



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze biologiche

**Sindrome da morte improvvisa per aritmia nelle giovani
vittime delle popolazioni dell'Asia orientale**
**Sudden arrhythmia death syndrome in young victims in East
Asian populations.**

Tesi di Laurea di:
Giorgia Gasparri

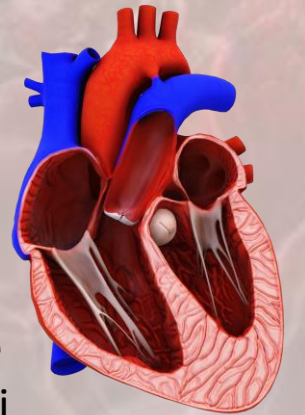
Docente Referente
Prof. Mauro Pesaresi

Sessione Straordinaria , Febbraio
Anno accademico 2022/2023

Introduzione

La morte Improvvisa è definita come il decesso che avviene entro 1 ora dall'insorgenza dei sintomi in un soggetto apparentemente sano o in cui la cui malattia non era così grave da far prevedere un exitus così repentino . Un'accezione più allargata include le morti occorse senza testimoni in soggetti di cui era noto lo stato di buona salute nelle 24 ore precedenti il decesso.

La morte improvvisa dovuta a una preesistente patologia cardiaca è conosciuta come **morte cardiaca improvvisa (SCD)** e la sua incidenza annuale mondiale è dai 4 ai 5 milioni di casi; costituisce quindi una tematica di estrema rilevanza per la salute pubblica, con importanti ripercussioni sociali perché può riguardare anche le fasce medio-giovani della popolazione, con un conseguente impatto devastante sulle famiglie.




Nella maggior parte dei casi di SCD delle persone di una fascia di età medio-alta, la morte è causata da **malattie coronariche**; tuttavia nelle persone giovani la SCD è rara e le cause sono diversificate , in particolare nel 30% dei casi gli studi autoptici non hanno rilevato la presenza di patologie cardiache.

L'autopsia molecolare fu descritta per la prima volta dal dottore Michael Ackerman nel 1999 per determinare le cause di morte in casi incerti tramite analisi genetiche dopo aver eseguito la tradizionale autopsia.


Gli studi genetici post-mortem hanno dimostrato che la SCD in queste giovani vittime può essere causata da fatali aritmie correlate a un insieme di disturbi elettrici cardiaci ereditabili, questi sono collettivamente riuniti sotto il nome di **sindrome da morte improvvisa per aritmia (SADS)**. Queste includono:

- ❖ la sindrome di Brugada (BrS)
- ❖ la sindrome del QT lungo (LQTS)
- ❖ la sindrome del QT corto
- ❖ la tachicardia ventricolare polimorfa catecolaminergica (CPVT)
- ❖ la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC)
- ❖ la cardiomiopatia ipertrofica (HCM)

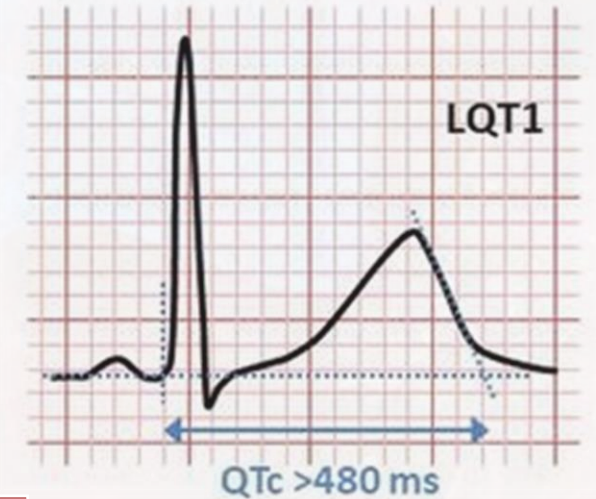
Essendo le condizioni relative alla SADS patologie genetiche, ci sono due approcci differenti per identificarle all'interno delle morti inaspettate e improvvise delle giovani vittime (SUD)



Esame genetico clinico dettagliato dei parenti in vita delle vittime di SCD; Studi che utilizzano questo approccio suggeriscono che la SADS è responsabile del 40% dei risultati negativi delle autopsie delle vittime morte improvvisamente. Limiti: potrebbe non portare all'identificazione di forme nascoste di SADS dovute a un'incompleta penetranza e a un'espressività variabile delle mutazioni.



