

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA DELL'INSUFFICIENZA CARDIACA**

**Ciclo XXIV**

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/D1**

**L'AMILOIDOSI TRANSTIRETINO CORRELATA EREDITARIA:  
PROFILO CLINICO, FISIOPATOLOGICO E STORIA  
NATURALE**

**Presentata dalla Dott.ssa Ilaria Gallelli**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Angelo Branzi**

**Relatore**

**Prof. Claudio Rapezzi**

# INDICE

-	<b>INDICE</b> .....	1
-	<b>INTRODUZIONE</b> .....	5
	• <b>CARDIOMIOPATIA AMILOIDOTICA</b> .....	9
	➤ Amiloidosi transtiretino relata.....	17
	➤ Amiloidosi transtiretino relata ereditaria.....	18
	❖ Outcome e prognosi.....	24
	❖ Terapia di supporto.....	24
	❖ Chirurgia dei trapianti.....	25
	❖ Strategie terapeutiche alternative.....	27
	➤ Amiloidosi sistemica senile.....	28
-	<b>CONTRIBUTO SPERIMENTALE</b> .....	30
1.	SCOPO DELLO STUDIO.....	30
2.	PAZIENTI E METODI (I parte casistica di Bologna).....	31
	• <b>SETTING CLINICO E DISEGNO DELLO STUDIO</b> .....	31

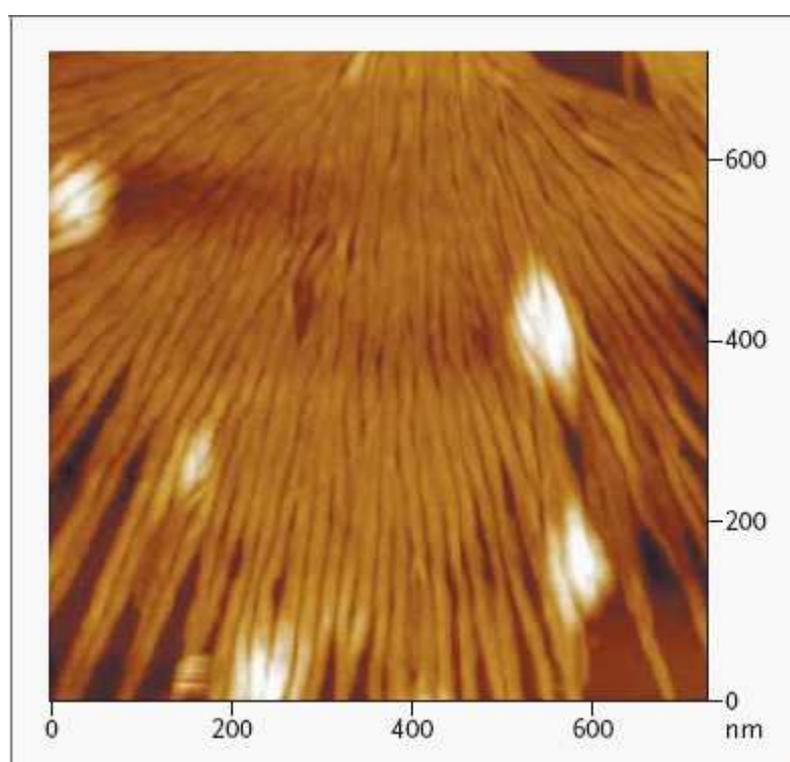
➤	Analisi longitudinale.....	32
•	DEFINIZIONI DIAGNOSTICHE E PATIENT ASSESSMENT.....	33
•	METODICHE STRUMENTALI.....	35
➤	Biopsia endomiocardica ed analisi istologica.....	35
➤	Elettrocardiogramma ed ecocardiogramma.....	35
➤	Analisi genetica.....	36
➤	Aplotipo.....	36
3.	ANALISI STATISTICA.....	37
4.	PERCORSI DIAGNOSTICI.....	38
5.	RISULTATI (I parte casistica di Bologna).....	39
➤	Caratteristiche della popolazione studiata.....	39
➤	Profilo della malattia alla diagnosi e genotipo.....	39
➤	Condivisione dell'aplotipo.....	41
➤	Caratteristiche strumentali.....	41
➤	Follow up generale.....	42

➤ Follow up dei pazienti sottoposti a trapianto.....	43
➤ ATTR vs amiloidosi sistemica senile e cardiomiopatia ipertrofica.....	44
6. DISCUSSIONE.....	45
➤ Eterogeneità fenotipica e correlazione genotipo-fenotipo.....	46
➤ Profilo della malattia dei pazienti con fenotipo cardio e diagnosi differenziale.....	48
➤ Storia naturale.....	50
➤ Implicazioni terapeutiche.....	51
7. LIMITAZIONI.....	54
8. CONCLUSIONI.....	55
9. REGISTRO THAOS (II Parte).....	56
➤ Materiali e metodi.....	56
➤ Risultati del registro Thaos.....	57
❖ Numero e distribuzione geografica dei pazienti.....	57
❖ Distribuzione geografica delle mutazioni.....	58
❖ Eterogeneità fenotipica.....	60

❖ Ruolo del sesso del paziente e del transmitting parent...	63
❖ Trapianto d'organo.....	65
- <b>TABELLE</b> .....	66
- <b>GRAFICI</b> .....	75
- <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	86

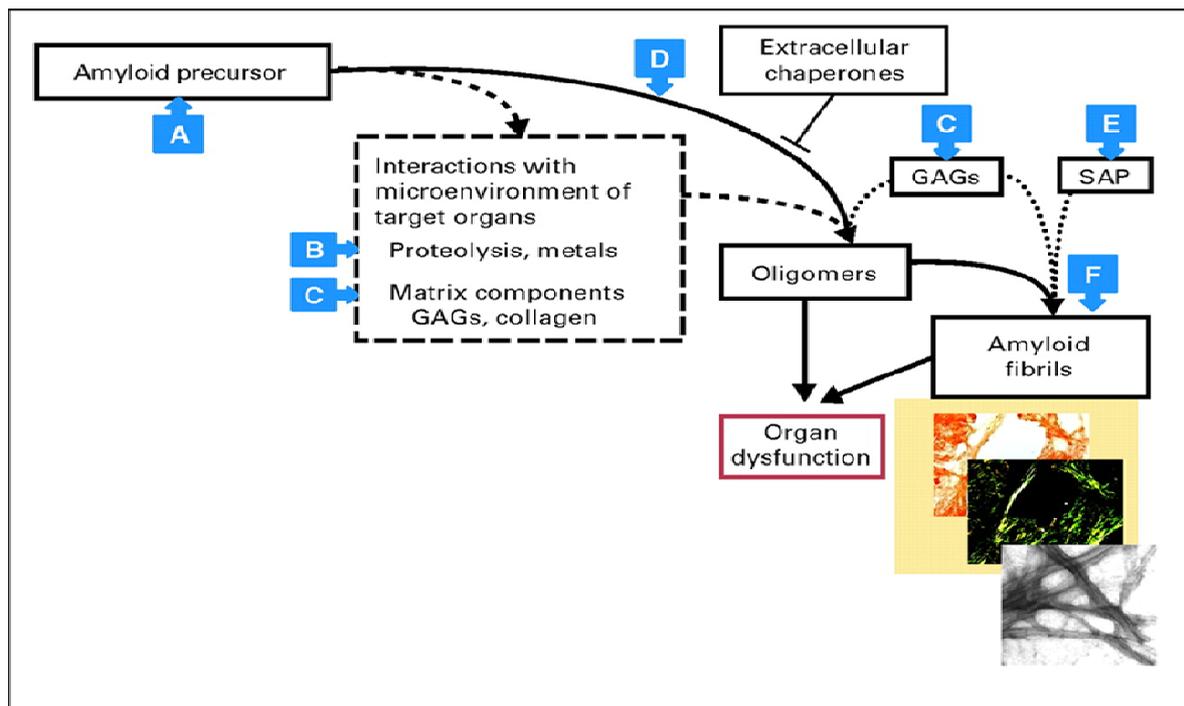
## INTRODUZIONE

All'origine di un numero via via crescente di patologie è riconosciuta la mancata acquisizione da parte di proteine di uno stato conformazionale funzionale. Queste patologie sono generalmente chiamate “patologie da protein misfolding” ed il gruppo più ampio è associato alla conversione di peptidi o proteine da uno stato funzionale solubile ad aggregati fibrillari altamente organizzati con alla base una struttura a foglietto beta-ripiegato chiamato amiloide [Merlini J Clin Oncol 2011; Merlini NEJM 2003 + fig 1]



**Figura 1.** Visione al microscopio a forza atomica di fibrille di amiloide

Il processo che porta alla formazione dell'amiloide è complesso e coinvolge diversi fattori, molti dei quali ancora ignoti, altri recentemente identificati, che saranno obiettivo di nuovi farmaci target atti ad inibire specifici passaggi della cascata amiloidogena [Merlini J Clin Oncol 2011+ fig 2]



**Figura 2.** Cascata degli eventi molecolari che portano all'amiloidosi. Il precursore amiloidogenico acquisisce il suo potere patogeno in diversi modi (a seconda del tipo di patologia amiloidotica generata - vedi testo) che portano alla formazione di monomeri ed oligomeri che sono alla base dell'impilamento in strutture fibrillari che precipitano e si depositano nei tessuti sotto forma di amiloide. Affinchè questo avvenga la proteina subisce l'effetto dell'environment extracellulare (ambiente, chimica locale, enzimi, chaperones) che la costringe a ripiegarsi in un punto specifico e precipitare. Una volta precipitata viene avvolta dai costituenti della matrice extracellulare quali glicosaminoglicani, collagene e la SAP (serum amyloid protein) che creano una sorta d'involucro che impedisce il riassorbimento. La complessità di questo processo fa sì che ogni step possa essere potenziale target terapeutico. Le lettere in blu identificano infatti i vari punti di possibile interruzione terapeutica del processo amiloidogenico. A) Eliminazione del precursore (es. CT in forma AL e trapianto di fegato in ATTR); B) Identificazione di inibitori di proteasi (in corso trials); C) Identificazione di sostanze che si legano ai GAG impedendo il legame con il precursore (eprosidate già usato con successo in AA); D) Identificazione di stabilizzatori del tetramero che impediscono il malripiegamento e l'aggregazione del precursore (diflunisal e tafamidis); E) Identificazione di sostanze che eliminano la SAP; F) Clearance dei depositi di amiloide attraverso specifici anticorpi.

Il termine amiloidosi fa quindi riferimento ad un gruppo eterogeneo di patologie acquisite o ereditarie, localizzate o sistemiche, che condividono la caratteristica deposizione extracellulare di proteine fibrillari insolubili, con conseguente disorganizzazione dell'architettura tissutale degli organi coinvolti [Falk 2010; Shah Arch 2006].

Benché le proteine implicate nel processo amiloidogenico siano diverse a seconda del tipo di amiloidosi (almeno 27 quelle identificate, vedi tabella 1) e acquisiscano il potere amiloidogenico in diversi modi (es. propensione intrinseca ad assumere una conformazione patologica che però diventa evidente solo con l'età – transtiretina wild type nella forma sistemica senile; alte concentrazioni proteiche persistenti – beta2 microglobulina nei pazienti emodializzati; sostituzione di singolo aminoacido strutturale – forma transtiretina relata familiare; rimodellamento proteolitico di proteina precursore – malattia di Alzheimer; mutazioni geniche codificanti il dominio variabile delle catene leggere – forma AL) [Merlini NEJM 2003] esse condividono caratteristiche proprietà conformazionali e tintoriali [Merlini NEJM 2003; Falk 2010; Shah 2006; Sipe Amyloid 2010]:

- un aspetto di sostanza amorfa al microscopio a luce normale con i comuni fissanti (figura 3, riquadro a sinistra);
- una caratteristica birifrangenza verde mela (“apple green”) al microscopio a luce polarizzata con la colorazione Rosso Congo (figura 3, riquadro a destra);
- un'ultrastruttura composta da fibrille di diametro variabile tra 7 e 10 nm, costituite da amiloide e da altri fattori additivi come i proteoglicani, al microscopio elettronico;
- una conformazione a foglietto beta-ripiegato (“ $\beta$  pleated-sheet”) visibile con spettroscopia a raggi infrarossi.

