avaliados numa data próxima à do diagnóstico inicial (definido como intervalo inferior a 3 meses), será incluído o valor plasmático de BNP (B-type natriuretic peptide) ou NTproBNP (N-terminal proBNP) e de CK (creatinocinase total) e os respectivos valores de referência do centro participante.

Colheita de Sangue Periférico

insertion, in parasternal long-axis view) or segmental wall motion abnormalities that are not attributable to intraventricular conduction disturbances should be recorded.

Electrocardiogram

Heart rate, rhythm, atrioventricular or intraventricular conduction defects, pre-excitation, left ventricular hypertrophy (taking account of age), repolarization alterations, and supraventricular and/or ventricular arrhythmias should be recorded.

BNP and CK measurement

Plasma levels of B-type natriuretic peptide (BNP) or N-terminal proBNP and total creatine kinase will be included for patients assessed within three months of initial diagnosis, together with the reference values of the respective center.

Peripheral blood collection

For each index case, 10 ml of blood will be obtained in an EDTA tube for extraction of DNA from peripheral leukocytes. These samples can be sent to the central laboratory by normal mail so long as delivery time does not exceed 48 hours. DNA extraction and screening for mutations will be performed by a single national center with recognized expertise in the area of molecular diagnosis.

In the light of recent publications [13, 22, 23], initial molecular study will include sequencing of three genes: nuclear lamin A/C (LMNA/C), beta myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin T (TNNT2).

Initial classification of index cases

Based on the above analysis, each proband will be classified as follows:

1. Idiopathic DCM
2. Familial DCM
3. Probable familial DCM
4. Possible familial DCM

The criteria for these classifications are set out in *Table III*.

Observation of family members and reclassification of cases

In the second phase of the study, first-degree relatives of the proband aged over 18 will be assessed, with the relationship specified in each case. The initial observation of family members

No doente que constituir o caso - índex de MCD, serão obtidos 10 ml de sangue num tubo de hemograma (com EDTA) para extracção de ADN dos leucócitos periféricos. Esta amostra poderá ser enviado para o laboratório central por correio normal, desde que o tempo de envio não ultrapasse as 48 horas. A extracção de ADN e a respectiva análise mutacional será centralizada e executada num único centro nacional, com credibilidade reconhecida na area do diagnóstico molecular.

Tendo em conta algumas das publicações mais recentes[13, 22, 28], o estudo molecular incluirá, na sua fase inicial, a sequenciação de 3 genes: lâmina nuclear A/C (LMNA/C), cadeia pesada da beta-miosina (MYH7) e troponina T cardíaca (TNNT2).

Classificação Inicial dos Probandos

Após a recolha destes achados, cada probando será classificado como portador de:

1 - MCD idiopática
2 - MCD familiar
3 - MCD provavelmente familiar
4 - MCD possivelmente familiar

Os critérios para a atribuição de cada uma destas classificações estão clarificados no *Quadro III*.

Observação dos Familiares e Reclassificação dos Casos

Na segunda etapa do estudo pretende-se que sejam avaliados os familiares de 1° grau do

will include clinical, electrocardiographic and echocardiographic findings as in the baseline assessment of the proband.

At the end of this phase of the study, family members will be classified as "affected", "unaffected", or "of undetermined phenotype", based on the major and minor criteria set out in *Table IV*.

Subsequently, taking account of the classification of family members, the probands will be reclassified in accordance with *Table V*, to arrive at the final classification for each family.

Long-term follow-up

Three years after the baseline assessment, in the third phase of the study, the individuals observed in the first and second phases of the protocol (index cases and relatives) will be reassessed.

Data to be recorded will include NYHA class and medical therapy at the time of the last consultation, number of hospitalizations for heart failure in the previous year, the dates of any events such as stroke, thromboembolism, heart transplantation, death (and cause), and implantation of a defibrillator or pacemaker or ventricular resynchronization therapy. Findings from the last echocardiogram and electrocardiogram will also be recorded (*Table VI*).

Quadro III. Classificação inicial dos probandos

Table III. Initial classification of index cases

MCD idiopática	***Idiopathic DCM***	**MCD Familiar**	***Familial DCM***	**MCD provavelmente faniliar**	***Probable familial DCM***	**MCD possivelmente familiar**	***Possible familial DCM***
História familiar negativa	*Negative family history*	História confirmada de familiar de 1° grau com MCD ou com MS inexplicada antes dos 35 anos de idade ou com mutação previamente identificada	*Documented history of DCM or unexplained SD before the age of 35 in a first-degree relative or previously identified mutation*	História familiar suspeita, embora não confirmada, de MCD ou de MS antes dos 35 anos	*Suspected but unconfirmed family history of DCM or SD before the age of 35*	História de familiar com AVC ou MS inexplicada antes dos 50 anos de idade ou com implantação de pacemaker ou de cardiodesfibrilhador antes dos 50 anos ou com miopatia esquelética	*Family history of stroke or unexplained SD before the age of 50 or implantation of pacemaker or cardioverter-defibrillator before the age of 50 or skeletal myopathy*

Legenda: AVC= Acidente Vascular Cerebral; MCD= Miocardiopatia Dilatada; MS= Morte Súbita

DCM: dilated cardiomyopathy; SD: sudden death

Rev Port Cardiol
Vol. 27 Setembro 08 / September 08

Quadro IV. Classificação fenotípica dos familiares observados

Afectado: 2 Critérios *major* **ou** DTDVE superior ao percentil 98 e 1 critério *minor* **ou** 3 critérios *minor*
Fenótipo indeterminado: 1 ou 2 critérios *minor*
Não afectado: Ausência de qualquer critério, *major* ou *minor*

Critérios Major
- FE <45% ou Fenc <25%
- DTDVE≥ categoria 3 da tabela de Framingham[18]

Critérios Minor
- Arritmias supraventriculares ou ventriculares inexplicadas antes dos 50 anos
- Bloqueio auriculoventricular do 2º ou 3º grau inexplicado, BRE, doença do nó sinusal
- DTDVE = Categoria 2 da tabela de Framingham[18]
- FE <50% ou Fenc. <28%
- Anomalia da contractilidade segmentar na ausência de defeito da condução intraventricular
- MS inexplicada ou AVC antes dos 50 anos

Legenda: AVC= Acidente vascular cerebral; BRE= Bloqueio de ramo esquerdo; DTDVE= Diâmetro telediastólico do ventrículo esquerdo; FE= Fracção de ejecção, Fenc = Fracção de encurtamento; MS= Morte súbita

Table IV. Phenotypic classification of family members assessed

Affected: two major criteria **or** LVEDD above the 98th percentile plus one minor criterion **or** three minor criteria
Undertermined phenotype: one or two minor criteria
Unaffected: No minor or major criteria

Major criteria
- EF <45% or FS <25%
- LVEDD ≥ category 3 on the Framingham classification[18]

Minor criteria
- Unexplained supraventricular or ventricular arrhythmias before the age of 50
- Unexplained second- or third-degree atrioventricular block, LBBB, sinus node disease
- LVEDD category 2 on the Framingham classification[18]
- EF <50% or FS <28%
- Segmental wall motion abnormalities in the absence of any intraventricular conduction defect
- Unexplained SD or stroke before the age of 50

EF: ejection fraction; FS: fractional shortening; LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter; LBBB: left bundle branch block; SD: sudden death

probando que tenham idade superior a 18 anos.

Para cada elemento observado deve ser discriminado o grau de parentesco. A observação inicial de cada familiar incluirá os achados clínicos, electrocardiográficos e ecocardiográficos, de forma análoga à observação basal efectuada do probando.

Após a conclusão desta fase do estudo, os familiares serão classificados em "afectados", "não-afectados" e "portadores de fenótipo indeterminado", tendo em conta a aplicação dos critérios *major* e *minor* explicitados no *Quadro IV*.

Posteriormente, tendo em conta a classificação dos familiares, os probandos serão reclassificados de acordo com o *Quadro V*, estabelecendo-se assim a classificação final de cada família.

Seguimento a Longo Prazo

Três anos após **cada** observação basal, na fase que constituirá a terceira etapa do estudo, serão reavaliados os indivíduos observados na primeira e segundas fases do protocolo (casos - índex e respectivos familiares).

Serão registados dados sobre a classe NYHA e a terapêutica médica em curso na última consulta, o número de internamentos por insuficiência cardíaca no último ano, a data de ocorrências como AVC, eventos trombo-embólicos, transplante cardíaco, morte (e

Clinical records and statistical analysis

Clinical findings will be recorded on specially designed data records and sent via email or normal mail to the Project Coordination Center of the Portuguese Society of Cardiology for statistical analysis.

DISCUSSION

Our understanding of the pathogenesis of different cardiomyopathies has grown over the last ten years, due in part to significant advances in molecular biology. This knowledge has of course entailed new demands on clinical practice. It is now expected that cardiomyopathy reference centers will provide not only specialized treatment in this area of cardiology, but also the possibility of genetic diagnosis. In the case of familial DCM, it is up to physicians to integrate clinical, imaging and molecular findings with a view to prevention or early treatment of the disease in a patient's family.