Utilizzo dell'autopsia molecolare sulle vittime, che comprende test genetici post-mortem alla ricerca di mutazioni relative alla SADS.



Elettrocardiogramma che mostra un caso di sindrome del QT lungo. L'intervallo QT è evidenziato dalla striscia blu in basso.

Metodi

- **Revisione retrospettiva quinquennale delle autopsie registrate** : E' stata svolta una revisione della documentazione delle autopsie svoltesi negli obitori pubblici (fornite dal Servizio di Patologia Forense che fornisce i servizi per le autopsie pubbliche per oltre 7 milioni di persone ad Hong Kong) delle giovani vittime morte improvvisamente di età compresa tra i 5 e i 40 anni nel periodo compreso tra il 1 gennaio 2008 e il 31 dicembre 2012. Le vittime le cui morti sono state causate da traumi, incidenti, annegamenti , intossicamento da farmaci e quelle i quali documenti autoptici risultavano incompleti o non accessibili sono state escluse.
- **Studio prospettico di due anni**: In questo studio , le giovani vittime di SCD (di età compresa tra 5 e 40 anni) sono state identificate e reclutate nello studio da patologi forensi dopo aver identificato o una cardiomiopatia aritmogena ereditabile o dopo non aver trovato una causa di morte anatomica durante l'autopsia (incluse patologie cardiache strutturali) e che presentavano uno screening tossicologico negativo. Sono state raccolte informazioni sulla storia personale delle vittime e sulle circostanze della loro morte , è stato raccolto Dna per le tecniche di autopsia molecolare , che è stata eseguita solo previo consenso dei parenti di primo grado, quest'ultimi inoltre sono stati sottoposti a dei test genetici e a una valutazione clinica inclusi : elettrocardiogramma standard a 12 derivazioni (ECG), elettrocardiogramma con media del segnale , ecocardiogramma, ECG dinamico secondo Holter (dalla durata di 24 ore) .

Per lo studio , è stato identificato un pannello di **35 geni** implicati nelle patologie relative alla SADS . Attraverso le tecniche di sequenziamento di nuova generazione è stato sequenziato parte del genoma delle vittime e sono stati identificati i rispettivi 35 geni e confrontati con un genoma di un soggetto sano, in modo da identificare le eventuali varianti .

Sono state annotate le varianti con una frequenza allelica < 0.1% sia per mutazioni dominanti che recessive . Le mutazioni patogene e possibili patogene sono state confermate tramite il sistema di sequenziamento Sanger mentre le mutazioni benigne sono state scartate.

La diagnosi della SADS veniva rilasciata qualora l'autopsia molecolare nelle vittime di SCD identificava una variante genica implicata nella SADS o se un criterio clinico generalmente accettato per una particolare malattia veniva ritrovato nelle vittime di SCD o nei loro parenti di primo grado

TABLE 1. All 35 genes included in the SADS gene panel analysed by next-generation sequencing

