



HCM

NOTE SUL TEST GENETICO HCM

(in collaborazione con Dr. LA Lyon's - UC-Davis)

La cardiomiopatia ipertrofica (HCM) è una malattia a base ereditaria nel gatto (1).

Un team dell'Università di Davis-California, tra cui i dottori Meurs e Kittleson, ha allevato per ricerca una famiglia di Maine Coon i cui fondatori erano stati donati dai proprietari per studiare HCM. In questi gatti i ricercatori hanno identificato nel 2005 (2) un'alterazione del DNA del gene MYBPC3 che determina una mutazione (definita A31P e da molti "mutazione Meurs" del Maine Coon) di tipo autosomico dominante fortemente associata alla malattia. Già gli stessi autori chiarivano nella loro pubblicazione che non tutti i gatti che avevano la mutazione si ammalavano di HCM e che viceversa alcuni gatti malati non avevano la mutazione. A questo sono seguiti di recente due lavori di altri autori (3,4) in cui si ribadiva che non tutti i Maine Coon con la mut.A31P sviluppavano la malattia. E in uno di questi (4) si attribuiva, erroneamente, questa discrepanza al fatto che la mutazione non fosse causativa.

I test genetici sarebbe opportuno che avessero penetranza pressochè completa (cioè in cui il test genetico è correlato circa al 100% al carattere), e in genere l'hanno. Esistono però anche diversi casi in cui la penetranza, pur essendo altissima non è del 100%. Ad esempio la mutazione CEP290 della PRA dell'Abissino, la PK deficiency, alcuni geni del colore, così come anche le mutazioni HCM dell'uomo. In questi casi l'insorgenza o l'intensità del fenotipo non sono correlate completamente al genotipo, ciò non significa che è inutile fare il test genetico.

Quali sono i fattori che possono modulare la presenza e la gravità della malattia nel singolo gatto positivo alla mutazione?

- 1) Penetranza incompleta - anche se nel gatto c'è la mutazione causativa, il carattere non si manifesta. La penetranza incompleta è il caso estremo della Espressione Variabile (vedere dopo). Ancora non si conoscono le cause che portano a questa situazione, concorrono sicuramente oltre a fattori genetici, altri fattori biologici e ambientali. Tuttavia la spiegazione più facile è che gatti con forme molto iniziali o leggere non vengano classificate all'ecografia come HCM. In questo gioca molto l'esperienza e la professionalità. Specialisti con centinaia o migliaia di ecocardiografie di gatto alle spalle danno più garanzie di una diagnosi accurata.



- 2) Penetranza legata all'età - HCM da mutazioni in MYBPC3 è una malattia a sviluppo lento e tardivo anche nell'uomo, dove spesso si manifesta dopo i 50 anni. Anche nel Maine Coon l'insorgenza è più tardiva negli eterozigoti rispetto agli omozigoti, e soprattutto nelle femmine. Non si sono ancora determinate con precisione le età di sviluppo della malattia in relazione al genotipo e al sesso del gatto.
- 3) Espressione Variabile - è un fenomeno che si vede in molti caratteri genetici. Per esempio non tutti i gatti che hanno la mutazione del blu diluito presentano lo stesso colore blu/grigio, perché il background genetico e quello ambientale ne influenzano l'espressione generale. Ugualmente in HCM, nonostante esistano diversi gradi di spessore ventricolare, solo lo spessore di classe "grave" porta allo sviluppo di segni clinici, nonostante ci siano alcuni casi di morte improvvisa in forme più lievi. Gatti con HCM possono essere classificati come border line e non essere quindi dichiarati malati.
- 4) Eterogeneità genetica - una stessa malattia può essere causata da mutazioni in punti diversi dello stesso gene o in geni diversi. Questo fenomeno è ben noto nell'HCM umano ed è ragionevole supporlo anche nel gatto. Attualmente nell'uomo sono oltre 1000 le mutazioni in 10 geni che possono causare HCM. Nel gatto ne sono state identificate con certezza solo due: la suddetta A31P nel Maine Coon e la R820W nel Ragdoll, entrambe nel gene MYBPC3, che è anche il gene più mutato nell'uomo. In altre razze come Bengala, Siberiano, Devon Rex, Sphynx, razze miste non ci sono queste due mutazioni o sono pochissimo frequenti. D'altra parte ci sono alcuni casi di Maine Coon che non hanno la mutazione A31P ma hanno HCM. E' quindi molto probabile che ci sia più di una causa genetica di HCM e anche nel Maine Coon è possibile un'altra mutazione (magari poco diffusa)
- 5) Accuratezza del test genetico - I laboratori usano diverse tecniche per l'identificazione della mutazione. Errori nel test genetico possono portare confusione nell'interpretazione. Il sequenziamento diretto del DNA è il sistema più robusto e il "Gold Standard", ma è anche il più costoso. Il rischio in generale dei test a DNA è che uno dei due alleli non si amplifichi (non sia cioè "visibile") e vada "perso". Questo effetto si chiama allelic-drop out (e quindi un eterozigote risulta omozigote). Anche il sequenziamento può cadere in questa trappola, ma è più facile accorgersi dell'errore perché si analizzano tratti molto lunghi del gene. Sistemi alternativi presentano invece maggiori rischi perché analizzano solo il punto di mutazione. Altri sistemi a DNA per l'identificazione delle mutazioni sono ad esempio real-time PCR (TaqMan), restriction fragment length polymorphism (RFLP), allele-specific oligos (ASO) e nuovi sistemi basati sulla spettroscopia di massa.
- 6) Diagnosi clinica non accurata - Non tutte le malattie cardiache sono HCM, la definizione e la classificazione di HCM non è univoca tra i cardiologi. Interpretazioni differenti e non allineate con rigorosi criteri di lettura e classificazione portano a interpretazioni diverse dello stato di malattia