Interpretation of molecular results, especially when new mutations are identified, should be based on joint discussions between clinicians, geneticists and molecular biologists. Since a wide variety of genetic alterations are known to be involved in the genesis of familial DCM, establishing a causal link between a mutation and the development of cardiomyopathy should be

Quadro V. Critérios de reclassificação dos probandos

Table V. Criteria for reclassification of probands

MCD idiopática	*Idiopathic DCM*	MCD Familiar	*Familial DCM*	MCD provavelmente familiar	*Probable familial DCM*	MCD possivelmente familiar	*Possible familial DCM*
Todos os familiares observados são não afectados	*All family members assessed are unaffected*	Pelo menos um familiar afectado ou Pelo menos 1 familiar com história confirmada de MS inexplicada antes dos 35 anos ou Mutação identificada	*At least one family member affected or at least one relative with a documented history of unexplained SD before the age of 35 or mutation identified*	História não confirmada de MCD ou de morte súbita antes dos 35 anos	*Unconfirmed history of DCM or SD before the age of 35*	Familiar observados com fenótipo indeterminado ou com AVC, ou MS inexplicada, ou com implantação de pacemaker ou de cardiodesfibrilhador antes dos 50 anos, ou com miopatia esquelética	*Family members assessed with undetermined phenotype or with stroke, unexplained SD, or implantation of pacemaker or cardioverter-defibrillator before the age of 50, or skeletal myopathy*

Legenda: AVC= Acidente Vascular Cerebral; MCD= Miocardiopatia Dilatada; MS= Morte Súbita

DCM: dilated cardiomyopathy; SD: sudden death

Quadro VI. Evolução clínica dos casos - index e dos familiares

Table VI. Clinical evolution of index cases and family members

Sintomas / Evolução clínica	*Symptoms / Clinical course*	Electrocar-diograma	*Electro-cardiogram*	Ecocar-diograma	*Echocar-diogram*	Terapêutica	*Therapy*
Assintomático	*Asymptomatic*	Ritmo	*Rhythm*	AE	*LA*	IECA	*ACEIs*
Classe NYHA	*NYHA class*	FC (bpm)	*HR (bpm)*	DTDVE	*LVEDD*	Bloqueador-Beta	*Beta-blockers*
Nº de internamentos por insuficiência cardíaca	*No. of hospitalizations for heart failure*	BAV (grau)	*AVB (degree)*	DTSVE	*LVESD*	ARA	*ARBs*
		Pré-excitação (S/N)	*Pre-excitation (Y/N)*	SIV	*IVS*	ARAldo	*SARAs*
		HVE (S/N)	*LVH (Y/N)*	PP	*PW*	Diurético	*Diuretics*
AVC	*Stroke*	BRE/BRD (S/N)	*LBBB/RBBB (Y/N)*	Fenc.	*FS*	Digitálico	*Digitalis*
Transplante cardiaco	*Heart transplantation*	Arritmias SV/V (S/N)	*SV/V arrhythmias (Y/N)*	FE	*EF*	RCT	*VRT*
Morte (Causa)	*Death (cause)*	ARV	*VRA*			CDI	*ICD*
						Pacemaker convencional	*Conventional pacemaker*

Legenda: ARA = Antagonista do receptor da angiotensina; ARAldo= Antagonista dos receptores da aldosterona; ARV= Alterações da repolarização ventricular; AVC= Acidente Vascular Cerebral; BAV= Bloqueio auriculoventricular; CDI= Cardiodesfibrilhador implantável; DTDVE= Diametro telediastólico do ventrículo esquerdo; DTSVE= Diametro telesistólico do ventrículo esquerdo; FE= Fracção de ejecção; Fenc= Fracção de encurtamento; IECA= Inibidor da enzima conversora da angiotensina; NYHA= New York Heart Association; RCT= Ressincronização ventricular

ACEIs: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs: angiotensin receptor blockers; AVB: atrioventricular block; EF: ejection fraction; FS: fractional shortening; HR: heart rate; ICD: implantable cardioverter-defibrillator; IVS: interventricular septum; LA: left atrium; LBBB: left bundle branch block; LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter; LVESD: left ventricular end-systolic diameter; LVH: left ventricular hypertrophy; NYHA: New York Heart Association; PW: posterior wall; RBBB: right bundle branch block; SARAs: selective aldosterone receptor antagonists; SV/V: supraventricular/ventricular; VRA: ventricular repolarization alterations; VRT: ventricular resynchronization therapy

respectiva causa), implantação de desfibrilhador, pacemaker ou terapêutica de ressincronização ventricular. Os achados do último ecocardiograma e electrocardiograma serão retidos (*Quadro VI*).

Registos Clínicos e Análise Estatística

Os achados clínicos serão registados no formato de CRD (*cadernos de registo de dados*), e enviados, via Internet ou correio normal, para o Centro Coordenador de Projectos da Sociedade Portuguesa de Cardiologia para futura análise estatística.

based on the fulfillment of certain conditions. Classically, besides the harmful effect on the protein being synthesized, which can be predicted by the type and location of the mutation, absence of the mutation in normal individuals (controls) must be shown or a positive association with the disease demonstrated in linkage studies or in animal models.

The aim of the present study is to obtain epidemiological and molecular data on familial DCM in Portugal and, based on the results, to promote multidisciplinary discussion on optimizing the use of genetic diagnostic techniques in this patient population. Such an

Rev Port Cardiol
Vol. 27 Setembro 08 / September 08

DISCUSSÃO

Na última década tem-se assistido ao crescente conhecimento da etiopatogenia das diferentes miocardiopatias, em parte graças aos avanços significativos na área da biologia molecular. Esse conhecimento trouxe naturalmente novas exigências para a prática clínica. Actualmente é esperado que, ao nível dos centros de referenciação de miocardiopatias, sejam aplicados não só os tratamentos específicos e diferenciados nesta área da cardiologia, mas que também exista a possibilidade de obtenção do diagnóstico genético. No caso das MCDF cabe ao médico integrar os achados clínicos, imagiológicos e moleculares com o intuito de prevenir ou tratar precocemente a afecção entre os familiares.

A interpretação dos resultados moleculares, sobretudo quando são detectadas novas alterações genéticas, deve ser fruto de discussão conjunta entre os clínicos, geneticistas e especialistas em biologia molecular. Sabendo-se, à *priori*, da enorme variedade de alterações genéticas envolvidas na génese das MCDF, o estabelecimento da relação de causualidade entre uma mutação e o aparecimento da miocardiopatia, necessita do cumprimento de alguns pressupostos. Assim, classicamente, para além do efeito nefasto na proteína sintetizada, previsto pelo tipo e localização da mutação, deve ser demonstrada a sua inexistência em indivíduos (controlos) normais, ou verificada uma associação positiva da mesma com a doença, quer em estudos de linkage, quer em modelos animais.

Neste trabalho multicêntrico pretende-se obter dados de carácter epidemiológico e molecular sobre as MCDF em Portugal e, com base nos resultados obtidos, estimular a discussão multidisciplinar, atinente à optimização da aplicação das técnicas de diagnóstico genético nesta população de doentes. Este objectivo parece particularmente pertinente numa altura em que se expande a oferta de laboratórios com capacidade de realização de diagnósticos genéticos e tendo em conta a escassez de informação relativa aos casos de MCDF na população portuguesa. Além disso, apesar de ser reconhecido que cerca de 30% dos casos de MCD são de origem familiar, é ainda desconhecida a percentagem relativa de diagnósticos moleculares "positivos" em cada um

aim is particularly relevant at a time when a growing number of laboratories are able to perform genetic studies, bearing in mind that there is little information on familial DCM among the Portuguese population. Furthermore, although it is recognized that around 30% of cases of DCM are of familial origin, the relative percentage of positive molecular diagnosis in patients with familial and idiopathic DCM is still unknown.

The fact that the centers selected to participate in the study will be mainly cardiomyopathy reference centers and university hospitals obviously means that there will be bias in the sample analyzed, with the risk that more patients at the most severe end of the clinical spectrum will tend to be included.

This approach was however felt to be necessary given the need to apply strict diagnostic criteria, so as to overcome the lack of specificity and sensitivity of criteria to identify familial DCM. The careful identification of cases is an essential step for the success of molecular analysis.

Besides these criteria, setting age limits and exclusion criteria will of course limit the applicability of epidemiological conclusions. Again, this was felt to be necessary for ease of execution of the study and to enable molecular results to be obtained.

European Society of Cardiology criteria will be used to define familial DCM, although left ventricular dimensions will be calculated on the basis of height and gender in accordance with the Framingham classification rather than the Henry equation proposed by the ESC, as the former have been validated in adult populations and are easy to apply in practice. While magnetic resonance imaging is the technique of choice for morphological characterization, it is not yet available in all centers and so was not considered mandatory.

DNA extracted from the peripheral blood of index cases will be sent to a single national laboratory with the technical expertise to perform molecular study. On the basis of the latest published results, the laboratory will initially screen for mutations in the nuclear lamin genes and those encoding sarcomere proteins, the beta myosin heavy chain and cardiac troponin T.

In conclusion, it is hoped that the results of this multicenter study on familial DCM will

dos grupos de doentes, isto é, de MCDF e de MCD idiopática.

Neste estudo, a selecção dos centros participantes, privilegiando aqueles de referenciação de miocardiopatias e os hospitais universitários, implica o óbvio enviesamento da amostra analisada, com risco de serem avaliados os doentes com o espectro clínico mais grave.

Tal escolha considera-se contudo necessária face à necessidade de aplicação de critérios de diagnóstico precisos, de forma a colmatar a falta de especificidade/sensibilidade dos mesmos para a identificação das MCDF. A criteriosa identificação dos casos é um passo essencial para o sucesso da análise molecular ulterior.

Para além deste critério de selecção, a imposição de limites etários e de critérios de exclusão irá limitar obviamente a interpretação das conclusões de carácter epidemiológico. Parece-nos contudo necessário manter estas limitações, para facilitar a exequibilidade do estudo e possibilitar a obtenção de resultados moleculares.

Serão utilizados os critérios da Sociedade Europeia de Cardiologia para a definição de MCDF, embora a valorização das dimensões do ventrículo esquerdo seja feita em função da altura e do sexo, segundo as Tabelas de Framinghan, e não segundo os critérios de Henry propostos pela mesma Sociedade. Os critérios de Framinghan estão validados na população adulta e são de fácil aplicação prática. Apesar da ressonância magnética nuclear constituir uma técnica de eleição para a caracterização morfológica, não se encontra ainda actualmente disponível em todos os centros, motivo pelo qual não foi considerada de realização obrigatória.

O ADN obtido a partir do sangue periférico dos casos-index será enviado para um único laboratório nacional com capacidade técnica para a realização do estudo molecular. Neste laboratório, tendo em conta os resultados publicados mais recentemente, será efectuada, numa fase inicial, a pesquisa de mutações nos genes da lâmina nuclear e nos genes das proteínas sarcoméricas, cadeia pesada da ß-miosina e troponina T cardíaca.

Como conclusão, após a concretização deste trabalho multicêntrico sobre as MCDF espera-se obter um substrato útil para discussões frutíferas entre os diversos centros nacionais, incluindo os laboratórios de biologia molecular, com interesse

provide a useful foundation for fruitful discussions between the various national centers interested in cardiomyopathies, including molecular biology laboratories, that will contribute to the implementation of new protocols and stimulate research in this area.

Rev Port Cardiol
Vol. 27 Setembro 08 / September 08

em miocardiopatias, que possa contribuir para a implementação de novos protocolos ou trabalhos de investigação nesta área.

Pedidos de separatas para:
Address for reprints:
ELISABETE MARTINS
Serviço de Cardiologia
Hospital de S. João
4200-319 Porto
E-mail: bernardes_med@hotmail.com

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Elliot P, Andersson B, Arbustini E et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Eur Heart J 2007: in press.

2. Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Eur Heart Journal 1999; 20: 93-102.