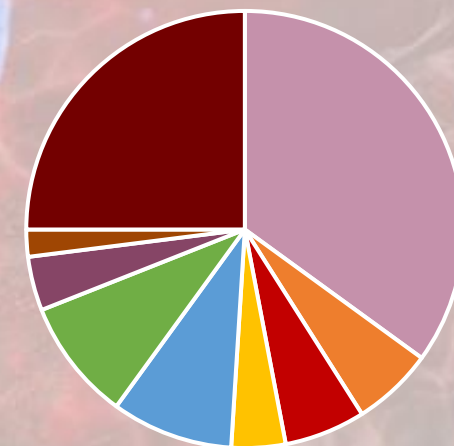
Gene	LQTS	BrS	CPVT	ARVC	HCM
AKAP9	+				
ANK2	+				
CACNA1C	+	+			
CACNB2		+			
CASQ2			+		
CAV3	+				+
DSC2				+	
DSG2				+	
DSP				+	
GPD1L		+			
HCN4		+			
JUP				+	
KCND3		+			
KCNE1	+				
KCNE2	+				
KCNE3		+			
KCNH2	+				
KCNJ2	+				
KCNJ8		+			
KCNQ1	+				
LMNA				+	+
MYBPC3					+
MYH7					+
PKP2				+	
RANGRF		+			
RYR2			+	+	
SCN1B		+			
SCN3B		+			
SCN4B	+				
SCN5A	+	+			
SNTA1	+				
TGFB3				+	
TMEM43				+	
TNNI3					+
TNNT2					+

Risultati

- **Risultati della revisione retrospettiva quinquennale** : sono state eseguite 17.187 autopsie durante il periodo considerato e 2.748 (il 16%) delle morti comprendeva individui tra 5 e 40 anni . Tra questi , 420 sono morti per morte improvvisa . Di quest'ultimi il 69% (289 individui) sono morti per SCD (rapporto maschi : femmine = 9:2) ; l'età media è di 32 anni (range di età tra i 7 e i 40 anni) . Patologie delle arterie coronarie hanno causato il 35% di queste morti , altre cause sono state : dissezione aortica (6%), miocardite (6%) ipertrofia del ventricolo sinistro (4%), cardiomiopatia dilatativa (9%) , altre patologie cardiache strutturali (9%), HCM (4%), ARVC (2%) e inspiegabili (25%) .

- **Risultati dello studio prospettico di 2 anni** : sono state identificate 32 vittime di SCD di età compresa tra i 5 e i 40 anni nel periodo compreso tra il 1 giugno 2014 e il 30 giugno 2016. Undici individui sono stati esclusi : due non avevano la carta di identità di Hong Kong e nove a causa del mancato consenso dei parenti di primo grado . Alla fine 21 vittime di SCD sono state reclutate (18 uomini , 3 donne) nello studio, con età media 31 anni (range di età : 14-39 anni) . Tramite l'autopsia tradizionale, in 18 individui (86%) non sono state riscontrate informazioni rilevanti, una vittima presentava una cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC) e un'altra una cardiomiopatia ipertrofica (HCM). Tre vittime (14%) avevano nella loro storia familiare altri casi di SCD e 7 (33%) avevano sofferto di sincope. Molte (71%) delle vittime avevano una salute passata insignificante.

Cause di morte di SCD



Tramite un'analisi genetica nel **29% delle vittime** sono state riscontrate varianti geniche eterozigotiche; sette varianti sono state identificate in sette geni , sei delle quali erano di nuova identificazione .

Combinando le scoperte dell'autopsia tradizionale e di quella molecolare le cause di morte in **12 casi** (57%) rimangono sconosciute, le cause di morte in **4 casi** (19%) sono state confermate per cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC) , in **2 casi** (10%) per la sindrome di Brugada (BrS) e rispettivamente per ognuno dei **3 casi rimanenti** (5%) la morte è stata per cardiomiopatia ipertrofica (HCM) , sindrome del QT lungo (LQTS) , tachicardia ventricolare polimorfa catecolaminergica (CPVT).