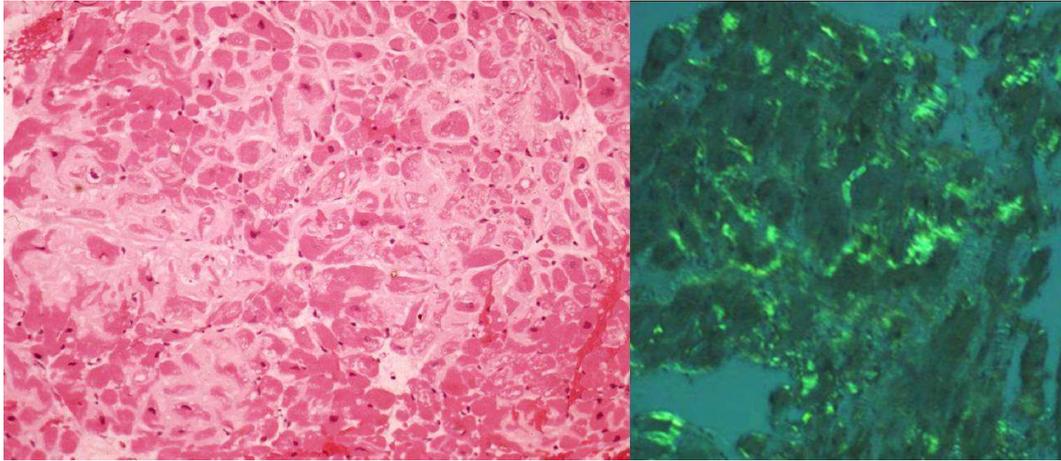


Figura 3. Rilievi istologici tipici di miocardio infiltrato da sostanza amiloide: nel riquadro a sinistra i depositi di amiloide (in rosa chiaro dopo colorazione con Ematossilina-Eosina) hanno la caratteristica di una sostanza omogenea ed eosinofila che infiltra diffusamente il tessuto miocardico, isolando anatomicamente e funzionalmente singole cellule o gruppi di cellule. La tipica birifrangenza verde mela (nel riquadro a destra) si osserva al microscopio a luce polarizzata dopo colorazione con rosso Congo.

---

Dal punto di vista biochimico, la struttura fibrillare differisce in base al precursore proteico e la classificazione delle amiloidosi attualmente in uso, approvata dal “World Health Organization nomenclature subcommittee” [Sipe Amyloid 2010], si basa proprio sulla natura chimica della fibrilla di amiloide, che viene designata con la lettera A seguita da un suffisso che rappresenta l’abbreviazione del nome della proteina precursore. Per esempio, quando le fibrille di amiloide derivano dalle catene leggere (Light chains) delle immunoglobuline, la fibrilla di amiloide è denominata AL e la patologia associata “amiloidosi AL” (tabella 1).

La natura proteica delle fibrille può incidere sull’espressione della patologia, sia in termini di specifici organi coinvolti che di manifestazioni cliniche di tale coinvolgimento.

## CARDIOMIOPATIA AMILOIDOTICA

Sebbene quasi ogni proteina amiloidogena possa causare amiloidosi cardiaca, generalmente nel contesto di una malattia sistemica, la predilezione per il cuore varia molto a seconda dello specifico tipo. In particolare alcune lo coinvolgono rarissimamente mentre altre quasi esclusivamente. Inoltre in alcune forme è la principale causa di morbilità e mortalità dei pazienti, in altre può invece rappresentare un reperto accidentale e privo di significato funzionale [Falk 2010].

Secondo le due principali classificazioni internazionali delle cardiomiopatie la cardiomiopatia amiloidotica, stereotipo delle cardiomiopatie infiltrative, è una cardiomiopatia restrittiva associata ad incremento degli spessori parietali (figura 4) ed aumentata rigidità strutturale che causa rapido incremento delle pressioni intraventricolari in associazione solo ad un lieve incremento dei volumi di riempimento [Maron Circulation 2006; Elliot Eur Heart J 2008].

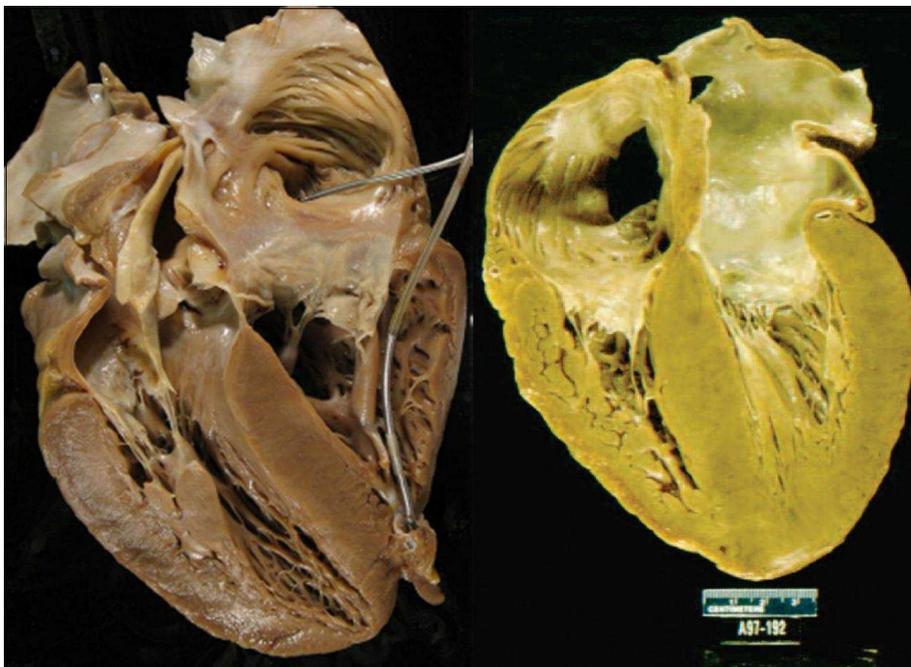


Figura 4. Sezioni autoptiche di due cuori con estesa infiltrazione amiloidotica da amiloidosi AL (a sinistra) e da transtiretina wild-type (a destra). In entrambi i casi le cavità atriali risultano ingrandite, le cavità ventricolari non sono dilatate ed è presente un ispessimento marcato e concentrico della parete del ventricolo sinistro e (parte destra della figura) della parete libera del ventricolo destro e del setto interatriale, elementi tipici di infiltrazione amiloidotica.

---

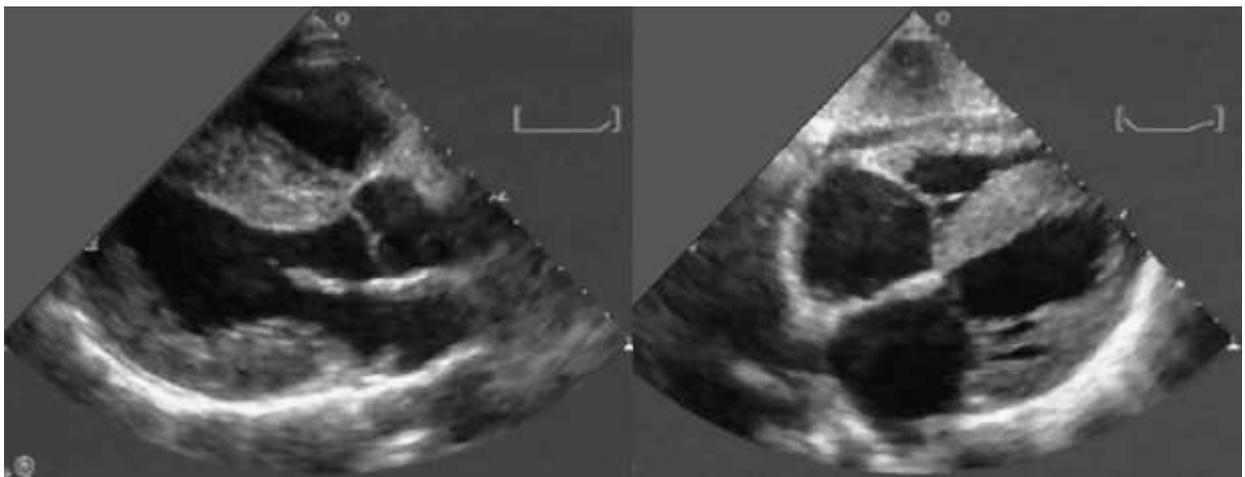
Oltre al più evidente coinvolgimento parietale (responsabile della principale manifestazione clinica della cardiomiopatia quale lo scompenso cardiaco prevalentemente destro), l'amiloide infiltra i vasi intramiocardici (determinando ischemia miocardica), gli atri (favorendo la comparsa di fibrillazione atriale e la formazione di trombi) ed il sistema di conduzione determinando la comparsa di blocchi di branca ed occasionalmente di blocchi seno-atriali ed atrio-ventricolari talora con necessità di impianto di pace-maker [Falk 2010]. Nonostante una diagnosi definitiva si possa ottenere rapidamente attraverso l'analisi istologica ed immunoistochimica e la biologia molecolare [Falk 2010] ed i recenti progressi in campo ecocardiografico, in risonanza magnetica ed in cardiologia nucleare, l'amiloidosi cardiaca risulta ancora una malattia ampiamente sottodiagnosticata per almeno due ragioni: in primo luogo spesso le caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche sono aspecifiche e possono mimare quelle di altre malattie più frequenti, incluse la cardiomiopatia ipertrofica, la cardiopatia ipertensiva e la cardiopatia ischemica; in secondo luogo, ad eccezione dei casi in cui la diagnosi di amiloidosi sistemica è già stata fatta e quindi i sintomi cardiaci sono rapidamente attribuiti ad amiloidosi cardiaca, quando l'amiloidosi coinvolge isolatamente il cuore o quando predominano le manifestazioni cardiache nell'ambito di un interessamento multiorgano non diagnosticato, il sospetto clinico può non emergere fino alle fasi tardive della malattia [Falk 2010]. Il problema è che le diverse amiloidosi sistemiche progrediscono con una velocità variabile ma in tutti i casi sono la presenza e la severità del coinvolgimento cardiaco a determinarne la prognosi e

per tale motivo è fondamentale una diagnosi il più possibile tempestiva al fine di poter offrire al paziente l'opportunità di ricevere il trattamento adeguato.

Dal punto di vista elettrocardiografico la serie più ampia di pazienti con amiloidosi confermata alla biopsia [Murtagh Am J Cardiol 2005] ha documentato che solo il 46% dei pazienti presentava il classico reperto di bassi potenziali (ampiezza QRS  $\leq 0.5$  mV nelle derivazioni periferiche o  $\leq 1$  mV nelle derivazioni precordiali) - peraltro solo il 30% dei pazienti con forma transtiretina relata ed il 50% con forma AL [Rapezzi Circ 2009; Garcia Pavia]. Il 16% presentava ipertrofia ventricolare sinistra. La relazione tra i voltaggi del QRS all'ECG e l'ipertrofia ventricolare sinistra all'ecocardiogramma sembra essere peculiare e la cardiomiopatia amiloidotica può essere opportunamente sospettata da indici non invasivi combinando i reperti ECG-Eco: è stata trovata una relazione inversa tra i voltaggi ECG (indice di Sokolow) e la massa ventricolare sinistra in associazione alla diagnosi di cardiomiopatia amiloidotica AL [Carroll Am J Cardiol 1982]; la combinazione di un pattern con bassi voltaggi e lo spessore del setto  $> 1.98$  cm identifica l'amiloidosi cardiaca (AL) con una sensibilità del 72% ed una specificità del 91% [Rahman JACC 2004]. Il QRS score totale diviso per la massa ventricolare sinistra indicizzata per la superficie di massa corporea fornisce un'elevata performance diagnostica nell'identificare la cardiomiopatia amiloidotica (ad eziologia sia ATTR che AL) tra i pazienti con aumentati spessori parietali del ventricolo sinistro (inclusa cardiomiopatia ipertrofica e cardiopatia ipertensiva) [Quarta Circulation 2010]. Altre alterazioni elettrocardiografiche includono anomalie della ripolarizzazione a tipo ischemico/aspecifico, pattern pseudoinfartuale, emblocco anteriore sinistro, blocchi di branca, disturbi del ritmo (fibrillazione atriale) [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010; Rapezzi Circulation 2009].

L'ecocardiogramma rappresenta il principale strumento per una diagnosi non invasiva di cardiomiopatia amiloidotica. Essa è genericamente caratterizzata dall'ispessimento delle pareti del ventricolo sinistro in assenza di dilatazione

ventricolare sinistra [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010]. Indizi aggiuntivi per una cardiomiopatia infiltrativa includono l'ispessimento della parete libera del ventricolo destro e del setto interatriale, una significativa dilatazione biatriale, il diffuso ispessimento delle valvole atrio-ventricolari ( $> 5$  mm) ed un lieve versamento pericardico [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010 + fig 5]. La frazione d'eiezione spesso è normale ma sia la velocità del wall motion ventricolare sia lo strain/strain rate del miocardio ventricolare sono frequentemente depresse. In modo analogo quando l'accorciamento radiale è ancora conservato risultano già, e quindi precocemente, alterate la contrazione longitudinale e la torsion ventricolare sinistra. Tali dati si possono acquisire sia con la metodica TDI sia con lo speckle tracking imaging [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010; Selvanayagam JACC 2007; Koyama Soc Echoc 2004]. Ciò è spiegato dal fatto che, i miociti subendocardici, essendo orientati longitudinalmente sono particolarmente suscettibili al danno da accumulo determinando un precoce impairment della contrazione longitudinale [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010]. Il pattern di riempimento ventricolare generalmente evolve da un pattern ad alterato rilasciamento, ad uno pseudonormale, ad uno restrittivo. L'analisi combinata del pattern transmitralico e del TDI indica elevati valori della pressione di riempimento telediastolica ventricolare sinistra e/o un pattern di riempimento restrittivo [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010].