3. Henry WL, Gardin JM, Ware JH. Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. Circulation 1980; 62: 1054-61.

4. Michels VV, Moll PP, Miller FA, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 1992; 326: 77-82.

5. Keeling PJ, Gang Y, Smith G et al. Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. Br Heart J 1995; 73: 417-421.

6. Grünig E, Tasman JA, Kücherer H et al. Frequency and Phenotypes of Familial Dilated Cardiomyopathy. J Am Coll Card 1998; 31:186-94.

7. Mestroni L, Rocco C, Gregori D et al. Familial Dilated Cardiomyopathy: Evidence for Genetic and Phenotypic Heterogeneity. J Am Coll Card 1999; 34: 181-190.

8. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T et al. Missense Mutations in the Rod Domain of the Lamin A/C Gene as Causes of Dilated Cardiomyopathy and Conduction-System Disease. N Eng J Med 1999; 341; 1715-24.

9. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M et al. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 2000; 106: 655-62.

10. Schönberger J, Wang L, Shin JT et al. Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. Nat Genet 2005; 37(4): 418-22.

11. Taylor M, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. OJRD 2006; 1:27

12. Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Card 2005; 45:969-81.

13. Kamisago M, Sharma SD, Depalma SR et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. N Eng J Med 2000; 343: 1688-96.

14. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M et al. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 2000; 106: 655-62.

15. Perrot A, Sigusch HH, Nagele H et al. Genetic and phenotypic analysis of dilated cardiomyopathy with conduction system disease: Demand for strategies in the management of presymptomatic lamin A/C mutant carriers. Eur J Heart Fail 2006; 8: 484-493.

16. Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. Nat Genet 2004; 36: 382-7

17. McNair WP, Ku L, Taylor MRG et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder and arrhythmia. Circulation 2004; 110: 2163-67.

18. Vasan R, Larson M, Levy D, Evans J, Benjamin E. Distribution and categorization of echocardiographic measurements in relation to reference limits. The Framingham Heart Study: formulation of height and sex-specific classification and its prospective validation. Circulation 1997; 96:1863-73

19. Richardson P, McKenna W, Brislow M et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. Circulation 1996; 93:841-42.

20. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al. Contemporary definitions and classification of cardiomyopathies. Circulation 2006; 113: 1807-16.

21. Lang RM, Bierig M, Devereux RB et al. Recommendations for chamber quantification. Eur J Echocardiography 2006; 7:79-108.

22. Van Tintelen JP, Hofstra RM, Katerberg H et al. High yield of LMNA mutations in patients with dilated cardiomyopathy and/or conduction disease referred to cardiogenetics outpatients' clinics. Am Heart J 2007; 154 (6): 1130-9.

23. Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P et al. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of beta myosin heavy chain gene. Eur Heart J 2005; 26; 794-803.

Bibliografia

1 Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Eur Heart J 2008;29:270-6.

2 Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. Br Heart J 1980;44:672-3.

3 Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. Circulation 1996;93:841-2.

4 Manolio TA, Baughman KL, Rodeheffer R, et al. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. Am J Cardiol 1992;69:1458-66.

5 Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ, 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. Circulation 1989;80:564-72.

6 Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. Eur Heart J 1999;20:93-102.

7 Henry WL, Gardin JM, Ware JH. Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. Circulation 1980;62:1054-61.

8 Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Eur J Heart Fail 2008;10:933-89.

9 Felker GM, Thompson RE, Hare JM, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. N Engl J Med 2000;342:1077-84.

10 Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. N Engl J Med 2002;347:1397-402.

11 Rakar S, Sinagra G, Di Lenarda A, et al. Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The Heart Muscle Disease Study Group. Eur Heart J 1997;18:117-23.

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

13 Whitfield AG. Familial cardiomyopathy. Q J Med 1961;30:119-34.

14 Pierce JA, Price BO, Joyce JW. Familial occurrence of postpartal heart failure. Arch Intern Med 1963;111:651-5.

15 MacLennan BA, Tsoi EY, Maguire C, Adgey AA. Familial idiopathic congestive cardiomyopathy in three generations: a family study with eight affected members. Q J Med 1987;63:335-47.

16 Pozzi R, Arbustini E, Gavazzi A, et al. [Progressive changes in the lymphocyte subpopulations and the clinical picture in 2 brothers with familial dilated cardiomyopathy]. G Ital Cardiol 1989;19:161-5.

17 Wermut W, Tomaszewski R, Szpajer M, Kloda E. Familial dilated (congestive) cardiomyopathy. Mater Med Pol 1989;21:116-8.

18 Goldblatt J, Melmed J, Rose AG. Autosomal recessive inheritance of idiopathic dilated cardiomyopathy in a Madeira Portuguese kindred. Clin Genet 1987;31:249-54.

19 Voss EG, Reddy CV, Detrano R, Virmani R, Zabriskie JB, Fotino M. Familial dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1984;54:456-7.

20 Pearl W. Familial occurrence of peripartum cardiomyopathy. Am Heart J 1995;129:421-2.

21 Shapiro LM, Rozkovec A, Cambridge G, Hallidie-Smith KA, Goodwin JF. Myocarditis in siblings leading to chronic heart failure. Eur Heart J 1983;4:742-6.

22 Baruteau AE, Leurent G, Schleich JM, Gervais R, Daubert JC, Mabo P. Can peripartum cardiomyopathy be familial? Int J Cardiol 2008.

23 Keren A, Billingham ME, Popp RL. Features of mildly dilated congestive cardiomyopathy compared with idiopathic restrictive cardiomyopathy and typical dilated cardiomyopathy. J Am Soc Echocardiogr 1988;1:78-87.

24 Greenlee PR, Anderson JL, Lutz JR, Lindsay AE, Hagan AD. Familial automaticity--conduction disorder with associated cardiomyopathy. West J Med 1986;144:33-41.

25 Gardner RJ, Hanson JW, Ionasescu VV, et al. Dominantly inherited dilated cardiomyopathy. Am J Med Genet 1987;27:61-73.

26 Keren A, Billingham ME, Weintraub D, Stinson EB, Popp RL. Mildly dilated congestive cardiomyopathy. Circulation 1985;72:302-9.

27 Hirakawa Y, Koyanagi S, Matsumoto T, Itaya R, Takeshita A, Nakamura M. Familial dilated cardiomyopathy complicated by left ventricular aneurysm. Jpn Heart J 1990;31:245-9.

28 Fuster V, Gersh BJ, Giuliani ER, Tajik AJ, Brandenburg RO, Frye RL. The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1981;47:525-31.

29 Michels VV, Moll PP, Miller FA, et al. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 1992;326:77-82.

30 Vincenzo Fragola P, Autore C, Picelli A, Sommariva L, Cannata D, Sangiorgi M. Familial idiopathic dilated cardiomyopathy. Am Heart J 1988;115:912-4.

31 Zachara E, Caforio AL, Carboni GP, et al. Familial aggregation of idiopathic dilated cardiomyopathy: clinical features and pedigree analysis in 14 families. Br Heart J 1993;69:129-35.

32 Keeling PJ, Gang Y, Smith G, et al. Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. Br Heart J 1995;73:417-21.

33 Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1998;31:186-94.

34 McKenna CJ, Codd MB, McCann HA, Sugrue DD. Idiopathic dilated cardiomyopathy: familial prevalence and HLA distribution. Heart 1997;77:549-52.

35 Mestroni L, Rocco C, Gregori D, et al. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. J Am Coll Cardiol 1999;34:181-90.

36 Valantine HA, Hunt SA, Fowler MB, Billingham ME, Schroeder JS. Frequency of familial nature of dilated cardiomyopathy and usefulness of cardiac transplantation in this subset. Am J Cardiol 1989;63:959-63.

37 Monserrat L, Hermida M, Bouzas B, et al. [Familial dilated cardiomyopathy in patients transplanted for idiopathic dilated cardiomyopathy]. Rev Esp Cardiol 2002;55:725-32.

38 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.

39 Coplan NL, Fuster V. Natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. Implications for future therapy. Herz 1985;10:298-304.

40 Michels VV, Driscoll DJ, Miller FA, Jr. Familial aggregation of idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1985;55:1232-3.

41 Mestroni L, Miani D, Di Lenarda A, et al. Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1990;65:1449-53.

42 Gavazzi A, Repetto A, Scelsi L, et al. Evidence-based diagnosis of familial non-X-linked dilated cardiomyopathy. Prevalence, inheritance and characteristics. Eur Heart J 2001;22:73-81.

43 Kushner JD, Nauman D, Burgess D, et al. Clinical characteristics of 304 kindreds evaluated for familial dilated cardiomyopathy. J Card Fail 2006;12:422-9.

44 Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. Cell 1990;62:999-1006.

45 Arbustini E, Morbini P, Pilotto A, Gavazzi A, Tavazzi L. Familial dilated cardiomyopathy: from clinical presentation to molecular genetics. Eur Heart J 2000;21:1825-32.

46 Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2005;45:969-81.

47 Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. Circulation 1993;87:1854-65.

48 Kass S, MacRae C, Graber HL, et al. A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. Nat Genet 1994;7:546-51.

49 Gedeon AK, Wilson MJ, Colley AC, Sillence DO, Mulley JC. X linked fatal infantile cardiomyopathy maps to Xq28 and is possibly allelic to Barth syndrome. J Med Genet 1995;32:383-8.

50 Krajinovic M, Pinamonti B, Sinagra G, et al. Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart Muscle Disease Study Group. Am J Hum Genet 1995;57:846-52.

51 Durand JB, Bachinski LL, Bieling LC, et al. Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32. Circulation 1995;92:3387-9.

52 Olson TM, Keating MT. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. J Clin Invest 1996;97:528-32.

53 Bowles KR, Gajarski R, Porter P, et al. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. J Clin Invest 1996;98:1355-60.

54 Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. Am J Hum Genet 1997;61:909-17.

55 van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, Bolhuis PA. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. Am J Hum Genet 1997;60:891-5.

56 Siu BL, Niimura H, Osborne JA, et al. Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31. Circulation 1999;99:1022-6.

57 Jung M, Poepping I, Perrot A, et al. Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. Am J Hum Genet 1999;65:1068-77.

58 Schonberger J, Levy H, Grunig E, et al. Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndrome that maps to 6q23-24. Circulation 2000;101:1812-8.

59 Sylvius N, Tesson F, Gayet C, et al. A new locus for autosomal dominant dilated cardiomyopathy identified on chromosome 6q12-q16. Am J Hum Genet 2001;68:241-6.

60 Song L, DePalma SR, Kharlap M, et al. Novel locus for an inherited cardiomyopathy maps to chromosome 7. Circulation 2006;113:2186-92.