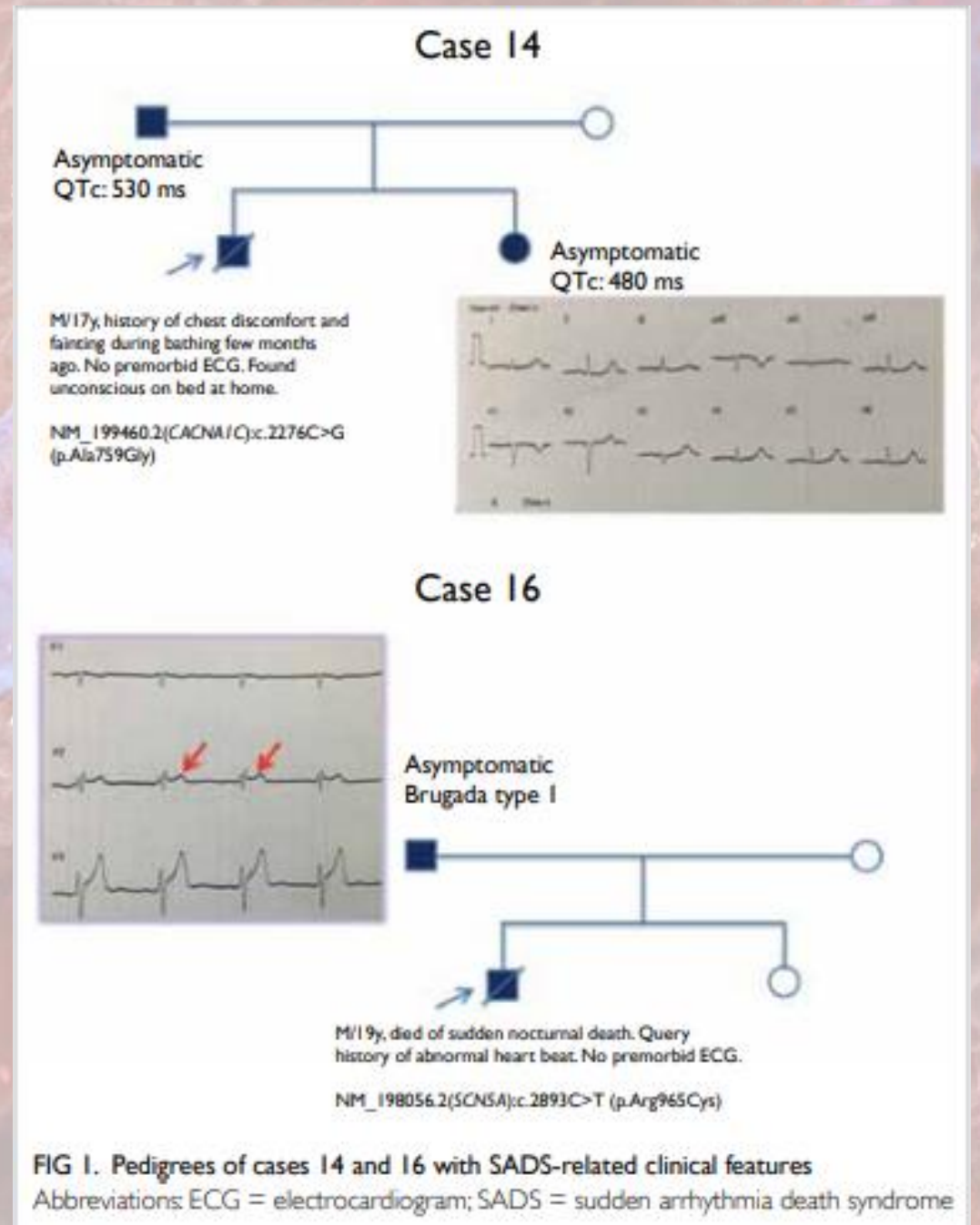
TABLE 3. Positive genetic findings of six sudden cardiac death cases detected by next-generation sequencing