Molti test genetici aiutano a fare scelte selettive più consapevoli e più efficaci. Per quanto riguarda HCM, tenendo pur conto che nella scelta selettiva devono essere considerati tutti i caratteri di interesse, è evidente che si deve cercare di ridurre il rischio di sviluppare e diffondere la malattia. Premesso che non è motivabile utilizzare soggetti malati clinicamente. E' provato che la presenza della mutazione A31P aumenta tantissimo, se non proprio determina, lo sviluppo e la trasmissione di HCM. Gatti omozigoti hanno una probabilità altissima di ammalarsi, oltre a trasmettere a tutti i figli l'allele "mutato". I gatti eterozigoti vanno valutati ed eventualmente utilizzati con accoppiamenti mirati con soggetti negativi e nei casi in cui altri caratteri di pregio ne scoraggino l'eliminazione dalla riproduzione. In generale va spinta al massimo la sostituzione dei riproduttori con soggetti omozigoti negativi, fatta però salva il mantenimento della variabilità genetica e dei tratti di pregio. E' per ciò un processo di eradicazione che dev'essere necessariamente ragionato e graduale.

Sostenere la ricerca

L'unico modo per arrivare a determinare il vero rischio di malattia è seguire l'animale durante la vita con controlli ecocardiografici periodici, confrontati con l'esito del test genetico. Solo la raccolta di molti dati come questi porterà nel tempo alla determinazione del rischio che l'allele patologico comporta. Fin'ora uno studio organico di questo tipo e soprattutto lungo tutta la vita dell'animale non è stato fatto. In questo senso si inserisce il lavoro dell'Osservatorio, che mira ad andare anche oltre e si prefigge di dare un contributo importante alla ricerca sia nel Maine Coon che nelle altre razze che sviluppano HCM ereditario. E questo in collaborazione con altri Laboratori e centri di ricerca internazionali vocati a questo obiettivo.

1. Kittleson MD, Meurs KM, Munro MJ, Kittleson JA, Liu SK, Pion PD, Towbin JA. Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. *Circulation*. 1999 Jun 22;99(24):3172-80.
2. Meurs KM, Sanchez X, David RM, Bowles NE, Towbin JA, Reiser PJ, Kittleson JA, Munro MJ, Dryburgh K, Macdonald KA, Kittleson MD. A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*. 2005 Dec 1;14(23):3587-93. .
3. C. Carlos Sampedrano, V. Chetboul, J. Mary, R. Tissier, M. Abitbol, F. Serres, V. Gouni, A. Thomas, and J.-L. Pouchelon Prospective Echocardiographic and Tissue Doppler Imaging Screening of a Population of Maine Coon Cats Tested for the A31P Mutation in the Myosin-Binding Protein C Gene: A Specific Analysis of the Heterozygous Status. *J Vet Intern Med* 2009;23:91-99.
4. G. Wess, C. Schinner, K. Weber, H. Kuechenhoff, and K. Hartmann. Association of A31P and A74T Polymorphisms in the Myosin Binding Protein C3 Gene and Hypertrophic. *J Vet Intern Med* 2010;24:527-532.
5. Meurs KM, Norgard MM, Ederer MM, Hendrix KP, Kittleson MD. A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in ragdoll hypertrophic cardiomyopathy. *Genomics*. 2007 Aug;90(2):261-4.