61 Ellinor PT, Sasse-Klaassen S, Probst S, et al. A novel locus for dilated cardiomyopathy, diffuse myocardial fibrosis, and sudden death on chromosome 10q25-26. J Am Coll Cardiol 2006;48:106-11.

62 Perrot A, Sigusch HH, Nagele H, et al. Genetic and phenotypic analysis of dilated cardiomyopathy with conduction system disease: demand for strategies in the management of presymptomatic lamin A/C mutant carriers. Eur J Heart Fail 2006;8:484-93.

63 Arbustini E, Pilotto A, Repetto A, et al. Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease. J Am Coll Cardiol 2002;39:981-90.

64 Bilinska ZT, Sylvius N, Grzybowski J, et al. Dilated cardiomyopathy caused by LMNA mutations. Clinical and morphological studies. Kardiol Pol 2006;64:812-9; discussion 20-1.

65 Pasotti M, Klersy C, Pilotto A, et al. Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiolaminopathies. J Am Coll Cardiol 2008;52:1250-60.

66 Otomo J, Kure S, Shiba T, et al. Electrophysiological and histopathological characteristics of progressive atrioventricular block accompanied by familial dilated cardiomyopathy caused by a novel mutation of lamin A/C gene. J Cardiovasc Electrophysiol 2005;16:137-45.

67 van Tintelen JP, Hofstra RM, Katerberg H, et al. High yield of LMNA mutations in patients with dilated cardiomyopathy and/or conduction disease referred to cardiogenetics outpatient clinics. Am Heart J 2007;154:1130-9.

68 Hershberger RE, Hanson EL, Jakobs PM, et al. A novel lamin A/C mutation in a family with dilated cardiomyopathy, prominent conduction system disease, and need for permanent pacemaker implantation. Am Heart J 2002;144:1081-6.

69 Jakobs PM, Hanson EL, Crispell KA, et al. Novel lamin A/C mutations in two families with dilated cardiomyopathy and conduction system disease. J Card Fail 2001;7:249-56.

70 McNair WP, Ku L, Taylor MR, et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. Circulation 2004;110:2163-7.

71 Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, et al. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. Circ Res 2003;92:14-22.

72 Finsterer J, Stollberger C. Primary myopathies and the heart. Scand Cardiovasc J 2008;42:9-24.

73 Srinivasan R, Hornyak JE, Badenhop DT, Koch LG. Cardiac rehabilitation after heart transplantation in a patient with Becker's muscular dystrophy: a case report. Arch Phys Med Rehabil 2005;86:2059-61.

74 Poppe M, Bourke J, Eagle M, et al. Cardiac and respiratory failure in limb-girdle muscular dystrophy 2I. Ann Neurol 2004;56:738-41.

75 Sanna T, Dello Russo A, Toniolo D, et al. Cardiac features of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by lamin A/C gene mutations. Eur Heart J 2003;24:2227-36.

76 Chebel S, Ben Hamda K, Boughammoura A, Frih Ayed M, Ben Farhat MH. [Cardiac involvement in Steinert's myotonic dystrophy]. Rev Neurol (Paris) 2005;161:932-9.

77 Schonberger J, Wang L, Shin JT, et al. Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. Nat Genet 2005;37:418-22.

78 Wang L, Sewell WF, Kim SD, et al. Eya4 regulation of Na+/K+-ATPase is required for sensory system development in zebrafish. Development 2008;135:3425-34.

79 Schonberger J, Ertl G. [Monogenic heart disease]. Med Klin (Munich) 2008;103:166-74.

80 Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. Annu Rev Genomics Hum Genet 2005;6:185-216.

81 Olson TM. What makes the heart fail? New insights from defective genes. Acta Paediatr Suppl 2006;95:17-21.

82 Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, et al. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. Eur Heart J 2005;26:794-803.

83 Hershberger RE, Parks SB, Kushner JD, et al. Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. Clin Transl Sci 2008;1:21-6.

84 Moller DV, Andersen PS, Hedley P, et al. The role of sarcomere gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Eur J Hum Genet 2009;17:1241-9.

85 Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, et al. Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a european population of dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 2000;21:1872-6.

86 Barresi R, Di Blasi C, Negri T, et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. J Med Genet 2000;37:102-7.

87 Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. Science 1998;280:750-2.

88 Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, et al. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. Circulation 1999;100:461-4.

89 Inagaki N, Hayashi T, Arimura T, et al. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2006;342:379-86.

90 Michels VV, Pastores GM, Moll PP, et al. Dystrophin analysis in idiopathic dilated cardiomyopathy. J Med Genet 1993;30:955-7.

91 Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch BM. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. Circulation 2002;105:431-7.

92 Gerull B, Gramlich M, Atherton J, et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. Nat Genet 2002;30:201-4.

93 Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, et al. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. Mol Genet Metab 2003;80:207-15.

94 Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 2000;343:1688-96.

95 Murphy RT, Mogensen J, Shaw A, Kubo T, Hughes S, McKenna WJ. Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. Lancet 2004;363:371-2.

96 Olson TM, Kishimoto NY, Whitby FG, Michels VV. Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2001;33:723-32.

97 Brodsky GL, Muntoni F, Miocic S, Sinagra G, Sewry C, Mestroni L. Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. Circulation 2000;101:473-6.

98 Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, et al. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. Science 2003;299:1410-3.

99 Li D, Parks SB, Kushner JD, et al. Mutations of presenilin genes in dilated cardiomyopathy and heart failure. Am J Hum Genet 2006;79:1030-9.

100 Raharjo WH, Enarson P, Sullivan T, Stewart CL, Burke B. Nuclear envelope defects associated with LMNA mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. J Cell Sci 2001;114:4447-57.

101 Ambrosi P, Mouly-Bandini A, Attarian S, Habib G. Heart transplantation in 7 patients from a single family with limb-girdle muscular dystrophy caused by lamin A/C mutation. Int J Cardiol 2009.

102 Muschke P, Kolsch U, Jakubiczka S, Wieland I, Brune T, Wieacker P. The heterozygous LMNA mutation p.R471G causes a variable phenotype with features of two types of familial partial lipodystrophy. Am J Med Genet A 2007;143A:2810-4.

103 Verstraeten VL, Broers JL, van Steensel MA, et al. Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. Hum Mol Genet 2006;15:2509-22.

104 Tazir M, Azzedine H, Assami S, et al. Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. Brain 2004;127:154-63.

105 Thill M, Nguyen TD, Wehnert M, et al. Restrictive dermopathy: a rare laminopathy. Arch Gynecol Obstet 2008;278:201-8.

106 Hermida-Prieto M, Monserrat L, Castro-Beiras A, et al. Familial dilated cardiomyopathy and isolated left ventricular noncompaction associated with lamin A/C gene mutations. Am J Cardiol 2004;94:50-4.

107 Norton JB, Cairns NJ, Chakraverty S, et al. Presenilin1 G217R mutation linked to Alzheimer disease with cotton wool plaques. Neurology 2009;73:480-2.

108 Watkins H, Seidman CE, Seidman JG, Feng HS, Sweeney HL. Expression and functional assessment of a truncated cardiac troponin T that causes hypertrophic cardiomyopathy. Evidence for a dominant negative action. J Clin Invest 1996;98:2456-61.

109 Peddy SB, Vricella LA, Crosson JE, et al. Infantile restrictive cardiomyopathy resulting from a mutation in the cardiac troponin T gene. Pediatrics 2006;117:1830-3.

110 Arimura T, Hayashi T, Matsumoto Y, et al. Structural analysis of four and half LIM protein-2 in dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2007;357:162-7.

111 Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. Biochem Biophys Res Commun 1999;262:411-7.

112 Hackman JP, Vihola AK, Udd AB. The role of titin in muscular disorders. Ann Med 2003;35:434-41.

113 Selcen D. Myofibrillar myopathies. Curr Opin Neurol 2008;21:585-9.

114 Walter MC, Reilich P, Huebner A, et al. Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. Brain 2007;130:1485-96.

115 Pruszczyk P, Kostera-Pruszczyk A, Shatunov A, et al. Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular conduction block resulting from a desmin mutation. Int J Cardiol 2007;117:244-53.

116 Kaski JP, Burch M, Elliott PM. Mutations in the cardiac Troponin C gene are a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy in childhood. Cardiol Young 2007;17:675-7.

117 Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. Prog Biophys Mol Biol 2008;98:120-36.

118 Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Marie SK, Oliveira AS, Zatz M. Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. J Neurol Sci 1999;164:44-9.

119 Wayne S, Robertson NG, DeClau F, et al. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. Hum Mol Genet 2001;10:195-200.

120 Chiu C, Tebo M, Ingles J, et al. Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2007;43:337-43.

121 Murakami T, Hayashi YK, Noguchi S, et al. Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. Ann Neurol 2006;60:597-602.

122 Colombo R, Bignamini AA, Carobene A, et al. Age and origin of the FCMD 3'-untranslated-region retrotransposal insertion mutation causing Fukuyama-type congenital muscular dystrophy in the Japanese population. Hum Genet 2000;107:559-67.

123 Godfrey C, Escolar D, Brockington M, et al. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. Ann Neurol 2006;60:603-10.

124 de Bernabe DB, van Bokhoven H, van Beusekom E, et al. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. J Med Genet 2003;40:845-8.

125 Duboscq-Bidot L, Xu P, Charron P, et al. Mutations in the Z-band protein myopalladin gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. Cardiovasc Res 2008;77:118-25.

126 Arimura T, Hayashi T, Terada H, et al. A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. J Biol Chem 2004;279:6746-52.

127 Duboscq-Bidot L, Charron P, Ruppert V, et al. Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 2009;30:2128-36.

128 Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. Ann Neurol 2005;57:269-76.

129 Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, et al. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. J Am Coll Cardiol 2003;42:2014-27.

130 Theis JL, Bos JM, Bartleson VB, et al. Echocardiographic-determined septal morphology in Z-disc hypertrophic cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2006;351:896-902.

131 Daehmlow S, Erdmann J, Knueppel T, et al. Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2002;298:116-20.

132 Bonne G, Carrier L, Bercovici J, et al. Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. Nat Genet 1995;11:438-40.

133 Geier C, Gehmlich K, Ehler E, et al. Beyond the sarcomere: CSRP3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. Hum Mol Genet 2008;17:2753-65.

134 Berry V, Francis P, Reddy MA, et al. Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. Am J Hum Genet 2001;69:1141-5.

135 Selcen D, Engel AG. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. Ann Neurol 2003;54:804-10.

136 Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, et al. ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. Nat Genet 2004;36:382-7.

137 Taylor MR, Slavov D, Gajewski A, et al. Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. Hum Mutat 2005;26:566-74.