**Figura 5.** Ecocardiogramma di un paziente con amiloidosi familiare transtiretina relata. A sinistra: parasternale asse lungo. A destra: proiezione sottocostale. Da notare l'aumentato spessore del setto interventricolare, delle pareti ventricolari sinistre e destra e del setto interatriale. E' anche visibile un lieve versamento pericardico.

La risonanza magnetica rappresenta una modalità molto promettente per l'identificazione di depositi di amiloide intramiocardici fornendo due reperti altamente specifici: un wash out del gadolinio più veloce del normale sia dal sangue che dal cuore ed un late enhancement, spesso con una distribuzione diffusa, globale e subendocardica [Maceira Circulation 2005].

Un ulteriore esame diagnostico a disposizione è rappresentato dalla scintigrafia total body. Nel corso degli ultimi decenni sono stati studiati diversi traccianti scintigrafici (principalmente fosfonati) per la valutazione dei depositi di amiloide a livello cardiaco, con risultati molto eterogenei e talora contraddittori. La scintigrafia con  $^{123}\text{I}$ -SAP fornisce una affidabile valutazione semiquantitativa dell'estensione e della distribuzione dei depositi di amiloide in varie parti del corpo ma non specificamente nel cuore [Glaudemans AW Eur J Nucl Med Mol Imaging 2009]. La scintigrafia con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -aprotinina identifica i depositi di amiloide extra-addominali inclusi quelli cardiaci. Lo  $^{123}\text{I}$ -metaiodiobenzilguanidina identifica indirettamente il danneggiamento delle terminazioni nervose simpatiche cardiache dovuto al deposito di amiloide [Glaudemans AW Eur J Nucl Med Mol Imaging 2009]. La scintigrafia con  $^{123}\text{I}$ -metaiodiobenzilguanidina identifica il deposito miocardico di amiloide nella forma TTR relata ma non in quella da AL facilitando la diagnosi differenziale tra l'amiloidosi da transtiretina da quella AL nella pratica clinica [Rapezzi Eur J Nucl Med Mol Imaging 2011 + figura 6]. Inoltre, nei pazienti con ATTR, la scintigrafia con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DPD, può identificare precocemente l'infiltrazione miocardica ancora prima che appaiano alterazioni ecocardiografiche. La captazione miocardica del tracciante è correlata in modo lineare con la massa ventricolare sinistra e rappresenta un determinante prognostico dell'outcome nella ATTR sia da solo che in

combinazione con lo spessore parietale del ventricolo sinistro [Rapezzi JACC Cardiovasc Imaging 2011 + figura 7].

**Figura 6.** Rilievi scintigrafici nei pazienti con amiloidosi cardiaca e nei controlli non affetti.

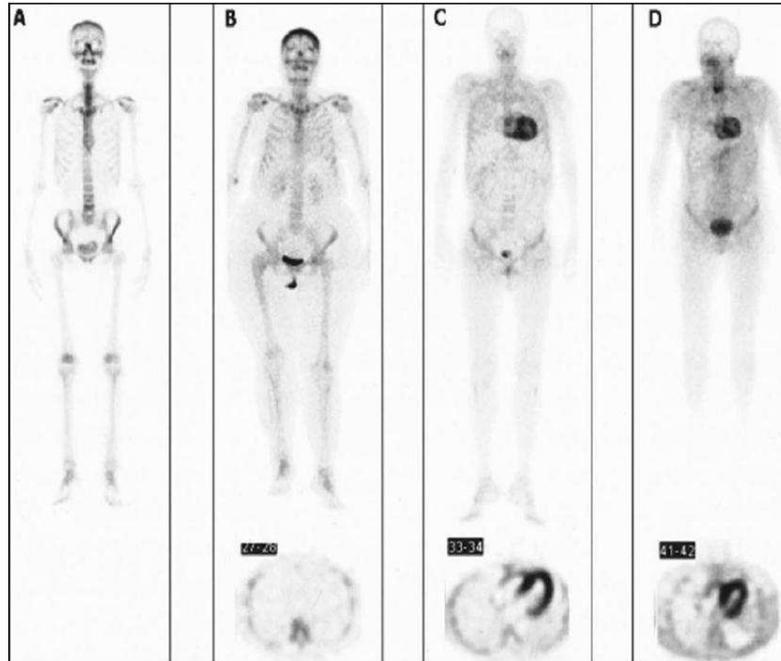
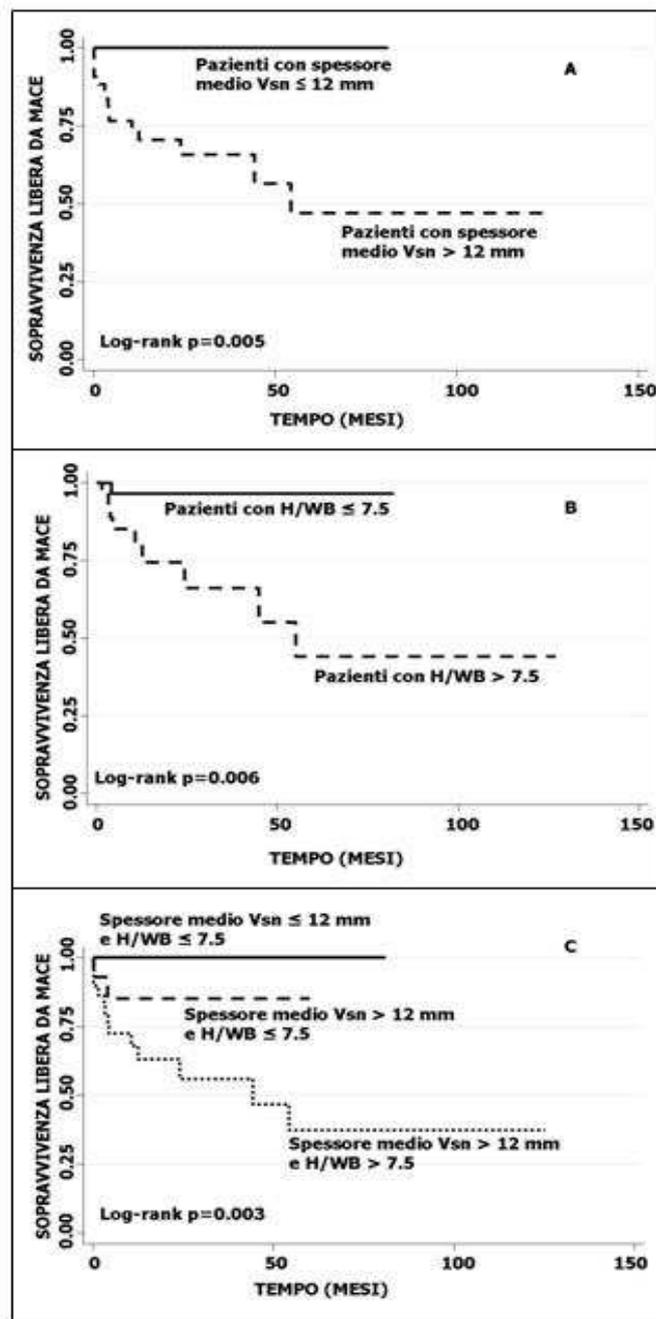


Figura 6. Esempi rappresentativi dello spettro di uptake miocardico di  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD tra pazienti con amiloidosi cardiaca TTR-relata o con amiloidosi AL e controlli non affetti. La figura riporta le immagini anteriori total-body e (in basso) le immagini SPECT cardiache trasversali degli stessi pazienti. (A) Controllo non affetto, senza uptake miocardico del tracciante. (B) Paziente con amiloidosi AL e cardiomiopatia documentata, senza segni di uptake miocardico di  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD; un lieve uptake del tracciante è visibile solo a livello dei tessuti molli. (C e D) Due pazienti con amiloidosi TTR-relata e cardiomiopatia documentata: entrambi mostrano un forte uptake miocardico di  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD (con assente uptake del tracciante a livello osseo); in uno dei pazienti (D) è inoltre visibile un uptake del tracciante a livello splancnico.

Figura 7. Sopravvivenza libera da eventi cardiovascolari maggiori (MACE) nei pazienti con ATTR in base (A) alla presenza di uno spessore medio parietale del ventricolo sinistro

aumentato (cioè  $> 12$  mm,  $V_{sn}$ =ventricolo sinistro), (B) alla mediana di H/WB e (C) alla combinazione delle due variabili (in tutti i casi la sopravvivenza libera da MACE è stata censorizzata al momento del trapianto d'organo). La combinazione di uno spessore parietale del ventricolo sinistro  $> 12$  mm e di valori di H/WB  $> 7,5$  è risultata associata al maggior tasso di eventi (C).

---



Il gold standard diagnostico rimane comunque la dimostrazione istologica, in almeno un organo coinvolto della caratteristica birifrangenza “apple green” al microscopio a luce polarizzata, dopo fissazione del prelievo con il colorante rosso Congo [Rapezzi G Ital Cardiol 2007]. Si ricorda che in caso di ecocardiogramma tipico la biopsia endomiocardica non è strettamente necessaria per una diagnosi finale di coinvolgimento cardiaco se è presente una biopsia positiva per amiloide di altro tessuto [Arbustini Amyloid 2002]. Tale indagine risulta però fondamentale in caso di: esclusivo coinvolgimento cardiaco; forte sospetto di amiloidosi con prelievi biotici in altre sedi (es. grasso addominale) negativi; diagnosi di amiloidosi sistemica ma ipertrofia ventricolare sinistra giustificabile dalla copresenza di altre cause (es. ipertensione arteriosa o stenosi aortica) [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010; Dubrey Heart 2011].

Una diagnosi generica di amiloidosi cardiaca non è una diagnosi sufficiente ed il clinico che si ferma a questa etichetta diagnostica senza approfondirne l’aspetto eziologico rinuncia, di fatto, a curare il proprio paziente da una parte non effettuando terapie adeguate e dall’altro effettuandone di inappropriate talora con risultati catastrofici [Falk Prog Cardiovasc Dis 2010; Dubrey Heart 2011].

L’amiloidosi cardiaca non rappresenta infatti una singola entità, ma è caratterizzata da un background patogenetico eterogeneo riconducibile, nei Paesi sviluppati, principalmente a tre forme eziologiche distinte [Rapezzi Circulation 2009; Dubrey Heart 2011].

1) l’amiloidosi primaria (forma AL), la forma più frequente di amiloidosi sistemica, secondaria alla presenza di cloni plasmacellulari nel midollo osseo che producono catene leggere libere circolanti delle immunoglobuline responsabili dei depositi fibrillari [Merlini J clin Oncol 2011; Rapezzi Circulation 2009].

2) l'amiloidosi ereditaria correlata alla transtiretina (ATTR), malattia autosomica dominante con espressività variabile e penetranza incompleta, che può essere causata da oltre 100 mutazioni del gene della transtiretina [Rapezzi Circulation 2009].

3) l'amiloidosi sistemica senile (Senile Systemic Amyloidosis, SSA) da depositi di transtiretina non mutata (wild-type) [Rapezzi Circulation 2009].

Nei Paesi in via di sviluppo è prevalente l'amiloidosi secondaria (AA) a causa di infezioni croniche e di stati infiammatori inadeguatamente trattati [Dubrey Heart 2011].

Infine, ci sono rare forme ereditarie non transtiretino correlate quali quelle secondarie a mutazioni per il fibrinogeno, l'apolipoproteina (Apo-AI ed Apo-AII) e la gelsolina [Dubrey Heart 2011]. Le mutazioni per il fibrinogeno e l'apolipoproteina determinano principalmente nefropatie progressive e solo raramente causano cardiomiopatie. La gelsolina mutata invece, endemica in Finlandia ma estremamente rara nel resto del mondo, provoca principalmente neuro e nefropatie e a livello cardiaco si manifesta esclusivamente con disturbi della conduzione [Dubrey Heart 2011].

L'eziologia finale di amiloidosi cardiaca è determinata dall'indagine immunoistochimica (con anticorpi specifici) sul reperto biotico [Arbustini Amyloid 2002] (con necessità di indagine genetica per la ricerca di mutazioni in caso di forma transtiretino relata) sebbene moderne tecniche di proteomica siano usate sempre più di frequente poiché ritenute ancor più specifiche e sensibili [Stoppini 2009].

### **Amiloidosi transtiretino-relata**

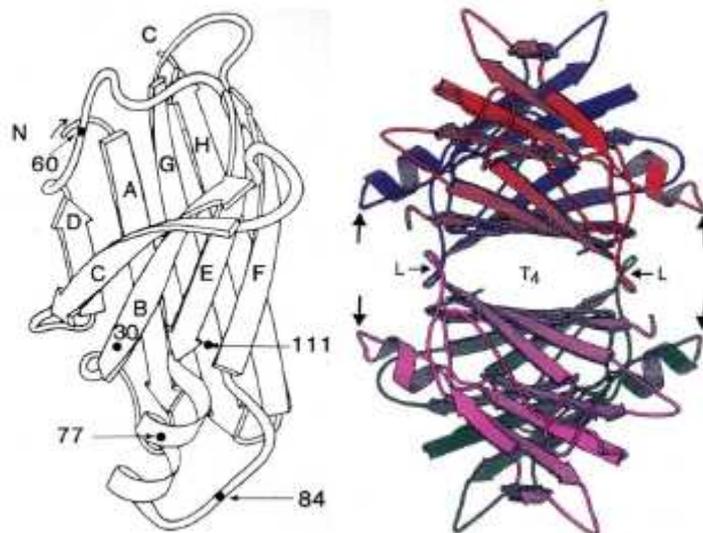
La transtiretina è una delle 27 proteine in grado di formare le fibrille di amiloide in vivo ed è associata a due forme distinte di cardiomiopatia amiloidotica: 1) la

forma transtiretino relata familiare (ATTR) causata da mutazioni (in genere puntiformi) del gene per la transtiretina (TTR); 2) l'amiloidosi sistemica senile (SSA) forma non ereditaria e associata a depositi di transtiretina non mutata (wild-type) [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010].