L' "Osservatorio Italiano HCM Felina", patrocinato dalle Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano, Perugia e Napoli, vede il coinvolgimento di diverse organizzazioni:

1. Il **Maine Coon Club - ANFI**.
2. L'Associazione Cardiologi ed Ecografisti Clinici Veterinari "**CARDIEC**".
3. Il laboratorio "**VETOGENE**", spin-off dell'Università di Milano

Quali sono le attività nello specifico?

Maine Coon Club - ANFI

Il **Maine Coon Club** (www.mainecoonclub.it) è stato fondatore dell'iniziativa cui hanno presto aderito club di altre razze e singoli allevatori. Ha attivato un portale, all'interno del quale si specificano le procedure e le relative modulistiche di iscrizione al progetto. Le iscrizioni sono aperte a tutti, anche agli allevatori di altre razze comunque soggette a questa patologia (Sacri di Birmania, Ragdoll, Sphinx, ecc.), in pratica è il ponte di collegamento con il mondo degli allevatori e proprietari di gatti. L' **ANFI** Associazione Nazionale Felina Italiana ha nominato la Dott.ssa Francesca Serena come proprio referente all'interno del Comitato Coordinatore Tecnico Scientifico dell'Osservatorio, al quale ha concesso il patrocinio.

CARDIEC

Ha il compito di raccogliere le domande di adesione dei vari studi veterinari, sparsi in tutto il territorio Italiano, e di valutarne l'idoneità in base alla preparazione ed alla strumentazione posseduta. Raccoglie e conserva tutti i dati clinici delle misure effettuate sul cuore con l'obiettivo di definire in modo ancora più preciso di quello attuale i parametri di diagnosi della malattia.

Sul portale (www.hcmfelina.com) vi è un elenco di medici veterinari ecocardiografisti esaminatori che aderiscono al progetto.

E' il veterinario esaminatore che iscrive il gatto all'Osservatorio utilizzando il portale, effettua il controllo ecografico e il prelievo di sangue da inviare al laboratorio. L'iscrizione al progetto prevede delle tariffe agevolate per tutti i test clinici e genetici inerenti HCM, ma comporta l'impegno di mettere a disposizione presso il Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano e gli analoghi Dipartimenti delle Facoltà di Perugia e Napoli, i propri soggetti deceduti per poter eseguire l'autopsia a scopo di ricerca. I dati vengono gestiti in ogni passaggio in forma anonima.



VETOGENE

E' il laboratorio di riferimento per gli esami genetici (www.vetogene.com). Il Laboratorio, ricevuto il campione di sangue effettua la diagnosi genetica ed emette la certificazione al proprietario e al veterinario esaminatore.

VETOGENE inoltre organizza e mantiene un database contenente i dati segnaletici, di diagnosi genetica, di diagnosi clinica ed eventualmente di autopsia. Sulla base di questi dati il Laboratorio effettua periodicamente delle valutazioni di prevalenza e di monitoraggio delle mutazioni note nel Maine Coon e delle altre razze aderenti al progetto, che vengono divulgate in incontri con gli allevatori e pubblicate sul sito del Maine Coon Club.

Il sangue e il DNA dei gatti aderenti al progetto vengono mantenuti gratuitamente ad uso dei proprietari e per scopo di ricerca per oltre 10 anni.

I gatti di razza Maine Coon conferiti all'Osservatorio partecipano al "Linkage Disequilibrium Project- 2010" organizzato dalla Dr.ssa Lyons a UC Davis-California. Nel progetto i gatti dell'Osservatorio rappresentano la razza Maine Coon per l'Europa e per tutto il mondo.

I risultati e i campioni di questo progetto verranno usati a brevissimo per lo studio di HCM col primo microarray-chip felino, cioè per la ricerca, con le nuove tecnologie di indagine su tutto il genoma, di eventuali altri geni coinvolti nello sviluppo di HCM