138 Brauch KM, Karst ML, Herron KJ, et al. Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2009;54:930-41.

139 Klaassen S, Probst S, Oechslin E, et al. Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. Circulation 2008;117:2893-901.

140 Shingde MV, Spring PJ, Maxwell A, et al. Myosin storage (hyaline body) myopathy: a case report. Neuromuscul Disord 2006;16:882-6.

141 Overeem S, Schelhaas HJ, Blijham PJ, et al. Symptomatic distal myopathy with cardiomyopathy due to a MYH7 mutation. Neuromuscul Disord 2007;17:490-3.

142 Cruts M, Van Broeckhoven C. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. Hum Mutat 1998;11:183-90.

143 Dermaut B, Kumar-Singh S, Engelborghs S, et al. A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques. Ann Neurol 2004;55:617-26.

144 Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, et al. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. J Clin Invest 1999;103:R39-43.

145 Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, et al. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. Cell 1994;77:701-12.

146 Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, et al. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2004;44:2192-201.

147 Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. Nat Genet 2000;24:163-6.

148 Mogensen J, Murphy RT, Kubo T, et al. Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2004;44:2315-25.

149 Kostareva A, Gudkova A, Sjoberg G, et al. Deletion in TNNI3 gene is associated with restrictive cardiomyopathy. Int J Cardiol 2009;131:410-2.

150 D'Adamo P, Fassone L, Gedeon A, et al. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. Am J Hum Genet 1997;61:862-7.

151 Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. Neurology 1989;39:465-74.

152 Ades LC, Gedeon AK, Wilson MJ, et al. Barth syndrome: clinical features and confirmation of gene localisation to distal Xq28. Am J Med Genet 1993;45:327-34.

153 Chen R, Tsuji T, Ichida F, et al. Mutation analysis of the G4.5 gene in patients with isolated left ventricular noncompaction. Mol Genet Metab 2002;77:319-25.

154 Towbin JA. The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. Curr Opin Cell Biol 1998;10:131-9.

155 Hoshijima M, Pashmforoush M, Knoll R, Chien KR. The MLP family of cytoskeletal Z disc proteins and dilated cardiomyopathy: a stress pathway model for heart failure progression. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2002;67:399-408.

156 Schonberger J, Seidman CE. Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. Am J Hum Genet 2001;69:249-60.

157 Schmitt JP, Debold EP, Ahmad F, et al. Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:14525-30.

158 Simon AJ. Nuclear lamina organization and new functions. The wall and yard guardians of gene expression. FEBS J 2007;274:1353.

159 Menon SC, Michels VV, Pellikka PA, et al. Cardiac troponin T mutation in familial cardiomyopathy with variable remodeling and restrictive physiology. Clin Genet 2008;74:445-54.

160 Stromer MH. The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. Histol Histopathol 1998;13:283-91.

161 Schaper J, Froede R, Hein S, et al. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. Circulation 1991;83:504-14.

162 Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. Cell 2002;111:943-55.

163 Gwathmey JK, Warren SE, Briggs GM, et al. Diastolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Effect on active force generation during systole. J Clin Invest 1991;87:1023-31.

164 Holt KH, Lim LE, Straub V, et al. Functional rescue of the sarcoglycan complex in the BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. Mol Cell 1998;1:841-8.

165 Maloyan A, Sanbe A, Osinska H, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. Circulation 2005;112:3451-61.

166 Dunand M, Lobrinus JA, Jeannet PY, et al. Confirmation that abnormal desmin accumulation and migration are due to a desmin gene mutation in a familial cardiomyopathy and distal myopathy. Neuromuscul Disord 2009.

167 Mavroidis M, Panagopoulou P, Kostavasili I, Weisleder N, Capetanaki Y. A missense mutation in desmin tail domain linked to human dilated cardiomyopathy promotes cleavage of the head domain and abolishes its Z-disc localization. FASEB J 2008;22:3318-27.

168 Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. Trends Cardiovasc Med 2002;12:339-48.

169 Capetanaki Y, Milner DJ. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. Subcell Biochem 1998;31:463-95.

170 Gard JJ, Yamada K, Green KG, et al. Remodeling of gap junctions and slow conduction in a mouse model of desmin-related cardiomyopathy. Cardiovasc Res 2005;67:539-47.

171 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. J Cell Biol 1997;139:375-85.

172 Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. Cell 1999;98:465-74.

173 Wheeler MT, Allikian MJ, Heydemann A, Hadhazy M, Zarnegar S, McNally EM. Smooth muscle cell-extrinsic vascular spasm arises from cardiomyocyte degeneration in sarcoglycan-deficient cardiomyopathy. J Clin Invest 2004;113:668-75.

174 Gnecchi-Ruscone T, Taylor J, Mercuri E, et al. Cardiomyopathy in duchenne, becker, and sarcoglycanopathies: a role for coronary dysfunction? Muscle Nerve 1999;22:1549-56.

175 Matsumoto Y, Hayashi T, Inagaki N, et al. Functional analysis of titin/connectin N2-B mutations found in cardiomyopathy. J Muscle Res Cell Motil 2005;26:367-74.

176 Frey N, Olson EN. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. J Biol Chem 2002;277:13998-4004.

177 Bovill E, Westaby S, Crisp A, Jacobs S, Shaw T. Reduction of four-and-a-half LIM-protein 2 expression occurs in human left ventricular failure and leads to altered localization and reduced activity of metabolic enzymes. J Thorac Cardiovasc Surg 2009;137:853-61.

178 Smith L, Tainter C, Regnier M, Martyn DA. Cooperative cross-bridge activation of thin filaments contributes to the Frank-Starling mechanism in cardiac muscle. Biophys J 2009;96:3692-702.

179 Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. Circ Res 2000;86:386-90.

180 Rajan S, Ahmed RP, Jagatheesan G, et al. Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. Circ Res 2007;101:205-14.

181 Morimoto S, Lu QW, Harada K, et al. Ca(2+)-desensitizing effect of a deletion mutation Delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:913-8.

182 Venkatraman G, Harada K, Gomes AV, Kerrick WG, Potter JD. Different functional properties of troponin T mutants that cause dilated cardiomyopathy. J Biol Chem 2003;278:41670-6.

183 Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, et al. A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. Circ Res 1998;82:106-15.

184 Yanaga F, Morimoto S, Ohtsuki I. Ca2+ sensitization and potentiation of the maximum level of myofibrillar ATPase activity caused by mutations of troponin T found in familial hypertrophic cardiomyopathy. J Biol Chem 1999;274:8806-12.

185 Robinson P, Mirza M, Knott A, et al. Alterations in thin filament regulation induced by a human cardiac troponin T mutant that causes dilated cardiomyopathy are distinct from those induced by troponin T mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy. J Biol Chem 2002;277:40710-6.

186 Dweck D, Hus N, Potter JD. Challenging current paradigms related to cardiomyopathies. Are changes in the Ca2+ sensitivity of myofilaments containing cardiac troponin C mutations (G159D and L29Q) good predictors of the phenotypic outcomes? J Biol Chem 2008;283:33119-28.

187 Sfichi-Duke L, Garcia-Cazarin ML, Sumandea CA, et al. Cardiomyopathy-causing deletion K210 in cardiac troponin T alters phosphorylation propensity of sarcomeric proteins. J Mol Cell Cardiol 2010.

188 Du CK, Morimoto S, Nishii K, et al. Knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. Circ Res 2007;101:185-94.

189 Turner JD, Thomas AP, Reeves JP, Hantash BM. Calcineurin activation by slow calcium release from intracellular stores suppresses protein kinase C regulation of L-type calcium channels in L6 cells. Cell Calcium 2009.

190 Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, Walker C, Fishman M, Stainier DY. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. Nat Genet 2002;31:106-10.

191 Gerace L, Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. Annu Rev Cell Biol 1988;4:335-74.

192 Liu J, Rolef Ben-Shahar T, Riemer D, et al. Essential roles for Caenorhabditis elegans lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. Mol Biol Cell 2000;11:3937-47.

193 Lammerding J, Fong LG, Ji JY, et al. Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. J Biol Chem 2006;281:25768-80.

194 Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. J Struct Biol 1998;122:42-66.

195 Moir RD, Yoon M, Khuon S, Goldman RD. Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. J Cell Biol 2000;151:1155-68.

196 Moir RD, Spann TP, Lopez-Soler RI, et al. Review: the dynamics of the nuclear lamins during the cell cycle-- relationship between structure and function. J Struct Biol 2000;129:324-34.

197 Mounkes LC, Burke B, Stewart CL. The A-type lamins: nuclear structural proteins as a focus for muscular dystrophy and cardiovascular diseases. Trends Cardiovasc Med 2001;11:280-5.

198 Afilalo J, Sebag IA, Chalifour LE, et al. Age-related changes in lamin A/C expression in cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293:H1451-6.

199 Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? J Cell Sci 2001;114:9-19.

200 Wolf CM, Wang L, Alcalai R, et al. Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. J Mol Cell Cardiol 2008;44:293-303.

201 Ivorra C, Kubicek M, Gonzalez JM, et al. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. Genes Dev 2006;20:307-20.

202 Verga L, Concardi M, Pilotto A, et al. Loss of lamin A/C expression revealed by immuno-electron microscopy in dilated cardiomyopathy with atrioventricular block caused by LMNA gene defects. Virchows Arch 2003;443:664-71.

203 Gimeno JR, Lacunza J, Garcia-Alberola A, et al. Penetrance and risk profile in inherited cardiac diseases studied in a dedicated screening clinic. Am J Cardiol 2009;104:406-10.

204 Dubrey S, Cha K. Familial dilated cardiomyopathy. Am Heart J 1995;130:1313-4.

205 Fatkin D. Guidelines for the diagnosis and management of familial dilated cardiomyopathy. Heart Lung Circ 2007;16:19-21.

206 Gilbert-Barness E. Review: Metabolic cardiomyopathy and conduction system defects in children. Ann Clin Lab Sci 2004;34:15-34.

207 Anan R, Nakagawa M, Miyata M, et al. Cardiac involvement in mitochondrial diseases. A study on 17 patients with documented mitochondrial DNA defects. Circulation 1995;91:955-61.

208 Tranchant C, Mousson B, Mohr M, et al. Cardiac transplantation in an incomplete Kearns-Sayre syndrome with mitochondrial DNA deletion. Neuromuscul Disord 1993;3:561-6.

209 Colombo MG, Botto N, Vittorini S, Paradossi U, Andreassi MG. Clinical utility of genetic tests for inherited hypertrophic and dilated cardiomyopathies. Cardiovasc Ultrasound 2008;6:62.