### **Amiloidosi transtiretino relata ereditaria**

L'ATTR è la forma più frequente di amiloidosi sistemica familiare.

La TTR umana è una proteina che si trova nel plasma (20-40 mg/dl) e nel fluido cerebro spinale (10-40 microg/ml) inizialmente chiamata pre-albumina (in quanto all'elettroforesi migra più vicino all'anodo rispetto all'albumina), termine fuorviante in quanto la TTR non è un precursore dell'albumina. La TTR circola come omotetramero composto da 4 subunità identiche legate in modo non-covalente. Ogni monomero è costituito da 127 aminoacidi ordinati in 8 domini antiparalleli a beta-foglietto [Benson Muscle Nerve 2007 + figura 8]. Sebbene il fegato sia il sito di maggior sintesi della TTR sono stati identificati altri due siti di sintesi extraepatica quali il plesso coroideo e la retina. In circolo la TTR si trova legata sia alla tiroxina che al retinolo/vitamina A e sebbene la sua funzione non sia precisamente nota si pensa sia responsabile del trasporto della L- tiroxina al cervello [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010; Benson Muscle Nerve 2007; Connors Amyloid 2003 + figura 8].



**Figura 8.** A sinistra il diagramma del monomero di TTR che mostra alcuni siti di mutazioni patologiche. N: sito amino terminale dei 127 aa; C: sito carbossiterminale. Le punte di freccia indicano la direzione dall’N al C degli 8 beta-foglietti antiparalleli su due piani DAGH e CBEF. A destra il diagramma del tetramero in cui ogni monomero è rappresentato da un colore diverso. Le frecce più grandi indicano il sito di legame per il retinolo/vitamina A.

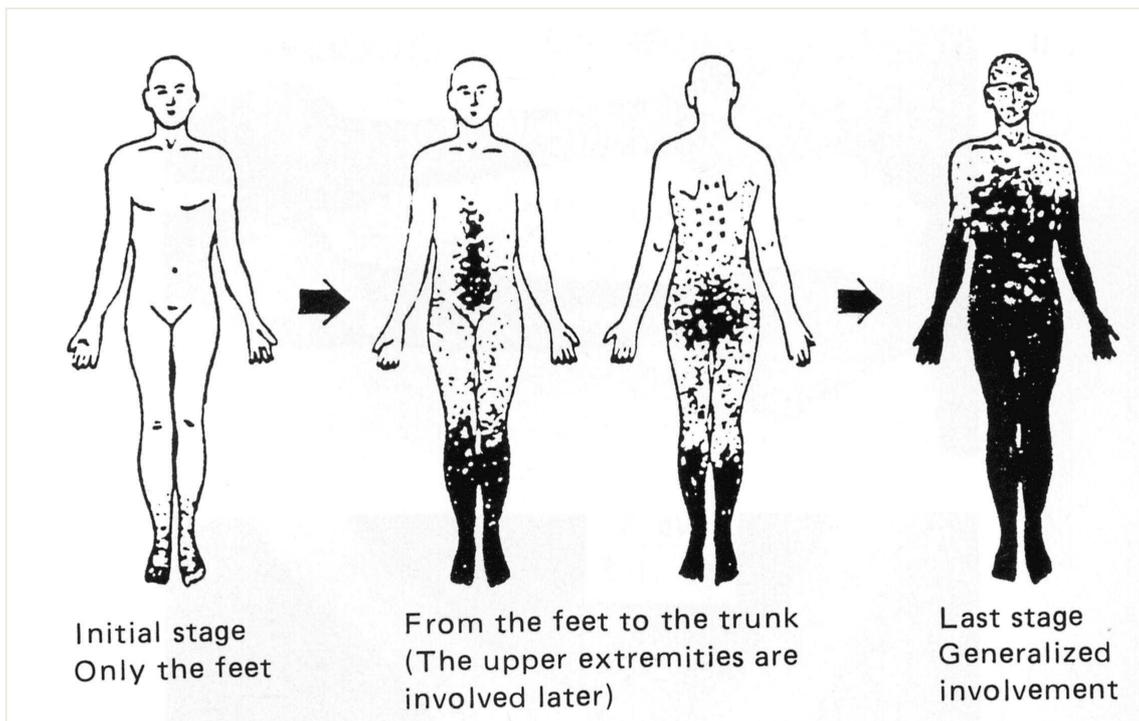
Il gene che codifica per la TTR è collocato sul cromosoma 18 ed è costituito da 4 esoni e 5 introni. Nel corso delle ultime decadi sono state identificate circa 100 mutazioni geniche da cui derivano altrettante varianti proteiche. La maggior parte di queste mutazioni, il più delle volte risultato della sostituzione di un singolo nucleotide nel gene TTR, si traduce in un prodotto patologico e nella maggior parte dei casi (circa 80) la patogenicità di questo prodotto si traduce proprio nella propensione a formare depositi di fibrille di amiloide [Benson Muscle Nerve 2007; Connors Amyloid 2003; Tsuzuki 1985].

Le forme ATTR sono malattie rare (prevalenza ancora non nota) a trasmissione autosomica dominante in cui un solo allele mutato è necessario per sviluppare la patologia ed in cui la maggior parte degli individui affetti è eterozigote per la mutazione patogena e quindi produce sia la TTR normale che la variante mutata [Benson Muscle Nerve 2007]. Non è ancora chiaro il ruolo dell’omozigosi né in termini di penetranza, né di eventuale anticipazione, né di entità di manifestazione clinica. La penetranza di questa patologia è estremamente variabile e la stessa mutazione può fenotipicamente presentarsi in maniera diversa tra i vari componenti della stessa famiglia o non presentarsi affatto (portatori sani) [Falk 2010].

Sebbene a causa delle segnalazioni iniziali le forme ATTR siano state considerate patologie prettamente neurologiche sono in realtà fenotipicamente estremamente eterogenee e lo spettro clinico varia da forme con un coinvolgimento quasi esclusivamente neurologico (autonomico/periferico o in casi più selezionati centrale) a forme con una presentazione strettamente cardiologica [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010; Benson Muscle Nerve 2007].

Nel tempo si è scoperto che questa eterogeneità è correlata a diversi fattori quali le specifiche mutazioni sottostanti, il sesso dei pazienti (coinvolgimento miocardio meno rilevante nelle donne suggerendo che alcune caratteristiche biologiche possono proteggerle dall'infiltrazione di sostanza amiloide [Rapezzi Amyloid 2008; Bittencourt Eur J Neurol 2005]) e del genitore responsabile della trasmissione del gene mutato (malattia più precoce e grave se trasmessa dalla madre come descritto nelle famiglie Svedesi e Portoghesi affette da mutazione Val30Met) [Hellman U Amyloid 2008; Bonaiti Amyloid 2009], la composizione delle fibrille (transtiretina intera o frammentata [Bergstrom J Pathol 2005]), la distribuzione geografica e la tipologia di aggregazione: endemica o non endemica [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010; Bittencourt Eur J Neurol 2005; Ikeda Neurology 2002; Suhr J Intern Med 2003; Ohmori J Med Gent 2004; Conceicao Muscle Nerve 2007].

Fino a 25 anni fa si credeva che la malattia fosse unicamente conseguenza della mutazione Val30Met (sostituzione di una Valina con una Metionina in posizione 30) in quanto a partire dagli anni '60 tutte le segnalazioni ed i casi studiati derivavano da focolai giapponesi, svedesi e portoghesi in cui tale mutazione risulta endemica. La prevalente estrinsecazione neurologica della malattia nelle forme endemiche relate alla mutazione Val30Met, ha fatto sì che l'ATTR venisse peraltro da sempre considerata una malattia di pertinenza neurologica, tanto da essere comunemente chiamata Polineuropatia Amiloidotica Familiare (FAP). Nella forma endemica "classica" Portoghese e Giapponese la patologia è caratterizzata da una polineuropatia sensitivo-motoria ad alta penetranza (almeno 80%) [Soares Eur J Of Human Genetics 2004], che colpisce egualmente maschi e femmine, che si manifesta intorno ai 30-35 anni (mostrando il fenomeno dell'anticipazione generazionale [Soares Eur J Of Human Genetics 2004]) con una disfunzione delle fibre periferiche degli arti inferiori che poi si estende alle estremità prossimali e che raggiunge lo stadio terminale in 10-15 aa [Ando Arch Neurol 2005 + fig 9].



**Figura 9.** Coinvolgimento neurologico progressivo nella FAP.

Più lenta, tardiva e con bassissima penetranza (circa il 5%) [Soares Eur J Of Human Genetics 2004] la forma endemica Svedese che nonostante preveda analoga mutazione non sembra avere un fondatore comune alle altre due [Ohmori J Med Gent 2004; Drugges J Med Genet 1993]. Di recente acquisizione peraltro, il dato di due distinte forme svedesi Val30Met correlate (Tipo A e tipo B), a seconda della composizione fibrillare di TTR, troncata o intera [Okamoto Amyloid 2011]. Eziologicamente, a livello dei nervi periferici, la deposizione di amiloide inizia intorno alle arteriole perforanti e progredisce fino a formare larghi depositi fibrillari che prima dislocano e demielinizzano ed infine sostituiscono del tutto le fibre nervose [Benson Muscle Nerve 2007]. I primi sintomi accusati sono solitamente disturbi della sensibilità termica e della nocicezione, parestesie e disestesie agli arti inferiori. La funzione motoria è generalmente conservata fino a fasi avanzate della compromissione sensitiva ma alla fine si estrinseca con importante disabilità [Rapezzi Nat Rev 2010; Gasperini Clinical and Experimental]. In associazione alle alterazioni sensitive

si manifesta precocemente anche una disautonomia progressiva dovuta sia a denervazione simpatica che parasimpatica, caratterizzata da disfunzione erettile (che talora nei maschi giovani rappresenta il sintomo iniziale), turbe della motilità gastrointestinale (costipazione alternata a diarrea che determina perdita di peso e malnutrizione – importanti fattori prognostici in questa malattia [Suhr *Journal of Internal Medicine* 1994]), ritenzione o incontinenza urinaria ed ipotensione ortostatica [Benson *Muscle Nerve* 2007; Ikeda *Neurology* 2002]. Il cuore nella vera FAP conosce quasi esclusivamente disturbi della conduzione talora tali da richiedere l'impianto di pace-maker. Le cardiomiopatie sono invece rarissime e, nel caso, tardive [Ikeda *Neurology* 2002]. Presenti infiltrati renali, anche consistenti (identificazione post-mortem) ma con funzione d'organo del tutto conservata fino alla fine [Ikeda *Neurology* 2002].

La successiva segnalazione, in tutto il mondo, di nuove mutazioni della TTR (spesso confinate a piccole etnie o limitate aree geografiche o addirittura a famiglie isolate) o della stessa mutazione in aree non endemiche [Conceicao *Muscle Nerve* 2007; Koike *Arch Neurol* 2002], ha sottolineato l'esistenza di una eterogeneità genotipica a cui corrisponde un'ampio spettro di manifestazioni cliniche nell'ambito della quale si inserisce anche il coinvolgimento miocardico che può risultare solo un componente di un complesso quadro principalmente neurologico fino a diventare praticamente l'unica espressione di malattia. Questo è il caso della mutazione Val122Ile Afro-Americana (4% della popolazione portatrice in eterozigosi – penetranza reale non nota) [Jacobson *Hum Gent* 1996; Jacobson *Nejm* 1997; Jacobson *Am J Cardiol* 2011; Dharmarajan 2012]; della mutazione Thr60Ala Irlandese (contea di Donegal) e degli Appalachi [Benson *Arthritis and rheumatism* 1987; Sattianayagam 2011]; della mutazione Leu111Met Danese [Suhr *J Intern Med* 2003; Ranlov *Am J Med* 1992]. Le prime due sono caratterizzate da severa cardiomiopia restrittiva ad insorgenza tardiva (VI-VII decade) senza (i primi) o con estremamente lento (i secondi) coinvolgimento neurologico. La forma danese invece è caratterizzata dalla elevatissima penetranza (100%) di una grave

cardiomiopatia ad insorgenza precoce (30-40 aa) e la cui neuropatia non si manifesta (per mancanza di tempo) se non nei pazienti trapiantati <sup>[24]</sup>. In letteratura sono presenti due unici report relativi alla mutazione Ile68Leu. Il primo è relativo ad un paziente tedesco > 60 aa affetto da cardiomiopatia amiloidotica in assenza di segni di neuropatia [Almeida Basic Res Cardiol 1991]. Il secondo, con analoghe caratteristiche cliniche, ad una famiglia Toscana (3 componenti – probando 74 aa eterozigote affetto; figlio 47 aa portatore omozigote senza manifestazione clinica; moglie 78 aa eterozigote non consanguinea senza manifestazione clinica) [Perfetto Journal of Cardiovascular Medicine 2011]. Queste specifiche forme vengono chiamate FAC ovvero cardiomiopatie amiloidotiche familiari.