Case	Genetic findings	Allele frequency by gnomAD	In silico prediction	HGMD accession
			a. PolyPhen-2 b. MetaSVM c. PROVEAN	
5	NM_024422.3(DSC2):c.2368G>A (p.Gly790Arg)*	0.0004% (1/245 860, all) 0.0058% (1/17 240, EAS)	a. Probably damaging b. Damaging c. Damaging	-
7	NM_005751.4(AKAP9):c.3752-1G>A*	-	Abolishment of acceptor splice site (Splice Site Finder, MaxEntScan, GeneSplicer, Human Splicing Finder)	-
10	NM_001035.2(RYR2):c.1509C>A (p.Asp503Glu)*	0.0008% (2/242 560, all) 0% (0/1620, EAS)	a. Probably damaging b. Damaging c. Damaging	-
14	NM_199460.2(CACNA1C):c.2276C>G (p.Ala759Gly)*	-	a. Probably damaging b. Damaging c. Damaging	-
16	NM_198056.2(SCN5A):c.2893C>T (p.Arg965Cys)	0.0066% (16/243 648, all) 0.058% (10/17 136, EAS)	a. Probably damaging b. Damaging c. Damaging	CM024644 (Brugada syndrome)
20	NM_004415.3(DSP):c.1045G>C (p.Ala349Pro)*	-	a. Probably damaging b. Damaging c. Damaging	-
	NM_002230.2(JUP):c.751C>A (p.His251Asn)*		a. Probably damaging b. Damaging c. Damaging	

Più della metà dei parenti di primo grado delle vittime che si sono sottoposti a test genici erano portatori di mutazioni (6 su 11). Tra questi , caratteristiche cliniche correlate alla SADS sono state riscontrate in 3 parenti di primo grado appartenenti a due delle famiglie delle vittime (caso 14 e caso 16) .

Il **caso 14** è un ragazzo di 17 anni , morto durante il sonno , il quale pochi mesi prima della morte ha avuto un episodio di sincope ma non si è sottoposto ad un controllo medico. Tramite l'ECG è stato rilevato un intervallo di QT lungo nel padre e nella sorella della vittima (530 ms e 480 ms rispettivamente) , suggerendo una diagnosi di LQTS. L'autopsia molecolare ha riscontrato una mutazione nel gene CACNA1c che codifica per la subunità α -1c dei canali calcio voltaggio-dipendenti coinvolti nella polarizzazione della membrana delle cellule miocardiche.

Il **caso 16** è un ragazzo di 19 anni, allo stesso modo è morto nel sonno. Il soggetto non ha sofferto di episodi di sincope prima della morte. L'autopsia molecolare ha rilevato una mutazione del gene SCN5A, che è stata identificata come causa della sindrome di Brugada (BrS) . Controlli effettuati sulla famiglia hanno mostrato che il padre è portatore della stessa mutazione nell' ECG presenta un pattern Brugada di tipo 2 .



Discussione

Per chiarire le cause della morte cardiaca improvvisa (SCD) è richiesta una valutazione post-mortem globale : episodi di sincope, sintomi cardiaci (in particolare se correlati allo sforzo fisico, alle emozioni e allo stress) , precedenti ECG, qualsiasi patologia cardiaca in famiglia , morti premature o improvvise, infarti e epilessie, sono tutti fattori che devono essere considerati. Un approccio congiunto dell'autopsia molecolare e della valutazione cardiaca dei parenti in vita (Tabella 2) , è in grado di fornire maggiori informazioni circa la morte di queste vittime.

TABLE 2. Clinical and forensic data of the 21 SCD victims

Case	Sex/ age (years)	Clinical details	Family history of SCD	Forensic findings (autopsy and toxicology screening)	Molecular autopsy findings
1	M/26	Known autism and mental retardation. On antipsychotic and anti-epileptic drugs. Found unconscious on bed in hostel	No	Negative	Negative
2	M/22	Good past health. Found collapsed at home	Yes (mother and maternal aunt had SCD at 20s-30s)	Negative	Negative
3	M/38	Chronic smoker. Good past health. Found unconscious on bed at home	No	Negative	Negative
4	M/27	History of substance abuse. Found unconscious on bed at detoxification centre	No	Negative	Negative

Le tecnologie utilizzate in autopsia molecolare sono variate : a partire dal sequenziamento Sanger , tramite il quale sono stati identificati importanti geni correlati alla SUD, con una rendita diagnostica del 15-20% , fino ad arrivare al sequenziamento di nuova generazione , in grado di individuare un pannello di circa 200 geni, dove la rendita diagnostica arriva al 35% .