210 Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. Circulation 2005;112:e154-235.

211 Crispell KA, Hanson EL, Coates K, Toy W, Hershberger RE. Periodic rescreening is indicated for family members at risk of developing familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2002;39:1503-7.

212 Baig MK, Goldman JH, Caforio AL, Coonar AS, Keeling PJ, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. J Am Coll Cardiol 1998;31:195-201.

213 Mahon NG, Murphy RT, MacRae CA, Caforio AL, Elliott PM, McKenna WJ. Echocardiographic evaluation in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy reveals preclinical disease. Ann Intern Med 2005;143:108-15.

214 Morimoto S. Expanded spectrum of gene causing both hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. Circ Res 2009;105:313-5.

215 Vasile VC, Will ML, Ommen SR, Edwards WD, Olson TM, Ackerman MJ. Identification of a metavinculin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy. Mol Genet Metab 2006;87:169-74.

216 Sakamoto A, Ono K, Abe M, et al. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:13873-8.

217 Rankin J, Auer-Grumbach M, Bagg W, et al. Extreme phenotypic diversity and nonpenetrance in families with the LMNA gene mutation R644C. Am J Med Genet A 2008;146A:1530-42.

218 Stefanelli CB, Rosenthal A, Borisov AB, Ensing GJ, Russell MW. Novel troponin T mutation in familial dilated cardiomyopathy with gender-dependant severity. Mol Genet Metab 2004;83:188-96.

219 Fett JD, Sundstrom BJ, Etta King M, Ansari AA. Mother-daughter peripartum cardiomyopathy. Int J Cardiol 2002;86:331-2.

220 Pankuweit S, Richter A, Ruppert V, Maisch B. [Familial predisposition and microbial etiology in dilated cardiomyopathy]. Herz 2009;34:110-6.

221 Kuhl U, Lassner D, Pauschinger M, et al. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. J Med Virol 2008;80:1243-51.

222 Caforio AL, Vinci A, Iliceto S. Anti-heart autoantibodies in familial dilated cardiomyopathy. Autoimmunity 2008;41:462-9.

223 Poller W, Schultheiss HP, Kuhl U. Viruses and other environmental factors as possible sources of phenotypic heterogeneity in familial dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2006;47:689-90; author reply 90.

224 Marian AJ. Genetic determinants of cardiac hypertrophy. Curr Opin Cardiol 2008;23:199-205.

225 Richard P, Charron P, Carrier L, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. Circulation 2003;107:2227-32.

226 Shimizu M, Ino H, Yasuda T, et al. Gene mutations in adult Japanese patients with dilated cardiomyopathy. Circ J 2005;69:150-3.

227 Moller DV, Andersen PS, Hedley P, et al. The role of sarcomere gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Eur J Hum Genet 2009.

228 Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, et al. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2002;291:385-93.

229 Parks SB, Kushner JD, Nauman D, et al. Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. Am Heart J 2008;156:161-9.

230 Khositseth A, Ausayapao P. Left ventricular myocardial performance index in closely-related relatives of patients with dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol 2008;124:375-7.

231 Matsumura Y, Elliott PM, Mahon NG, Virdee MS, Doi Y, McKenna WJ. Familial dilated cardiomyopathy: assessment of left ventricular systolic and diastolic function using Doppler tissue imaging in asymptomatic relatives with left ventricular enlargement. Heart 2006;92:405-6.

232 Mahon NG, Hedman AE, Padula M, et al. Fractal correlation properties of R-R interval dynamics in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2002;4:151-8.

233 Caforio AL, Tona F, Bottaro S, et al. Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy. Autoimmunity 2008;41:35-45.

234 Bilinska ZT, Caforio AL, Kusmierczyk-Droszcz BK, et al. Increased frequency of organ--specific cardiac antibodies in healthy relatives of patients with dilated cardiomyopathy: evidence for autoimmunity in Polish families. Clin Cardiol 1996;19:794-8.

235 Marriott JB, Goldman JH, Keeling PJ, Baig MK, Dalgleish AG, McKenna WJ. Abnormal cytokine profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives. Heart 1996;75:287-90.

236 Mahon NG, Sharma S, Elliott PM, et al. Abnormal cardiopulmonary exercise variables in asymptomatic relatives of patients with dilated cardiomyopathy who have left ventricular enlargement. Heart 2000;83:511-7.

237 Koikkalainen JR, Antila M, Lotjonen JM, et al. Early familial dilated cardiomyopathy: identification with determination of disease state parameter from cine MR image data. Radiology 2008;249:88-96.

238 Not T, Faleschini E, Tommasini A, et al. Celiac disease in patients with sporadic and inherited cardiomyopathies and in their relatives. Eur Heart J 2003;24:1455-61.

239 Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. Brain 2009.

240 Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. Bull World Health Organ 2008;86:650-2.

241 Orita M, Murakami Y, Ishihara K, Sekiya T. Loss of heterozygosity at polymorphic chromosomal loci in patients with malignant melanoma. J Invest Dermatol 1989;92:280S-3S.

242 Fayssoil A. Cardiac diseases in sarcoglycanopathies. Int J Cardiol 2009.

243 Beynon RP, Ray SG. Cardiac involvement in muscular dystrophies. QJM 2008;101:337-44.

244 Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. J Am Soc Echocardiogr 1989;2:358-67.

245 Flotats A, Carrio I. Cardiac neurotransmission SPECT imaging. J Nucl Cardiol 2004;11:587-602.

246 Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. Circulation 2002;105:539-42.

247 Parthenakis FI, Prassopoulos VK, Koukouraki SI, et al. Segmental pattern of myocardial sympathetic denervation in idiopathic dilated cardiomyopathy: relationship to regional wall motion and myocardial perfusion abnormalities. J Nucl Cardiol 2002;9:15-22.

248 Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Circulation 1996;93:1043-65.

249 Hanson EL, Jakobs PM, Keegan H, et al. Cardiac troponin T lysine 210 deletion in a family with dilated cardiomyopathy. J Card Fail 2002;8:28-32.

250 Mogensen J, Murphy RT, Shaw T, et al. Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2004;44:2033-40.

251 Zhan DY, Morimoto S, Du CK, et al. Therapeutic effect of {beta}-adrenoceptor blockers using a mouse model of dilated cardiomyopathy with a troponin mutation. Cardiovasc Res 2009;84:64-71.

252 Medin M, Hermida-Prieto M, Monserrat L, et al. Mutational screening of phospholamban gene in hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy and functional study of the PLN -42 C>G mutation. Eur J Heart Fail 2007;9:37-43.

253 Greenberg SA, Walsh RJ. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part I: Genetic determinants of inherited disease and their laboratory detection. Muscle Nerve 2005;31:418-30.

254 Greenberg SA, Walsh RJ. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part II: Application of genetic testing in neuromuscular disease. Muscle Nerve 2005;31:431-51.

255 Honda Y, Yokota Y, Yokoyama M. Familial aggregation of dilated cardiomyopathy--evaluation of clinical characteristics and prognosis. Jpn Circ J 1995;59:589-98.

256 Csanady M, Hogye M, Kallai A, Forster T, Szarazajtai T. Familial dilated cardiomyopathy: a worse prognosis compared with sporadic forms. Br Heart J 1995;74:171-3.

257 Grunig E, Benz A, Mereles D, et al. Prognostic value of serial cardiac assessment and familial screening in patients with dilated cardiomyopathy. Eur J Heart Fail 2003;5:55-62.

258 Michels VV, Driscoll DJ, Miller FA, et al. Progression of familial and non-familial dilated cardiomyopathy: long term follow up. Heart 2003;89:757-61.

259 Shogase T, Shudo H, Nakai Y, Nagashima K. [A role of nuclear medicine in diagnosing cardiac disease--clinical use of 123I-BMIPP and 123I-MIBG]. Rinsho Byori 2000;48:113-20.

260 Bengel FM, Schwaiger M. Assessment of cardiac sympathetic neuronal function using PET imaging. J Nucl Cardiol 2004;11:603-16.

261 Greenberg B. Molecular imaging of the remodeling heart: the next step forward. JACC Cardiovasc Imaging 2008;1:363-5.

262 Verberne HJ, Habraken JB, van Eck-Smit BL, Agostini D, Jacobson AF. Variations in ^{123}I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) late heart mediastinal ratios in chronic heart failure: a need for standardisation and validation. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008;35:547-53.

263 Merlet P, Valette H, Dubois-Rande JL, et al. Prognostic value of cardiac metaiodobenzylguanidine imaging in patients with heart failure. J Nucl Med 1992;33:471-7.

264 Imamura Y, Ando H, Mitsuoka W, et al. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine images reflect intense myocardial adrenergic nervous activity in congestive heart failure independent of underlying cause. J Am Coll Cardiol 1995;26:1594-9.

265 Nakata T, Miyamoto K, Doi A, et al. Cardiac death prediction and impaired cardiac sympathetic innervation assessed by MIBG in patients with failing and nonfailing hearts. J Nucl Cardiol 1998;5:579-90.

266 Verberne HJ, Brewster LM, Somsen GA, van Eck-Smit BL. Prognostic value of myocardial 123I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) parameters in patients with heart failure: a systematic review. Eur Heart J 2008;29:1147-59.

267 Agostini D, Verberne HJ, Burchert W, et al. I-123-mIBG myocardial imaging for assessment of risk for a major cardiac event in heart failure patients: insights from a retrospective European multicenter study. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008;35:535-46.

268 Nagahara D, Nakata T, Hashimoto A, et al. Predicting the need for an implantable cardioverter defibrillator using cardiac metaiodobenzylguanidine activity together with plasma natriuretic peptide concentration or left ventricular function. J Nucl Med 2008;49:225-33.

269 Koutelou M, Katsikis A, Flevari P, et al. Predictive value of cardiac autonomic indexes and MIBG washout in ICD recipients with mild to moderate heart failure. Ann Nucl Med 2009;23:677-84.

270 Arora R, Ferrick KJ, Nakata T, et al. I-123 MIBG imaging and heart rate variability analysis to predict the need for an implantable cardioverter defibrillator. J Nucl Cardiol 2003;10:121-31.

271 Paul M, Schafers M, Kies P, et al. Impact of sympathetic innervation on recurrent life-threatening arrhythmias in the follow-up of patients with idiopathic ventricular fibrillation. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2006;33:866-70.

272 Akutsu Y, Kaneko K, Kodama Y, et al. Cardiac sympathetic nerve abnormality predicts ventricular tachyarrhythmic events in patients without conventional risk of sudden death. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008;35:2066-73.