Proprio in relazione alla vasta eterogeneità, anche fenotipica, il clinico può quindi trovarsi di fronte a casi con un esclusivo interessamento neurologico nell'ambito di una chiara familiarità e a casi in cui l'interessamento neurologico è assente o comunque assolutamente secondario, con un quadro clinico dominato da un importante coinvolgimento miocardico. Questo ampio spettro di presentazioni cliniche rende il riconoscimento di ATTR particolarmente difficile, soprattutto in ambito cardiologico, qualora il quadro sia caratterizzato da un interessamento cardiaco esclusivo o prevalente, in assenza di altri elementi caratteristici che possano indirizzare verso la corretta diagnosi poiché può simulare altre cardiomiopatie non amiloidotiche (in particolare la cardiomiopatia ipertrofica sarcomerica).

Una considerazione a parte merita la sindrome del tunnel carpale, patologia comune nella popolazione generale [Atroshi Jama 1999], caratterizzata dall'intrappolamento e conseguente disfunzione del nervo mediano da parte dei tendini del polso. La sindrome del tunnel carpale si associa frequentemente all'amiloidosi TTR e, per motivo non meglio specificato, in particolar modo alle FAC ed alle forme senili, precedendo la clinica cardiologica anche di 20 aa [Suhr J Intern Med 2003].

### **Outcome e prognosi**

La storia naturale dell'ATTR è solo parzialmente conosciuta a causa della rarità della malattia e della sua elevata eterogeneità genotipica. La maggior parte dei dati di outcome e prognosi relativi all'amiloidosi cardiaca deriva dai pazienti con forma AL [Falk 2010; Rosenzweig J Hematol Oncol 2011]. I pazienti con cardiomiopatia da ATTR hanno un decorso più lento di quelli con forma AL e la progressione della neuropatia e lo scompenso rappresentano le loro principali cause di morte [Herlenius Transplantation 2004]. Come nella forma AL anche nell'ATTR il coinvolgimento cardiaco rappresenta un fattore di rischio incrementale per tutti gli eventi e per quelli cardiovascolari. Di conseguenza, le mutazioni non-Val30Met in cui il coinvolgimento cardiaco è più frequente e severo, sono associate ad una prognosi particolarmente infausta, anche dopo un trapianto di fegato riuscito [Herlenius Transplantation 2004]. Molto poco si sa sulla causa sottostante e l'incidenza della morte improvvisa che è stato riportato essere associata con la comparsa di blocchi atrio-ventricolari avanzati, tachicardia ventricolare/fibrillazione ventricolare, o (probabilmente più frequentemente) dissociazione elettromeccanica [Falk 2010].

### **Terapia di supporto**

I diuretici sono essenziali per il trattamento della congestione venosa, ma il loro utilizzo deve essere accorto in quanto la riduzione del precarico nei pazienti con una fisiologia restrittiva può ridurre le pressioni di riempimento ventricolare e condurre ad una ridotta portata cardiaca e ad ipotensione [Falk 2010]. La digitale è controindicata perché, legandosi alle fibrille di amiloide, conduce all'incremento degli effetti tossici. Nella cardiomiopatia amiloidotica è importante mantenere il ritmo sinusale poiché l'insorgenza di fibrillazione striale può peggiorare la disfunzione diastolica ed una rapida risposta ventricolare può inoltre compromettere la portata cardiaca [Falk 2010]. La terapia anticoagulante è d'obbligo per i pazienti con fibrillazione atriale/flutter striale parossistici o permanenti e può anche essere indicata nei pazienti con

documentazione ecocardiografica di disfunzione striale (nonostante ritmo sinusale) [Falk 2010]. I beta-bloccanti devono essere utilizzati con cautela perché possono causare una riduzione critica della portata cardiaca senza apportare benefici in termini di rimodellamento ventricolare sinistro [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010; Falk 2010]. I calcio antagonisti sono controindicati poiché esercitano un rilevante effetto isotropo negativo [Falk 2010]. Gli ace-inibitori/sartani devono essere somministrati con estrema cautela dato l'elevato rischio di indurre/esacerbare ipotensione [Falk 2010]. Poiché la morte improvvisa sembra essere legata all'insorgenza di dissociazione elettromeccanica, l'utilità dei cardioverter defibrillatori a scopo preventivo rimane poco chiara e, sebbene certi centri utilizzino l'amiodarone nel tentativo di prevenire le aritmie e la morte improvvisa mancano studi di efficacia. Se la cardioversione è effettuata per trattare la fibrillazione atriale è indicato il posizionamento di un pace-maker temporaneo dato il rischio di fallimento di funzionamento di un anomalo nodo del seno. Quando i pazienti con cardiomiopatia amiloidotica presentano delle bradiaritmie i clinici devono sentirsi giustificati a procedere con l'impianto di un pace-maker prima di quanto farebbero con i pazienti senza questa patologia. In presenza di una fisiologia restrittiva devono essere preferiti pace-maker bicamerale [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010; Falk 2010].

### *Chirurgia dei trapianti*

Al momento, a parte la terapia di supporto, l'unico trattamento approvato per le ATTR è rappresentato dal trapianto di fegato. Si tratta di una terapia genica chirurgica introdotta nel 1990 [Holmgren Clin Genet 1991], talora effettuata con modalità domino (ovverosia un paziente che viene sottoposto a trapianto di fegato a sua volta dona il suo fegato ad un altro ricevente), che sospende nella quasi totalità la produzione di TTR mutata. Il trapianto di fegato è ormai diffusamente impiegato nelle FAP con buoni risultati - 1500 procedure effettuate tra il 1990 ed il 2009; sopravvivenza a 3 aa 100%; a 5 aa 77 %; mediana di

sopravvivenza attualmente superiore a 20 aa [Ando Arch Neurol 2005; Sharma Liver transplantation 2003; Herlenius Transplantation 2004; Violet 2011] ma purtroppo non è scevro da limitazioni quali la limitata quantità di donatori, il rischio di trasmettere l'amiloidosi al ricevente (quando usata la tecnica domino), il grado avanzato di malattia neurologica che rende il paziente candidato assolutamente non idoneo al trapianto. Inoltre si è visto che, mentre nelle forme con mutazione Val30Met (operate quando il grado di coinvolgimento neurologico/disfunzione autonoma non era avanzato ed il grado di coinvolgimento cardiaco era limitato/assente), si è verificata una sospensione (non regressione) di progressione della malattia, nelle forme con mutazione non Val30Met si è assistito ad una paradossalmente accelerata progressione della cardiomiopatia verosimilmente dovuta al persistente deposito di TTR wild-type per cui i dati di sopravvivenza (non esattamente noti) di questi pazienti sono significativamente peggiori rispetto a quelli dei pazienti con mutazione Val30Met [Violet 2011; Stangou transplantation 1998]. Inoltre si è visto che anche tra i pazienti con Val30Met, in particolar modo maschi, con età d'insorgenza della malattia superiore ai 50 aa la sopravvivenza dei pazienti trapiantati non era differente da quella dei non trapiantati (controllo) questo per un maggior coinvolgimento cardiaco che in sintesi, se presente, rappresenta sempre un importante fattore prognostico negativo [Violet 2011]. Dopo un trapianto isolato di fegato, le complicanze cardiovascolari sono responsabili del 4% delle morti, la metà delle quali avviene entro i primi 3 mesi. Per tale motivo prima di procedere ad un trapianto isolato di fegato, che peraltro, per consentire un reale miglioramento clinico deve essere fatto precocemente (entro 5 aa dall'insorgenza dei primi sintomi) [Jonsen Amyloid 2001], è fondamentale una valutazione del grado di coinvolgimento cardiaco (anche solo a livello strumentale) per eventuale shift a trapianto combinato cuore/fegato [Falk 2011;

Sharma 2003; Arpesella 2003]. In sintesi: il trapianto di fegato deve essere considerato precocemente nei pazienti con FAP sintomatica; la presenza di una severa polineuropatia, di una severa disfunzione autonoma e di uno scarso stato nutrizionale rappresentano una controindicazione al trapianto; il coinvolgimento significativo di altri organi (cuore in primis) deve indurre a considerare un trapianto combinato; il trapianto non è un'opzione terapeutica per i pazienti portatori asintomatici della mutazione in quanto la sua penetranza è incompleta [Violet 2011].

### **Strategie terapeutiche alternative**

Tutte queste problematiche relative al trapianto (semplice o combinato) hanno fatto emergere la necessità di soluzioni terapeutiche alternative e non invasive. Si è quindi pensato che, poiché la causa fondamentale alla base dell'amiloidosi è rappresentata dall'instabilità dei mono-oligomeri di TTR, la soluzione al problema potesse risiedere nella stabilizzazione del tetramero e quindi nella prevenzione della formazione delle fibrille di amiloide [Sekijima Current Pharmaceutical Design 2008]. A questo scopo sono in corso trial clinici mirati a valutare l'efficacia di due farmaci – Diflunisal e Tafamidis meglumine (stabilizzatori del tetramero) - nella progressione della neuropatia. In uno studio pilota di fase 2/3, policentrico, randomizzato ed in doppio cieco condotto su 128 pazienti affetti da malattia con alla base mutazione Val30Met nei 18 mesi di osservazione nel 60% dei pazienti trattati con tafamidis si è avuta una sospensione di progressione della neuropatia, una stabilizzazione della qualità della vita e del valore di BMI modificato contro il 38% dei pazienti in placebo [Violet 2011; Coelho Neurology 2010]. Attualmente l'EMA ha dato parere positivo all'approvazione del Tafamidis per il trattamento della polineuropatia sintomatica nei pazienti adulti con ATTR. Devono partire studi per i pazienti anche con cardiomiopatia ATTR e con forma senile.

La terapia genica è una promettente strategia futura per questa malattia ma al momento non è disponibile per i pazienti e non ci sono dati clinici. Comunque gli studi sono al momento prettamente concentrati sul tentativo di inibire l'espressione del gene della transtiretina distruggendo il suo RNA messaggero attraverso oligonucleotidi antisenso, ribosomi clivanti o sRNA [Violet 2011].

### **Amiloidosi sistemica senile**

La transtiretina non mutata (wild type) è la proteina precursore dell'amiloidosi sistemica senile (SSA). La SSA è una patologia che interessa quasi esclusivamente uomini di età > 65 aa e, come si deduce dalla nomenclatura, determina un coinvolgimento sistemico (polmoni, tratto gastroenterico, fegato, milza, ghiandole endocrine) anche se, dal punto di vista clinico, le uniche due manifestazioni degne di rilievo sono la cardiomiopatia ed il tunnel carpale che in genere si presenta 3-5 aa prima [Falk 2010; Dubrey Heart 2011]. Studi autoptici dimostrano che il 22-36% degli individui > 80 aa presenta depositi di amiloide nei tessuti cardiaci ma in genere non di entità tale da condizionarne la funzione [Cornwell Am J Med 1983]. Nei pazienti anziani la transtiretina pur costitutivamente normale può diventare strutturalmente instabile e costituire degli aggregati mal ripiegati che si aggregano e precipitano sottoforma di amiloide [Belinda Arch Intern Med 2005]. La diagnosi di SSA è una diagnosi di esclusione basata sulla presenza di amiloide in tessuto biotico in associazione a segni ecocardiografici di cardiomiopatia infiltrativa (assolutamente analoghi tra le varie forme ad eccezione di spessori in questo caso ulteriormente aumentati) dopo l'esclusione di una discrasia plasmacellulare e di mutazione del gene per la transtiretina/altre proteine amiloidogeniche. Inoltre, poiché questi pazienti sono spesso piuttosto anziani ed in loro la biopsia endomiocardica può risultare particolarmente mal tollerata, sono in corso studi per identificare approcci biotici alternativi. In particolare si sta valutando il prelievo di grasso addominale anche se, la presenza scarsa di amiloide ed una sua localizzazione in piccole zone negli strati più profondi del grasso sottocutaneo, rendono questa

metodica decisamente meno sensibile rispetto a quanto accade per altre forme di amiloidosi [Ikeda Amyloid 2011]. La sopravvivenza media dei pazienti affetti da SSA è circa 60 mesi, 10 volte superiore a quella dei pazienti con forma AL, nonostante spessori parietali > all'ecocardiogramma ed una età alla presentazione più avanzata (il motivo di ciò probabilmente risiede nella tossicità intrinseca delle catene leggere circolanti) [Belinda Arch Intern Med 2005; Kyle Am J Med 1996]. Il trattamento della cardiomiopatia è quasi esclusivamente sintomatico visto che generalmente l'età avanzata controindica il trapianto [Falk 2010]. In letteratura comunque sono segnalati 2 casi di pazienti con SSA a presentazione più precoce (< 60 aa) sottoposti a trapianto di cuore isolato in assenza di recidiva di malattia al follow up (fino a 10 aa) [Dubrey J Heart Lung Transplant 2004].