Un riscontro genetico negativo non è però in grado di escludere che una mutazione genetica sia causa della malattia , infatti applicando le tecniche dell'autopsia molecolare a queste vittime di morte improvvisa, ciò che si otterrà sarà una risposta probabilistica , che elude il semplice "si" o "no". E' importante in questi casi l'interpretazione della patogenicità delle varianti che si basa su svariati fattori tra i quali : caratteristiche della variante genetica , frequenza dell'allele nella popolazione, predizioni in silico, modelli di segregazione tra i membri familiari affetti, dati letterari riguardanti casi simili precedenti.

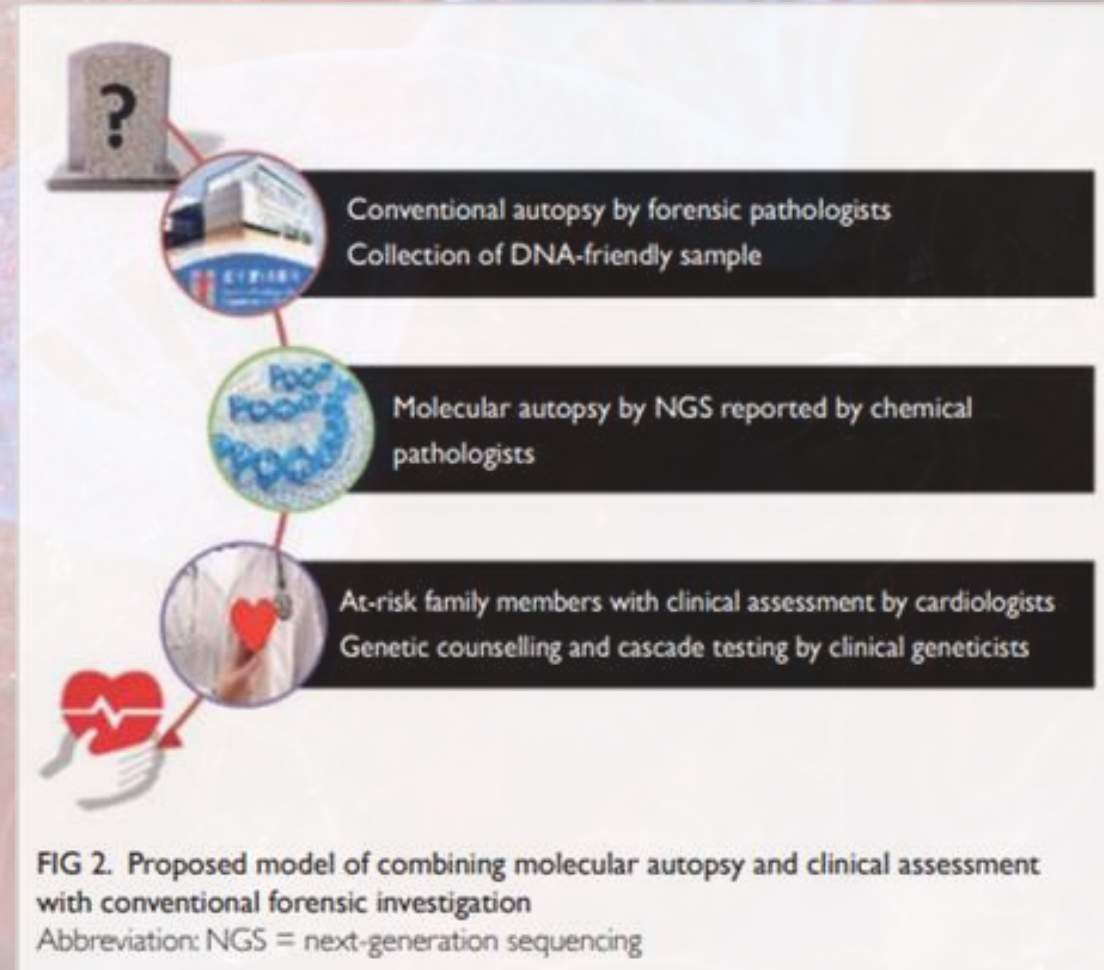
Tramite questo studio sono stati evidenziati **due vantaggi** dell'utilizzo dell'autopsia molecolare:

-In primis , questa permette una **corretta diagnosi di SCD** nelle vittime decedute, il che rappresenta un evento "conclusivo" per le famiglie, a cui viene fornita pertanto una spiegazione della causa di morte.