273 Kasama S, Toyama T, Hatori T, et al. Evaluation of cardiac sympathetic nerve activity and left ventricular remodelling in patients with dilated cardiomyopathy on the treatment containing carvedilol. Eur Heart J 2007;28:989-95.

274 Fujimoto S, Inoue A, Hisatake S, et al. Usefulness of 123I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy for predicting the effectiveness of beta-blockers in patients with dilated cardiomyopathy from the standpoint of long-term prognosis. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004;31:1356-61.

275 Nakata T, Wakabayashi T, Kyuma M, Takahashi T, Tsuchihashi K, Shimamoto K. Cardiac metaiodobenzylguanidine activity can predict the long-term efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors and/or beta-adrenoceptor blockers in patients with heart failure. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2005;32:186-94.

276 Nagamatsu H, Momose M, Kobayashi H, Kusakabe K, Kasanuki H. Prognostic value of 123I-metaiodobenzylguanidine in patients with various heart diseases. Ann Nucl Med 2007;21:513-20.

277 Anastasiou-Nana MI, Terrovitis JV, Athanasoulis T, et al. Prognostic value of iodine-123-metaiodobenzylguanidine myocardial uptake and heart rate variability in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 2005;96:427-31.

278 Kuwahara T, Hamada M, Hiwada K. Direct evidence of impaired cardiac sympathetic innervation in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. J Nucl Med 1998;39:1486-91.

279 Hiasa G, Hamada M, Saeki H, et al. Cardiac sympathetic nerve activity can detect congestive heart failure sensitively in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Chest 2004;126:679-86.

280 Matsuo S, Nakamura Y, Tsutamoto T, Kinoshita M. Impairments of myocardial sympathetic activity may reflect the progression of myocardial damage or dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. J Nucl Cardiol 2002;9:407-12.

281 Tamaki S, Yamada T, Okuyama Y, et al. Cardiac iodine-123 metaiodobenzylguanidine imaging predicts sudden cardiac death independently of left ventricular ejection fraction in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction: results from a comparative study with signal-averaged electrocardiogram, heart rate variability, and QT dispersion. J Am Coll Cardiol 2009;53:426-35.

282 Yi G, Keeling PJ, Hnatkova K, Goldman JH, Malik M, McKenna WJ. Usefulness of signal-averaged electrocardiography in evaluation of idiopathic-dilated cardiomyopathy in families. Am J Cardiol 1997;79:1203-7.

283 McKenna CJ, Sugrue DD, Kwon HM, et al. Histopathologic changes in asymptomatic relatives of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 1999;83:281-3, A6.

284 Michels VV, Moll PP, Rodeheffer RJ, et al. Circulating heart autoantibodies in familial as compared with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy. Mayo Clin Proc 1994;69:24-7.

285 Caforio AL, Keeling PJ, Zachara E, et al. Evidence from family studies for autoimmunity in dilated cardiomyopathy. Lancet 1994;344:773-7.

286 Grzybowski J, Bilinska ZT, Ruzyllo W, et al. Determinants of prognosis in nonischemic dilated cardiomyopathy. J Card Fail 1996;2:77-85.

287 Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, et al. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. Circulation 2007;115:76-83.

288 Caforio AL, Iliceto S. Genetically determined myocarditis: clinical presentation and immunological characteristics. Curr Opin Cardiol 2008;23:219-26.

289 Frost DA, Dolak JA. Cesarean section in a patient with familial cardiomyopathy and a cardioverter-defibrillator. Can J Anaesth 2006;53:478-81.

290 Abraham WT, Greenberg BH, Yancy CW. Pharmacologic therapies across the continuum of left ventricular dysfunction. Am J Cardiol 2008;102:21G-8G.

291 Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Oriola J, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with vulnerability to alcoholic cardiomyopathy. Ann Intern Med 2002;137:321-6.

292 Cuoco MA, Pereira AC, de Freitas HF, et al. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism modulation of onset of symptoms and survival rate of patients with heart failure. Int J Cardiol 2005;99:97-103.

293 Artham SM, Lavie CJ, Milani RV, Patel DA, Verma A, Ventura HO. Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression. Prog Cardiovasc Dis 2009;52:153-67.

294 Takeda N. Cardiac disturbances in diabetes mellitus. Pathophysiology 2009.

295 Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. Oncogene 2001;20:1525-8.

296 Sestini R, Bacci C, Provenzano A, Genuardi M, Papi L. Evidence of a four-hit mechanism involving SMARCB1 and NF2 in schwannomatosis-associated schwannomas. Hum Mutat 2008;29:227-31.

297 Richard P, Charron P, Leclercq C, et al. Homozygotes for a R869G mutation in the beta -myosin heavy chain gene have a severe form of familial hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2000;32:1575-83.

298 Tsoutsman T, Bagnall RD, Semsarian C. Impact of multiple gene mutations in determining the severity of cardiomyopathy and heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008;35:1349-57.

299 Poller W, Kuhl U, Tschoepe C, Pauschinger M, Fechner H, Schultheiss HP. Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated cardiomyopathy. J Mol Med 2005;83:579-86.

300 Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. Circulation 2005;111:887-93.

301 Fujioka S, Kitaura Y, Deguchi H, et al. Evidence of viral infection in the myocardium of American and Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 2004;94:602-5.

302 Chopra V. Enteroviruses prefer the dystrophin-deficient heart. Clin Genet 2002;62:370-2.

303 Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. Nat Med 1999;5:320-6.

304 Cohn JN. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. Circulation 1995;91:2504-7.

305 Cohn JN. Critical review of heart failure: the role of left ventricular remodeling in the therapeutic response. Clin Cardiol 1995;18:IV4-12.

306 Maya L, Villarreal FJ. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy and myocardial fibrosis. J Mol Cell Cardiol 2009.

307 Florea VG, Mareyev VY, Samko AN, Orlova IA, Coats AJ, Belenkov YN. Left ventricular remodelling: common process in patients with different primary myocardial disorders. Int J Cardiol 1999;68:281-7.

308 Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol 2000;35:569-82.

309 Schwartz K, Chassagne C, Boheler KR. The molecular biology of heart failure. J Am Coll Cardiol 1993;22:30A-3A.

310 Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. J Clin Invest 1997;100:2315-24.

311 Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. Circulation 2000;102:1944-9.

312 Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. J Mol Cell Cardiol 1994;26:279-92.

313 Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:793-805.

314 Wheeler MT, Korcarz CE, Collins KA, et al. Secondary coronary artery vasospasm promotes cardiomyopathy progression. Am J Pathol 2004;164:1063-71.

315 Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. Cardiovasc Res 2004;63:373-80.

316 Colan SD. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. Cardiol Clin 1997;15:355-72.

317 Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. Ann N Y Acad Sci 2004;1015:53-70.

318 Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 1997;29:2873-92.

319 Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. Eur Heart J 2003;24:883-96.

320 Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. Circulation 2007;116:1413-23.

321 Muchir A, Pavlidis P, Decostre V, et al. Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. J Clin Invest 2007;117:1282-93.

322 Muchir A, Shan J, Bonne G, Lehnart SE, Worman HJ. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. Hum Mol Genet 2009;18:241-7.

323 Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. Cardiovasc Res 2006;70:422-33.

324 Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. Biochem Biophys Res Commun 2004;322:1178-91.

325 Hoshijima M. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;290:H1313-25.

326 Shai SY, Harpf AE, Ross RS. Integrins and the myocardium. Genet Eng (NY) 2002;24:87-105.

327 Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. Circulation 2003;107:984-91.

328 Pagani ED, Alousi AA, Grant AM, Older TM, Dziuban SW, Jr., Allen PD. Changes in myofibrillar content and Mg-ATPase activity in ventricular tissues from patients with heart failure caused by coronary artery disease, cardiomyopathy, or mitral valve insufficiency. Circ Res 1988;63:380-5.

329 Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt BJ, Allen PD, Haeberle JR, Alpert NR. Alteration of contractile function and excitation-contraction coupling in dilated cardiomyopathy. Circ Res 1992;70:1225-32.

330 Alousi AA, Grant AM, Etzler JR, Cofer BR, Van der Bel-Kahn J, Melvin D. Reduced cardiac myofibrillar Mg-ATPase activity without changes in myosin isozymes in patients with end-stage heart failure. Mol Cell Biochem 1990;96:79-88.

331 Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM. Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. J Clin Invest 1996;98:167-76.

332 Mirza M, Robinson P, Kremneva E, et al. The effect of mutations in alpha-tropomyosin (E40K and E54K) that cause familial dilated cardiomyopathy on the regulatory mechanism of cardiac muscle thin filaments. J Biol Chem 2007;282:13487-97.

333 Harada K, Morimoto S. Inherited cardiomyopathies as a troponin disease. Jpn J Physiol 2004;54:307-18.

334 Mirza M, Marston S, Willott R, et al. Dilated cardiomyopathy mutations in three thin filament regulatory proteins result in a common functional phenotype. J Biol Chem 2005;280:28498-506.

335 Morimoto S. [Abnormal myocardial contractile regulation mechanism in familial hypertrophic and dilated cardiomyopathies--functional analysis of molecular mutant troponin in in-vitro]. Fukuoka Igaku Zasshi 2002;93:1-5.

336 Robinson P, Griffiths PJ, Watkins H, Redwood CS. Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. Circ Res 2007;101:1266-73.

337 Kaprielian RR, Severs NJ. Dystrophin and the cardiomyocyte membrane cytoskeleton in the healthy and failing heart. Heart Fail Rev 2000;5:221-38.

339 Kaprielian RR, Stevenson S, Rothery SM, Cullen MJ, Severs NJ. Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium. Circulation 2000;101:2586-94.

340 Vatta M, Stetson SJ, Jimenez S, et al. Molecular normalization of dystrophin in the failing left and right ventricle of patients treated with either pulsatile or continuous flow-type ventricular assist devices. J Am Coll Cardiol 2004;43:811-7.

341 Vatta M, Stetson SJ, Perez-Verdia A, et al. Molecular remodelling of dystrophin in patients with end-stage cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. Lancet 2002;359:936-41.

342 Heling A, Zimmermann R, Kostin S, et al. Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. Circ Res 2000;86:846-53.

343 Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. Cardiovasc Res 2000;45:273-8.

344 Wang X, Osinska H, Gerdes AM, Robbins J. Desmin filaments and cardiac disease: establishing causality. J Card Fail 2002;8:S287-92.

345 Monreal G, Nicholson LM, Han B, et al. Cytoskeletal remodeling of desmin is a more accurate measure of cardiac dysfunction than fibrosis or myocyte hypertrophy. Life Sci 2008;83:786-94.