# **CONTRIBUTO SPERIMENTALE**

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Sebbene gli aspetti clinici e la storia naturale della mutazione Val30Met, ormai nota dagli anni '60, sono stati, come sopra descritto, ampiamente studiati, il profilo delle FAC (forme con esclusivo o predominante coinvolgimento cardiaco) ed in generale delle forme nonVal30Met, di più recente acquisizione, è meno noto e la sua conoscenza deriva dall'analisi di singole mutazioni in diversi contesti geografici talora riconducibili a famiglie o piccoli gruppi isolati.

Lo scopo dello studio quindi è:

- 1) Valutare in una popolazione riferita ad un solo centro (Bologna) lo spettro delle mutazioni, il quadro clinico e strumentale alla presentazione, il follow up ed i fattori di rischio.
- 2) All'interno di un registro internazionale costituito ad hoc valutare la distribuzione geografica, lo spettro delle mutazioni, le caratteristiche clinico-demografiche, la penetranza delle singole mutazioni.

## **PAZIENTI E METODI**

### ***I parte: casistica di Bologna***

#### **“Setting clinico” e disegno dello studio**

Abbiamo condotto un’analisi multicentrica e trasversale, al momento della diagnosi, dei pazienti con ATTR. Il setting è quello dei tre principali centri di riferimento italiani per la diagnosi ed il trattamento dell’amiloidosi ereditaria (Bologna, Pavia e Firenze) in cui sono stati istituiti network di lavoro specifici costituiti da neurologi, cardiologi, ematologi, nefrologi e genetisti ed in cui è attivo un programma di trapianto cuore/fegato.

Tutti i dati genetici, clinici e strumentali dei pazienti alla presentazione ed al follow-up sono stati sistematicamente raccolti e conservati in data base dedicati.

Tutti i partecipanti allo studio hanno sottoscritto il consenso informato per l’analisi del DNA, qualunque procedura invasiva e la pubblicazione di dati nell’anonimato. Trattandosi di uno studio osservazionale, in cui le procedure eseguite sono di routine nella pratica clinica, non è stato necessario richiedere l’approvazione da parte del Comitato Etico.

Tutti i pazienti con diagnosi definitiva di ATTR afferiti ai nostri centri dal 1990 al dicembre 2010 sono risultati eleggibili per il presente studio inclusi i portatori di mutazioni TTR identificati nell’ambito di screening familiare (offerto a tutti i parenti di I grado con desiderio di conoscere il loro stato) con evidenza clinico-strumentale di malattia (esclusi i portatori sani delle mutazioni).

Per la classificazione fenotipica abbiamo distinto i pazienti in tre gruppi in relazione alle caratteristiche della malattia alla prima valutazione:

- 1) Pazienti con esclusivo interessamento cardiaco definito mediante criteri ecocardiografici ed elettrocardiografici in assenza di alcun segno/sintomo di

coinvolgimento neurologico (ad eccezione del rilievo di disfunzione erettile in pazienti maschi di età superiore a 50 anni, o di pregresso intervento di decompressione del nervo mediano per sindrome del tunnel carpale - comune reperto nella popolazione generale [Atroshi JAMA 1999]) (FENOTIPO CARDIO)

- 2) Pazienti con esclusivo interessamento neurologico con evidenza clinico/strumentale di neuropatia in assenza di segni elettrocardiografici, ecocardiografici e clinici di cardiomiopatia amiloidotica (FENOTIPO NEURO)
- 3) Pazienti con interessamento misto cardiaco/neurologico accertato con i medesimi criteri clinici e strumentali (FENOTIPO MISTO)

Abbiamo confrontato le caratteristiche cliniche e strumentali (ECG ed ecocardiogramma) al baseline (prima valutazione) dei pazienti con fenotipo cardiaco con quelli con fenotipo misto.

Il profilo baseline dei pazienti con fenotipo cardiaco è stato anche confrontato con quello dei pazienti affetti da SSA diagnostica nello stesso periodo e con quello di 30 pazienti matched per età e sesso affetti da cardiomiopatia ipertrofica sarcomerica geneticamente documentata.

### ***Analisi longitudinale (casistica di Bologna)***

Per i pazienti con fenotipo cardio al momento della prima valutazione abbiamo valutato la storia naturale della malattia in termini di: mortalità (per tutte le cause), sviluppo di segni clinico/strumentali di coinvolgimento neurologico; evoluzione clinica della cardiomiopatia (classe NYHA III-IV); comparsa di blocco atrio-ventricolare avanzato sintomatico tale da richiedere l'impianto di pace-maker (endpoint).

Analoghe valutazioni sono state effettuate per i pazienti affetti da fenotipo misto e neuro.

Sono state inoltre costruite curve di sopravvivenza per la popolazione generale sia con che senza censorizzazione al trapianto (fegato isolato o combinato) visto che la malattia può progredire nonostante l'interruzione di produzione della proteina mutata da parte del fegato. Sono state inoltre costruite curve di sopravvivenza sia per specifiche mutazioni: Val30Met vs nonVal30Met; Val30Met vs Ile68Leu vs Glu89Gln vs Altro; sia per specifici fenotipi: cardio vs SSA.

Poiché in questa specifica malattia il trapianto di fegato isolato ha uno scopo profilattico non è stato considerato tra gli endpoint ma comunque ne abbiamo valutato i risultati a distanza in termini di sopravvivenza sia per tutti i pazienti che in relazione alla mutazione Val30Met vs nonVal30Met. Infine abbiamo valutato la sopravvivenza di tutti i pazienti sottoposti a trapianto combinato.

Il follow up di questi pazienti è stato terminato nel settembre 2011.

## **Definizioni diagnostiche e patient assessment**

- La diagnosi di amiloidosi è stata posta sulla base della dimostrazione istologica, in almeno un organo coinvolto, della caratteristica birifrangenza “apple green” al microscopio a luce polarizzata, dopo fissazione del prelievo con il colorante rosso Congo [Falk 2010].
- La diagnosi eziologica di ATTR è stata posta in presenza di indagine immunoistochimica sul campione bioptico positiva per TTR, unitamente alla presenza di documentata mutazione puntiforme per il gene della transtiretina [Ferlini FASEB J 1992].
- La diagnosi eziologica di SSA è stata posta in presenza di indagine immunoistochimica sul campione bioptico positiva per TTR, in assenza di

mutazioni puntiformi per il gene della transtiretina all'analisi del DNA [Falk 2010].

- L'interessamento cardiaco è stato definito da spessori del setto interventricolare in telediastole > di 12 mm, in assenza di altre cause plausibili di ipertrofia ventricolare + almeno due dei seguenti rilievi tra ispessimento omogeneo dei foglietti di una valvola atrio-ventricolare, ispessimento del setto interatriale, aspetto a tipo "granular sparkling" del setto interventricolare all'ecocardiogramma; e/o la presenza all'elettrocardiogramma di blocchi atrio-ventricolari avanzati (superiori al I grado) o di disturbi della conduzione intraventricolare (blocchi di branca/emiblocchi) [Gertz Am J Hematol 2005].
- La diagnosi di coinvolgimento del sistema nervoso autonomo si è basata sulla presenza delle seguenti manifestazioni: impotenza (prima dei 50 aa di età), ipotensione ortostatica sintomatica, diarrea e stipsi, incontinenza urinaria e alterazioni della sudorazione [Benson Muscle and Nerve 2007].
- La diagnosi di coinvolgimento del sistema nervoso periferico si è basata su caratteristici segni e sintomi neurologici ed è stata stadiata da 0 a 3 a seconda dell'entità: 0 = nessun coinvolgimento; 1 = coinvolgimento limitato agli arti inferiori senza impedimento alla deambulazione autonoma ma con significativo disturbo della percezione termica/dolorifica; 2 = atrofia dei muscoli distali degli arti inferiori con deperimento/debolezza dei muscoli della mano ed estensione del disturbo della percezione termica e dolorifica agli arti superiori; 3 = debolezza muscolare generalizzata con atrofia ed areflessia diffuse, paziente costretto a letto o in poltrona, dolore e turbe della percezione termica estese a capo e collo [Rapezzi Amyloid 2006].

## **Metodiche strumentali**

### BIOPSIA ENDOMIocardica ED ANALISI ISTOLOGICA

Nei pazienti in cui l'analisi istologica è avvenuta tramite biopsia endomiocardica, tutti i campioni istologici (5 campioni/paziente), allestiti in soluzione al 10% di formalina, sono stati trattati con irradiazione per 5 minuti, processati in forno a microonde e fissati con paraffina. Sono state esaminate multiple sezioni previa colorazione con ematossilina-eosina, tricromica di Mallory e rosso Congo, al fine di identificare la presenza di amiloide mediante il riscontro di birifrangenza "apple green" al microscopio a luce polarizzata.

### ELETTROCARDIOGRAMMA ED ECOCARDIOGRAMMA

Per tutte le diagnosi e le misure elettrocardiografiche si è fatto riferimento alle definizioni standard [Surawicz Chou] e l'ECG è stato definito patologico in presenza di uno o più dei seguenti elementi: disturbi di conduzione (blocchi atrio-ventricolari, blocco di branca destra, blocco di branca sinistra, emiblocco anteriore o posteriore), bassi voltaggi del QRS (ampiezza del QRS  $\leq 0.5$  mV nelle derivazioni periferiche o  $\leq 1$  mV nelle derivazioni precordiali), alterazioni del tratto ST e dell'onda T ed aspetto a pseudo necrosi.

Le valutazioni e misure ecocardiografiche sono avvenute in accordo con le raccomandazioni della Società Americana di Ecocardiografia [Linee Guida eco ACC 2003]. Una diagnosi di ipertrofia concentrica è stata fatta quando il rapporto tra lo spessore del setto interventricolare e la parete posteriore in telediastole era  $< 1.3$ . Il pattern di riempimento del ventricolo sinistro è stato valutato con il Doppler pulsato, posizionando il volume campione all'apice dei lembi valvolari mitralici ed è stato considerato restrittivo se soddisfatti i seguenti criteri: 1) deceleration time  $< 150$  msec; 2) onda E/onda A  $> 2.5$  [Garcia JACC 1998]. La massa ventricolare calcolata secondo Devereux et al. [Devereux Am J

Cardiol 1986] è stata considerata aumentata quando  $> 130 \text{ g/m}^2$  nei maschi e  $> 110 \text{ g/m}^2$  nelle femmine.

## ANALISI GENETICA

Il DNA genomico è stato isolato dal sangue periferico con tecniche standard. Per la ricerca di mutazioni del gene della transtiretina, gli esoni 2,3 e 4 del gene presente sul cromosoma 18 (m11844) sono stati amplificati con tecnica PCR (Takara ExTaq Polymerase, TaKaRa Shuzo, Otsu, Japan) utilizzando primer precedentemente descritti in letteratura. I frammenti di DNA amplificati sono stati direttamente sequenziati usando il sequenziatore automatico ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Foster City, California) [Ferlini FASEB J 1992; Saraiva Am J Hum Genet 1991].

## APLOTIPO

Al fine di identificare aplotipi fondatori comuni, in casi selezionati è stata effettuata un'analisi degli aplotipi del gene TTR. Ogni aplotipo è costituito da un set di 7 SNPs collocati negli introni del gene TTR che caratteristicamente segregano con lui. Gli SNPs sono stati scelti sulla base della frequenza allelica (minore) e del pattern di linkage disequilibrium. Sono stati costituiti specifici oligonucleotidi per amplificare le regioni contenenti gli SNPs dal campione di DNA. Gli SNPs erano identificati con sequenziamenti standard (ABI Prism 3130). Gli aplotipi erano assegnati ai pazienti e quelli condivisi erano identificati.

## **ANALISI STATISTICA**

Le variabili continue sono state espresse come mediana [range interquartile]. Le variabili categoriche sono state espresse come numeri (percentuali). Mediante l'uso di tabelle di contingenza, l'indipendenza delle variabili categoriche è stata testata con il test esatto di Fisher o con il test del chi-quadrato di Pearson (il primo quando la frequenza attesa in almeno una cella delle tabelle 2 X 2 fosse < 5). Abbiamo utilizzato il t-test o l'analisi della varianza ad una via per il confronto tra gruppi in caso di variabili continue distribuite normalmente (applicando il test di Bonferroni per i confronti multipli) ed il test di Mann-Whitney U test/Kruskal-Wallis in caso di variabili distribuite non normalmente. La sopravvivenza è stata rappresentata con curve di Kaplan-Meier. I pazienti sono stati censorizzati al momento del trapianto di fegato o combinato fegato-cuore. Per analizzare le possibili associazioni con la sopravvivenza è stata inizialmente effettuata l'analisi di regressione di Cox includendo variabili cliniche, ecocardiografiche ed elettrocardiografiche. E' stata quindi effettuata un'analisi multivariata includendo nel modello le variabili risultate significative all'analisi univariata ( $p < 0.05$ ) che non fossero correlate tra loro. Le analisi sono state effettuate con il programma STATA 11.2 SE (Stata corporation, Texas, TX). Sono stati considerati significativi valori di  $P < 0,05$ .