-Secondariamente , queste tecniche sono in grado di **diagnosticare condizioni cliniche correlabili alla SCD** nei parenti ancora in vita delle vittime, in modo da evitare un protrarsi della tragedia familiare; difatti la maggior parte dei disturbi correlati alla SADS sono ereditabili e sono autosomici dominanti, pertanto i membri familiari hanno il 50% della probabilità di ereditare la mutazione, con una penetranza variabile.

Conclusione

Tramite il seguente studio è possibile concludere che la sindrome da morte improvvisa per aritmia (SADS) è una significativa causa di morte cardiaca improvvisa (SCD) nei giovani. Questo studio è il primo nel suo genere ad essere svolto sulla popolazione dell'Asia Orientale e fornisce importanti dati sulla diffusione e sui tipi di SADS tra le giovani vittime di SCD. La sua importanza è anche relativa al fatto che è il primo studio che incorpora la valutazione cardiaca dei parenti in vita e le tecniche NGS dell'autopsia molecolare alle classiche indagini forensi, dimostrando che l'utilizzo di tutte le procedure precedentemente elencate permette una raccolta di dati più accurata per la diagnosi di morte cardiaca improvvisa nelle vittime, e dimostrando inoltre la validità delle tecniche di autopsia molecolare per la diagnosi di SCD nei parenti ancora in vita.



Riassunto esteso

- **Obiettivo:** lo studio effettuato ha come scopo quello di verificare la validità delle tecniche di autopsia molecolare attraverso la rilevazione della sindrome da morte improvvisa per aritmia (SADS , Sudden arrhythmia death syndrome) nelle popolazioni dell'Asia orientale.
- **Metodo:** l'indagine è divisa in due parti; Inizialmente è stata svolta una revisione retrospettiva quinquennale delle autopsie delle giovani vittime svolte negli obitori pubblici. Secondariamente è stato condotto uno studio prospettico dalla durata di due anni , combinando le convenzionali tecniche autoptiche, le tecniche di autopsia molecolare e una valutazione cardiaca dei parenti di primo grado delle vittime.
- **Risultati:** Attraverso lo studio retrospettivo sono state trovate 289 vittime decedute per morte cardiaca improvvisa (SCD, Sudden cardiac death) . La principale causa di morte è la malattia coronarica (35% dei casi), nel 40% dei casi sono state riscontrate patologie dovute a malformazioni cardiache , mentre nel restante 25% la causa di morte rimane ignota. Questi casi potrebbero includere condizioni correlate alla SADS. Nello studio prospettico dei due anni successivi sono state analizzate 21 vittime di SCD , nell'85% delle quali l'autopsia è risultata negativa, ovvero non sono state riscontrate evidenti problematiche . Approfondendo gli studi tramite analisi genetiche si è riscontrato che di questa percentuale , nel 29% dei casi erano presenti mutazioni geniche in eterozigosi (sei varianti di nuova scoperta). Un terzo delle vittime aveva sofferto di sincope e il 14% presentava nella propria storia familiare un caso di SCD. Nei parenti di primo grado che si sono sottoposti ad un test genico (11) , più della metà era portatrice di varianti geniche correlate e tra questi il 10% presentava caratteristiche cliniche relative alla SADS.
- **Conclusioni:** lo studio condotto dimostra l'importanza di incorporare sia una valutazione cardiaca dei parenti in vita sia le tecniche di sequenziamento di nuova generazione dell'autopsia molecolare, alle convenzionali investigazioni forensi per diagnosticare la SCD nelle giovani vittime appartenenti alle popolazioni dell'Asia orientale