346 Hein S, Scholz D, Fujitani N, et al. Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. J Mol Cell Cardiol 1994;26:1291-306.

347 Morano I, Hadicke K, Grom S, et al. Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart. J Mol Cell Cardiol 1994;26:361-8.

348 Horowits R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. Nature 1986;323:160-4.

349 Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. Physiol Rev 2002;82:893-922.

350 Maclennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4:566-7.

351 Haghighi K, Gregory KN, Kranias EG. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 2004;322:1214-22.

352 Braz JC, Gregory K, Pathak A, et al. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. Nat Med 2004;10:248-54.

353 Bott-Flugel L, Weig HJ, Uhlein H, Nabauer M, Laugwitz KL, Seyfarth M. Quantitative analysis of apoptotic markers in human end-stage heart failure. Eur J Heart Fail 2008;10:129-32.

354 Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:6252-6.

355 Stewart CL, Kozlov S, Fong LG, Young SG. Mouse models of the laminopathies. Exp Cell Res 2007;313:2144-56.

356 Goswami SK, Das DK. Autophagy in the myocardium: Dying for survival? Exp Clin Cardiol 2006;11:183-8.

357 Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, Ffrench M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. Autophagy 2005;1:131-40.

358 Raben N, Shea L, Hill V, Plotz P. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. Methods Enzymol 2009;453:417-49.

359 Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. Circulation 1991;83:1849-65.

360 Zannad F, Dousset B, Alla F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. Hypertension 2001;38:1227-32.

361 Duisters RF, Tijsen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. Circ Res 2009;104:170-8, 6p following 8.

362 Calore C, Cacciavillani L, Boffa GM, et al. Contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance in primary and ischemic dilated cardiomyopathy. J Cardiovasc Med (Hagerstown) 2007;8:821-9.

363 Jerosch-Herold M, Sheridan DC, Kushner JD, et al. Cardiac magnetic resonance imaging of myocardial contrast uptake and blood flow in patients affected with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008;295:H1234-H42.

364 Raman SV, Sparks EA, Baker PM, McCarthy B, Wooley CF. Mid-myocardial fibrosis by cardiac magnetic resonance in patients with lamin A/C cardiomyopathy: possible substrate for diastolic dysfunction. J Cardiovasc Magn Reson 2007;9:907-13.

365 van Tintelen JP, Tio RA, Kerstjens-Frederikse WS, et al. Severe myocardial fibrosis caused by a deletion of the 5' end of the lamin A/C gene. J Am Coll Cardiol 2007;49:2430-9.

366 Petrie CJ, Mark PB, Dargie HJ. Cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy--does regional fibrosis mimic infarction? J Cardiovasc Magn Reson 2005;7:823-5.

367 Guillaume MD, Phoon CK, Chun AJ, Srichai MB. Delayed enhancement cardiac magnetic resonance imaging in a patient with Duchenne muscular dystrophy. Tex Heart Inst J 2008;35:367-8.

368 Puchalski MD, Williams RV, Askovich B, et al. Late gadolinium enhancement: precursor to cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy? Int J Cardiovasc Imaging 2009;25:57-63.

369 Andersson B, Blange I, Sylven C. Angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphism and long-term survival in patients with idiopathic congestive heart failure. Eur J Heart Fail 1999;1:363-9.

370 Abraham MR, Olson LJ, Joyner MJ, Turner ST, Beck KC, Johnson BD. Angiotensin-converting enzyme genotype modulates pulmonary function and exercise capacity in treated patients with congestive stable heart failure. Circulation 2002;106:1794-9.

371 Tiago AD, Badenhorst D, Skudicky D, et al. An aldosterone synthase gene variant is associated with improvement in left ventricular ejection fraction in dilated cardiomyopathy. Cardiovasc Res 2002;54:584-9.

372 Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, et al. Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. Eur Heart J 2005;26:2457-62.

373 Hilfiker-Kleiner D, Knoll R. Disease-modifying mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy: complexity from simplicity. Circulation 2008;117:1775-7.

374 Blauwet LA, Ackerman MJ, Edwards WD, Riehle DL, Ommen SR. Myocardial fibrosis in patients with symptomatic obstructive hypertrophic cardiomyopathy: correlation with echocardiographic measurements, sarcomeric genotypes, and pro-left ventricular hypertrophy polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system. Cardiovasc Pathol 2009;18:262-8.

375 Ortlepp JR, Breithardt O, Ohme F, Hanrath P, Hoffmann R. Lack of association among five genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. Am Heart J 2001;141:671-6.

376 Kaufman BD, Auerbach S, Reddy S, et al. RAAS gene polymorphisms influence progression of pediatric hypertrophic cardiomyopathy. Hum Genet 2007;122:515-23.

377 Tiret L, Mellet C, Poinier O, et al. Lack of association between polymorfhisms of eigert candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. J Am Coll Cardiol 2000; 35(1):29-35.

378 Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, et al. The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. J Clin Invest 1998;102:1534-9.

379 Wagoner LE, Craft LL, Singh B, et al. Polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. Circ Res 2000;86:834-40.

380 Badenhorst D, Norton GR, Sliwa K, et al. Impact of beta2-adrenoreceptor gene variants on cardiac cavity size and systolic function in idiopathic dilated cardiomyopathy. Pharmacogenomics J 2007;7:339-45.

381 Forleo C, Resta N, Sorrentino S, et al. Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Med 2004;117:451-8.

382 Forleo C, Sorrentino S, Guida P, et al. Beta1- and beta2-adrenergic receptor polymorphisms affect susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy. J Cardiovasc Med (Hagerstown) 2007;8:589-95.

383 Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. J Biol Chem 2002;277:30429-35.

384 Mason DA, Moore JD, Green SA, Liggett SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. J Biol Chem 1999;274:12670-4.

385 Gerson MC, Wagoner LE, McGuire N, Liggett SB. Activity of the uptake-1 norepinephrine transporter as measured by I-123 MIBG in heart failure patients with a loss-of-function polymorphism of the presynaptic alpha2C-adrenergic receptor. J Nucl Cardiol 2003;10:583-9.

386 Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). J Am Coll Cardiol 1996;27:1201-6.

387 Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. Annu Rev Physiol 2003;65:81-101.

388 Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. Circ Res 2002;91:988-98.

389 Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. Mol Cell Biochem 2000;212:155-69.

390 Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. J Clin Invest 2002;109:787-96.

391 Loppnow H, Westphal E, Buchhorn R, Wessel A, Werdan K. Interleukin-1 and related proteins in cardiovascular disease in adults and children. Shock 2001;16 Suppl 1:3-9.

392 Mann DL. Interleukin-6 and viral myocarditis: the Yin-Yang of cardiac innate immune responses. J Mol Cell Cardiol 2001;33:1551-3.

393 O'Connell JB, Fowles RE, Robinson JA, Subramanian R, Henkin RE, Gunnar RM. Clinical and pathologic findings of myocarditis in two families with dilated cardiomyopathy. Am Heart J 1984;107:127-35.

394 Limas CJ, Iakovis P, Anyfantakis A, Kroupis C, Cokkinos DV. Familial clustering of autoimmune diseases in patients with dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol 2004;93:1189-91.

395 Limas C, Limas CJ, Boudoulas H, et al. HLA-DQA1 and -DQB1 gene haplotypes in familial cardiomyopathy. Am J Cardiol 1994;74:510-2.

396 Limas C, Limas CJ, Boudoulas H, et al. Anti-beta-receptor antibodies in familial cardiomyopathy: correlation with HLA-DR and HLA-DQ gene polymorphisms. Am Heart J 1994;127:382-6.

397 Olson TM, Thibodeau SN, Lundquist PA, Schaid DJ, Michels VV. Exclusion of a primary gene defect at the HLA locus in familial idiopathic dilated cardiomyopathy. J Med Genet 1995;32:876-80.

398 Krajinovic M, Mestroni L, Severini GM, et al. Absence of linkage between idiopathic dilated cardiomyopathy and candidate genes involved in the immune function in a large Italian pedigree. J Med Genet 1994;31:766-71.

399 Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, et al. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 1993;91:1964-8.

400 Goldman JH, Keeling PJ, Warraich RS, et al. Autoimmunity to alpha myosin in a subset of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Br Heart J 1995;74:598-603.

401 Caforio AL, Grazzini M, Mann JM, et al. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. Circulation 1992;85:1734-42.

402 Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. Circulation 1994;89:2760-7.

403 Jahns R, Boivin V, Hein L, et al. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor--directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest 2004;113:1419-29.

404 Hebert TE. Anti-beta1AR antibodies in dilated cardiomyopathy: are these a new class of receptor agonists? Cardiovasc Res 2007;76:5-7.

405 Jane-wit D, Altuntas CZ, Johnson JM, et al. Beta 1-adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis. Circulation 2007;116:399-410.

406 Tutor AS, Penela P, Mayor F, Jr. Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies are potent stimulators of the ERK1/2 pathway in cardiac cells. Cardiovasc Res 2007;76:51-60.

407 Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse MJ, Boege F. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. Circulation 1999;99:649-54.

408 Matsui S, Fu M, Hayase M, et al. Transfer of rabbit autoimmune cardiomyopathy into severe combined immunodeficiency mice. J Cardiovasc Pharmacol 2003;42 Suppl 1:S99-103.

409 Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G, et al. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. Circulation 1997;95:1994-7.

410 Dorffel WV, Wallukat G, Dorffel Y, Felix SB, Baumann G. Immunoadsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. Int J Cardiol 2004;97:529-34.

411 Russell SD, Miller LW, Pagani FD. Advanced heart failure: a call to action. Congest Heart Fail 2008;14:316-21.

412 Cittadini A, Isgaard J, Monti MG, et al. Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure. J Am Coll Cardiol 2003;41:2154-63.

413 Iwanaga Y, Hoshijima M, Gu Y, et al. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. J Clin Invest 2004;113:727-36.

414 Tanaka E, Hattan N, Ando K, et al. Amelioration of microvascular myocardial ischemia by gene transfer of vascular endothelial growth factor in rabbits. J Thorac Cardiovasc Surg 2000;120:720-8.

415 Shah AS, White DC, Emani S, et al. In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. Circulation 2001;103:1311-6.

416 Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, et al. A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. N Engl J Med 1996;334:809-14.

417 Chatterjee S, Stewart AS, Bish LT, et al. Viral gene transfer of the antiapoptotic factor Bcl-2 protects against chronic postischemic heart failure. Circulation 2002;106:I212-7.

418 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003;114:763-76.

419 Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:12313-8.

420 Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. Science 2001;294:1933-6.

421 Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. Cell 2002;109:625-37.