## **PERCORSI DIAGNOSTICI**

I pazienti sono giunti alla nostra attenzione a seguito della comparsa di segni e/o sintomi neurologici caratteristici della polineuropatia amiloidotica familiare o di sintomi cardiologici, oppure per screening familiare in quanto parenti di I grado di un soggetto affetto.

# **RISULTATI**

## ***I parte: casistica di Bologna***

### **Caratteristiche della popolazione studiata**

Tra il 1990 ed il 2010, nei nostri centri, sono stati identificati ed inclusi nello studio 186 pazienti con ATTR. Tutti i pazienti erano Caucasici ed appartenevano ad 89 famiglie diverse provenienti dal nord, dal centro e dal sud Italia (grafico 1). Tutti erano di origine italiana ad eccezione di un paziente (affetto da mutazione Pha33Val) proveniente dalla Repubblica Macedone.

La tabella 2 mostra la lista completa delle mutazioni TTR presenti nella popolazione studiata (famiglie e pazienti). Sono state identificate 26 diverse mutazioni di cui la Val30Met era la più frequente seguita da Glu89Gln e da Ile68Leu. Tutti i pazienti erano eterozigoti per le mutazioni identificate. Nessun'altra mutazione è stata identificata negli esoni 2,3 o 4.

La tabella 3 mostra il diverso percorso diagnostico dei pazienti: 89 (48%) sono giunti alla nostra attenzione a seguito della comparsa di segni e/o sintomi neurologici caratteristici della polineuropatia amiloidotica familiare; 38 (20%) per sintomi cardiologici (di cui 53% per scompenso cardiaco); 59 (32%) per screening familiare in quanto parenti di I grado di un soggetto affetto.

### **Profilo della malattia alla diagnosi e genotipo**

Al momento della diagnosi, 109 (58%) pazienti mostravano un fenotipo misto, 46 (25%) un fenotipo neuro e 31 (17%) un fenotipo cardio (grafico 2). Tutti i pazienti con fenotipo cardio mostravano sia anomalie elettro che ecocardiografiche mentre tra i pazienti con fenotipo misto 8 mostravano solo anomalie elettrocardiografiche (n = 1 blocco di branca sinistra; n = 2 blocco di branca destra; n = 5 emiblocco anteriore sinistro) in assenza di alcun segno ecocardiografico di infiltrazione amiloidotica. 5 di questi 8 pazienti erano portatori della mutazione Val30Met. La biopsia endomiocardica è stata

effettuata in 66 pazienti con coinvolgimento cardiaco confermando in tutti i casi la presenza di amiloide. Diverse le ragioni per cui i restanti 74 pazienti non sono stati sottoposti a biopsia endomiocardica tra cui: età avanzata e significativo grado di compromissione generale; dati strumentali già ampiamente indicativi associati a familiarità positiva per amiloidosi e presenza di mutazione all'analisi del DNA; identificazione di infiltrazione di amiloide in altri tessuti: adiposo, tratto gastrointestinale, nervo surale.

Le principali caratteristiche cliniche, alla prima osservazione, della popolazione in studio sono riassunte nella tabella 3 facendo riferimento alla classificazione fenotipica sopra riportata.

Ogni fenotipo era associato a diverse mutazioni TTR: 8 differenti mutazioni determinavano il fenotipo cardio (la più frequente era Ile68Leu) ; 11 differenti mutazioni determinavano il fenotipo neuro (la più frequente era Val30Met); 21 differenti mutazioni erano associate al fenotipo misto (la più frequente era Glu89Gln). D'altra parte diverse mutazioni TTR erano associate a più di un fenotipo: la mutazione Val30Met sia con quello neuro che con quello misto, la mutazione Ile68Leu prevalentemente con il fenotipo cardio ma anche in 1 caso di fenotipo misto ed in 3 casi (peraltro giovani donne) di fenotipo neuro; la mutazione Glu89Gln era prevalentemente associata al fenotipo misto ma è stata anche trovata in 8 casi con fenotipo neuro ed 1 con fenotipo cardio (grafico 3).

Dei 31 pazienti con fenotipo cardio 15 (48%) avevano precedentemente ricevuto una diagnosi errata (cardiomiopatia ipertrofica n = 7; cardiomiopatia dilatativa n = 2; cardiopatia ipertensiva n = 3; cardiopatia ischemica cronica n = 2; amiloidosi AL n = 1). In tutti questi casi il sospetto di una cardiomiopatia amiloidotica è emerso dalla lettura combinata clinica, elettrocardiografica ed ecocardiografica in cui la presenza di una ipertrofia ventricolare sinistra (non spiegata) non si associava a segni di ipertrofia ventricolare sinistra all'ECG.

### **Condivisione dell'aplotipo**

20 soggetti con la mutazione Ile68Leu provenienti da famiglie non imparentate tra loro sono stati analizzati per identificare un possibile fondatore comune. Tutti i soggetti analizzati erano omozigoti per gli alleli più frequenti degli SNPs: rs9304103 (introne 1), rs7231173 (introne 1) ed rs1804118 (esone 4). 5 pazienti erano eterozigoti A/G per il polimorfismo rs1080094 (introne 2) ed i rimanenti 7 pazienti erano omozigoti G/G per lo stesso SNP. Per i 3 polimorfismi nell'introne 3 come rs3764476, rs7235277 ed rs3794884, 6 pazienti analizzati erano eterozigoti, rispettivamente G/T, C/G e A/C per i suddetti SNPs, mentre i restanti 6 soggetti erano tutti omozigoti T/T, C/C and C/C. I 4 SNPs informativi dimostrano che tutti i pazienti condividevano un aplotipo comune che suggerisce un comune predecessore supportando l'ipotesi che la mutazione TTR sia originata nello stesso allele fondatore in tutti i pazienti studiati non imparentati tra loro. Tutti e 20 i pazienti venivano da una larga area del centro-nord Italia (circa 20.000 Km<sup>2</sup>) (grafico 4)

### **Caratteristiche strumentali**

La tabella 4 riassume le principali caratteristiche elettrocardiografiche (4a) ed ecocardiografiche (4b) dei due fenotipi con coinvolgimento cardiaco.

**ECG** (tabella 4a): Nessuno dei pazienti con fenotipo cardio e circa il 10% dei pazienti con fenotipo misto aveva un ECG normale. Le differenze più significative tra i due gruppi di pazienti ATTR sono relativi a: frequenza di fibrillazione atriale, presenza di pace-maker e di pattern ischemico. La prevalenza di bassi voltaggi del QRS era bassa sia nel fenotipo cardio (35%) sia in quello misto (23%).

**Ecocardiogramma** (tabella 4b): sono state identificate differenze significative per i seguenti aspetti morfo-funzionali del ventricolo sinistro: spessori parietali (sia setto interventricolare che parete posteriore), massa indicizzata tra i maschi,

diametri telediastolici e telesistolici e frazione d'eiezione. Anche i diametri dell'atrio sinistro, il versamento pericardico e l'ispessimento delle valvole atrio-ventricolari sono risultati significativamente maggiori nel gruppo cardio.

### **Follow up generale**

Durante un follow up mediano di 36 mesi [14-50], 41 pazienti sono stati sottoposti a trapianto d'organo di cui 13 a trapianto combinato cuore fegato (4 del gruppo cardio di cui 1 ha subito un concomitante trapianto renale per una coesistente insufficienza renale cronica non secondaria all'amiloidosi - pregressa glomerulonefrite acuta; 9 del gruppo misto), 1 solo cuore ed i restanti 27 a trapianto isolato di fegato (23 del gruppo misto; 4 del gruppo neuro).

66 pazienti sono morti (9 del gruppo cardio, 36 del gruppo misto e 21 del gruppo neuro). La causa di morte principale per i primi 2 gruppi era rappresentata dallo scompenso cardiaco refrattario alle cure mentre per il gruppo neuro dalla progressione della neuropatia soprattutto disautonomica con conseguente cachessia.

5 (16%) dei 31 pazienti con esclusivo coinvolgimento cardio hanno sviluppato anomalie all'esame neurologico durante il periodo di follow up, suggerendo la comparsa di lieve neuropatia sensitiva (alterata percezione termo/dolorifica agli arti superiori o inferiori in assenza di alcun coinvolgimento motorio). Questi segni erano evidenti esclusivamente alla valutazione neurologica e mai associati a sintomi spontaneamente riportati.

I grafici (5a e 5b) rappresentano le curve di sopravvivenza della nostra intera popolazione rispettivamente con dati non censorizzati e censorizzati al trapianto (isolato o combinato). La frequenza di mortalità annuale (per 100 pazienti-anno) si attesta rispettivamente intorno a 11 e 12%.

I grafici (6a e 6b) rappresentano le curve di sopravvivenza della nostra intera popolazione rispettivamente con dati non censorizzati e censorizzati al trapianto (isolato o combinato) in relazione alla mutazione Val30Met vs NonVal30Met. Nel gruppo non censorizzato la frequenza di mortalità annuale (per 100 pazienti-anno) si attesta rispettivamente intorno a 8% e 13% ( $p = 0.02$ ) mentre nel gruppo censorizzato la frequenza di mortalità annuale (per 100 pazienti-anno) si attesta rispettivamente intorno a 9% e 14% ( $p = 0.038$ ).

Il grafico 7 rappresenta le di sopravvivenza della nostra intera popolazione in relazione alle 4 mutazioni più frequentemente rappresentate Val30Met vs Glu89Gln vs Ile68Leu vs Altro. La  $p$  tende ma non raggiunge i criteri di significatività.

### **Follow up dei pazienti sottoposti a trapianto**

Tra il 1993 ed il 2011 41 pazienti sono stati sottoposti a trapianto (27 di solo fegato; 1 di solo cuore; 13 combinati). 14 pazienti (34%) erano portatori della mutazione Val30Met, 11 della mutazione Glu89Gln (27%), 2 della mutazione Ile68Leu (5%), 14 altro. Il follow up mediano di questi pazienti è 31.1 mesi []. I morti sono risultati 17 (41.4 %: 14 ovverosia 52% nel gruppo OLT e 3 ovverosia 21% nel gruppo combinato) di cui 3 per complicanze OLT ed 1 per complicanza di OLT-HT, 2 per progressione della neuropatia, 2 per scompenso cardiaco, 3 per sepsi, 4 per altro. Solo 2 i decessi relativi ai pazienti sottoposti a trapianto combinato (tabella 5).

Nel grafico 8 (a e b) sono rappresentate le curve di sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato isolato. Il grafico a rappresenta tutti i pazienti (27) e mostra una mortalità annua del 7% (per 100 pz-anno). Il grafico b suddivide la popolazione in Val30Met vs NonVal30Met e mostra una mortalità del 5% vs il 12% (per 100 pz-anno) con una  $P$  che tende ma non raggiunge la significatività (0.09).

Nel grafico 9 è rappresentata la curva di sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto combinato cuore-fegato (14). La mortalità risulta del 4% (per 100 pz-anno).

### **ATTR vs amiloidosi sistemica senile e cardiomiopatia ipertrofica**

Durante il periodo di studio (1990-2010), 30 pazienti hanno ricevuto la diagnosi di amiloidosi sistemica senile (SSA). Nello studio, per confronto, sono stati inclusi 30 pazienti (matched per età e sesso) con cardiomiopatia ipertrofica (CMPI) sarcomerica geneticamente documentata. Le mutazioni sarcomeriche includevano: MYBPC in 19 pazienti, TNNT2 in 6 pazienti e MYH7 in 4; una mutazione doppia coinvolgente MYH7 e TNNT2 era presente in un caso isolato. La tabella 6 riporta le principali caratteristiche cliniche, elettrocardiografiche (tabella 6a) ed ecocardiografiche (tabella 6b) dei 31 pazienti con fenotipo cardio e dei pazienti con SSA e CMPI.

Mentre i pazienti con SSA erano più vecchi (77 vs 67 aa), il profilo ECG ed ecocardiografico di questi pazienti era piuttosto simile a quello dei pazienti con ATTR a fenotipo cardio. Gli ECG dei pazienti con CMPI erano caratterizzati da valori medi di score totale del QRS più alti e più bassi valori medi di QTc. La prevalenza di bassi voltaggi del QRS, fibrillazione atriale e blocco di branca sinistra era minore nelle CMPI, mentre erano più frequenti un “pattern ischemico” ed ipertrofia ventricolare sinistra (tabella 6a). Dal punto di vista ecocardiografico, nonostante valori simili di spessore del setto interventricolare, i pazienti con ATTR a fenotipo cardio e gli SSA presentavano maggiori spessori della parete posteriore del ventricolo sinistro. Inoltre, versamento pericardico ed ispessimento delle valvole atrioventricolari erano praticamente assenti nelle CMPI. La frazione d’ eiezione era normale nelle CMPI, mentre risultava ai limiti inferiori di norma o lievemente ridotta nella maggior parte dei pazienti con ATTR a fenotipo cardio e negli SSA (tabella 6b). Un pattern di riempimento transmitralico di tipo restrittivo era eccezionale nelle CMPI mentre era presente in circa 1/3 degli altri pazienti (tabella 6b).

## DISCUSSIONE

Il nostro studio dimostra che, in una popolazione Caucasica di pazienti originanti da un'area geografica non endemica per ATTR come la nostra, più del 15% dei casi alla prima valutazione ha un fenotipo esclusivamente cardiaco. Sebbene una singola mutazione (con un documentato fondatore comune) era responsabile per più del 70% dei casi, i restanti mostravano un'elevata eterogeneità genotipica. Inoltre, sebbene l'ATTR con fenotipo cardiaco sia frequentemente erroneamente diagnosticata come CMPI sarcomerica, il profilo della malattia è piuttosto specifico e può consentire una diagnosi differenziale clinica e strumentale non invasiva.

La popolazione dello studio deriva da tre centri di riferimento che raccolgono una percentuale rilevante dei pazienti italiani con ATTR. I pazienti sono giunti all'osservazione attraverso un'ampia gamma di percorsi diagnostici (neurologico, cardiologico, nefrologico, ematologico ecc.). La prevalenza tendenzialmente bassa della mutazione Val30Met (meno di 1 ogni 4 famiglie) e l'ampia varietà di altre mutazioni (n=25) trovate nella nostra coorte di osservazione riflettono bene uno scenario geografico non endemico con un pool di geni che, per ragioni storiche, risulta piuttosto eterogeneo.

Come atteso, le caratteristiche dei nostri pazienti sono piuttosto differenti da quelle dei pazienti con mutazione Val30Met appartenenti a regioni endemiche come il nord di Svezia e Portogallo, il Brasile e le 2 regioni Giapponesi in cui, come sopra ampiamente descritto, il fenotipo neurologico è predominante, il coinvolgimento cardiaco è principalmente limitato al sistema di conduzione e l'insorgenza della patologia si verifica intorno alla terza-quarta decade di vita [Bittencourt Eur J Neurol 2005; Ikeda Neurology 2002; Suhr J Intern Med 2003; Conceicao Muscle Nerve 2007; Ando Arch Neurol 2005; Drugges J Med Gent 1993].

Nella nostra popolazione, come nel caso di altri pazienti con ATTR provenienti da aree geografiche Europee ed Americane non endemiche [Conceicao Muscle Nerve 2007; Jacobson NEJM 1997; Yamamoto Muscle Nerve 1994; Violet

Neurology 1998; Mak Amyloid 2007] l'insorgenza della malattia tendeva ad essere relativamente tardiva (di solito durante la sesta decade di vita) ed i pazienti erano prevalentemente maschi.

### **Eterogeneità fenotipica e correlazione genotipo-fenotipo**

La valutazione sistematica dei pazienti con fenotipo cardiaco/neurologico in questa ampia serie di pazienti ATTR evidenzia la complessità della relazione tra le due principali manifestazioni cliniche di questa malattia sistemica. Sebbene la maggior parte (80%) dei pazienti affetti presentava un coinvolgimento neurologico e circa 1/3 dei pazienti mostrava esclusivamente un coinvolgimento neurologico alla diagnosi, le manifestazioni cardiache erano piuttosto comuni.

Ben i 2/3 dei pazienti presentavano qualche segno clinico o strumentale di coinvolgimento cardiaco ed una minoranza, comunque rilevante (circa il 15%) aveva un fenotipo esclusivamente cardiaco. Per la classificazione fenotipica non abbiamo considerato la sindrome del tunnel carpale come segno specifico di coinvolgimento neurologico trattandosi di un reperto comune nella popolazione generale [Atroshi JAMA 1999]. 45% dei pazienti con fenotipo cardio e 41% di quelli con fenotipo misto aveva una storia clinica di sindrome del tunnel carpale. Questa elevata prevalenza in entrambi i fenotipi con coinvolgimento cardiaco conferma precedenti report [Connors Am Heart J 2009] e, sebbene una spiegazione convincente per questa associazione non sia ancora stata trovata, questo reperto può aiutare sia come suggerimento nella diagnosi differenziale di un paziente con ipertrofia ventricolare sinistra non spiegata, sia come incitamento al follow up cardiaco in pazienti con ATTR documentata e solo coinvolgimento neurologico. Ben lontano dalla significatività ma decisamente più rappresentato nel fenotipo misto e più precisamente nei pazienti con mutazione Thr49Ala è il coinvolgimento del vitreo. Tale dato conferma quello già precedentemente riportato in uno dei pochi report italiani presenti in letteratura relativo ad una famiglia siciliana [Almeida Hum Mutation 1992]. E' interessante notare come i pazienti con fenotipo cardio alla presentazione siano rimasti liberi da manifestazioni neurologiche durante il follow up mediano di

circa 3 aa e che mentre il 20% di questi pazienti ha sviluppato lievi anomalie all'esame neurologico, suggerendo una lieve neuropatia sensitiva, tutti i pazienti erano ancora completamente liberi da sintomi neurologici all'ultima valutazione. Sebbene una singola mutazione della TTR (Ile68Leu) era associata con la maggior parte di fenotipi cardio (circa 75%), altre 7 mutazioni erano associate a questa presentazione nella nostra popolazione di pazienti Italiani. Questa eterogeneità genotipica tra i nostri pazienti Caucasicci con fenotipo cardio è peculiare quando confrontata con la stretta relazione esistente tra un'unica mutazione TTR ed il fenotipo cardio degli Afro-Americani (Val122Ile) [Jacobson Hum Genet 1996], dei pazienti provenienti dalle regioni degli Appalachi e dalla contea di Donegal dell'Irlanda (Thr60Ala) [Benson arthritis reumatism 1987; Sattianayagam 2011] e dai pazienti provenienti dalla Danimarca (Leu111Met) [Ranlov Am J Med 1992]. I nostri risultati rinforzano il concetto di uno spettro di correlazioni genotipo-fenotipo che spaziano da mutazioni prettamente neurologiche (Val30Met) a forme puramente cardiologiche (Ile68Leu e Val122Ile) attraverso mutazioni associate con fenotipi misti e variabili (Glu89Gln) (grafico 10). Sebbene il singolo grado di correlazione genotipo-fenotipo sia elevato, la mutazione di un singolo gene non conduce necessariamente all'espressione di un fenotipo singolo (grafico 3). Infatti noi abbiamo trovato una rilevante variabilità intra-mutazione ed intra-famiglia, in particolare per le mutazioni Ile68Leu e Glu89Gln (tabella 3). Come per altre patologie apparentemente monogeniche [Tardiff Heart Fail Rev 2005], "geni modificatori" possono contribuire alla diversa espressione fenotipica, anche se al momento non esistono dati in grado di supportare questa ipotesi nell'ATTR [Soares Hum Mol Genet 2005]. Tale dato si aggiunge a quelli già precedentemente noti e descritti in relazione ai possibili determinanti dell'eterogeneità fenotipica dei pazienti con ATTR quali il sesso dei pazienti (coinvolgimento miocardio meno rilevante nelle donne suggerendo che alcune caratteristiche biologiche possono proteggerle dall'infiltrazione di sostanza amiloide [Rapezzi Amyloid 2008; Bittencourt Eur J Neurol 2005]) e del genitore responsabile della trasmissione del gene mutato (malattia più precoce e grave se

trasmessa dalla madre come descritto nelle famiglie Svedesi e Portoghesi affette da mutazione Val30Met) [Hellman U Amyloid 2008; Bonaiti Amyloid 2009], la composizione delle fibrille (transtiretina intera o frammentata [Bergstrom J Pathol 2005]), la distribuzione geografica e la tipologia di aggregazione: endemica o non endemica [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010; Bittencourt Eur J Neurol 2005; Ikeda Neurology 2002; Suhr J Intern Med 2003; Ohmori J Med Gent 2004; Conceicao Muscle Nerve 2007] (grafico 11).

Lo studio relativo all'aplotipo condiviso supporta fortemente l'esistenza di un predecessore comune per tutti i pazienti con Ile68Leu analizzati. Si deve anche notare che, nella maggior parte dei casi, i pazienti con Ile68Leu provenivano da una definita area geografica intorno all'Appennino Tosco Emiliano suggerendo uno scenario endemico.

### **Profilo della malattia dei pazienti con fenotipo cardio e diagnosi differenziale**

Il profilo clinico e strumentale dei pazienti ATTR con fenotipo cardio è relativamente ben definito.

Infatti nella quasi totalità dei casi si tratta di pazienti maschi > 65 aa, con segni di scompenso cardiaco ed ipertrofia ventricolare sinistra all'ecocardiogramma. Si può notare che la frazione d'eiezione del ventricolo sinistro è moderatamente depressa sebbene le sue dimensioni non siano aumentate. L'età alla diagnosi (70 [62–75] aa) è in media di 17 aa superiore a quella dei pazienti con fenotipo misto (53[43–62] aa) e di 28 aa superiore a quella dei pazienti con fenotipo esclusivamente neurologico (42 [37–61] aa). Queste differenze possono essere solo parzialmente riconducibili alla diversa penetranza età-correlata delle singole mutazioni poiché le manifestazioni cardiache compaiono in un'età più avanzata se comparate con quelle neurologiche anche tra pazienti con la stessa mutazione (es. nel caso della mutazione Ile68Leu l'esordio del fenotipo cardio avviene a  $68 \pm 6$  aa mentre quello neuro a  $38 \pm 4$  aa ).

La spiegazione di questo fenomeno non è chiara. Da una parte è possibile che l'assenza di sintomi neurologici faccia arrivare più tardivamente il paziente

all'attenzione del medico. Dall'altra parte, è altamente probabile che l'infiltrazione miocardica delle amiloidosi transtiretino relate (sia ereditaria che senile) richieda più tempo rispetto a quello necessario per sviluppare una neuropatia.

Il nostro riscontro che la maggior parte dei pazienti con cardiomiopatia erano maschi è in linea con l'ipotesi che il sesso femminile (nella fatti specie della sua caratterizzazione ormonale) conferisca qualche protezione rispetto all'infiltrazione miocardica di amiloide [Rapezzi Nat Rev Cardiol 2010].

Confrontati con i pazienti con fenotipo misto, i pazienti con fenotipo cardiaco hanno un coinvolgimento cardiaco più rilevante sia all'ECG che all'ecocardiogramma (tabella 4). Ancora una volta è difficile stabilire se queste differenze sono dovute ad un bias temporale o, più probabilmente, il grado di infiltrazione miocardica è intrinsecamente maggiore in alcune mutazioni TTR e in alcuni pazienti ATTR.

In letteratura ci sono solo pochi report relativi a pazienti con ATTR con fenotipo cardiaco e derivano principalmente da coorti di pazienti (il più delle volte appartenenti ad una singola famiglia) con una singola mutazione per la TTR [Jacobson NEJM 1997; Sattianayagam 2011; Ranlov Am J Med 1992]

Negli unici due lavori che riportano dati ecocardiografici di un piccolo gruppo di pazienti con la mutazione Val122Ile sia gli spessori del setto interventricolare che la frazione d'eiezione sono comparabili con i nostri risultati [Connors Am Heart J 2009]. Analogamente, il coinvolgimento cardiaco dei pazienti Irlandesi e Scozzesi con la mutazione Thr60Ala è caratterizzato da ipertrofia concentrica e moderata disfunzione ventricolare sinistra in assenza di bassi voltaggi del QRS nella maggior parte dei casi [Sattianayagam 2011].

I nostri dati confermano che la cardiomiopatia amiloidotica ATTR con fenotipo esclusivamente cardiaco è frequentemente erroneamente diagnosticata come cardiomiopatia ipertrofica. La disponibilità di un gruppo di controllo matched per età e sesso con una diagnosi definitiva (geneticamente provata) di cardiomiopatia ipertrofica consente di confrontare diverse tipologie di cardiomiopatie con ipertrofia ventricolare sinistra e l'attenta lettura sia

dell'ecocardiogramma che dell'elettrocardiogramma offre diversi suggerimenti per una diagnosi differenziale. All'ecocardiogramma le differenze più sostanziali sono relative alla distribuzione dell'ipertrofia ventricolare sinistra (concentrica nella cardiomiopatia amiloidotica e generalmente asimmetrica nella CMPI), alla funzione sistolica ventricolare sinistra (con dimensioni tele diastoliche maggiori e frazione d'eiezione più compromessa nella cardiomiopatia amiloidotica) e alla coesistenza di versamento pericardico ed ispessimento delle valvole atrio-ventricolari (frequente nei pazienti con cardiomiopatia amiloidotica e sostanzialmente assente nella CMPI). Tali dati sono peraltro in linea con quelli pubblicati da Lewis et. al sulla CMPI nell'anziano [Lewis JACC 1989].

All'ECG le principali differenze sono rappresentate dalla frequenza delle alterazioni ischemiche della ripolarizzazione (molto più frequenti nella CMPI), dall'intervallo QTc (più prolungato nella cardiomiopatia amiloidotica) e dai bassi voltaggi del QRS (maggior prevalenza nelle forme ATTR ed SSA). Comunque, nonostante una significativa differenza dei valori di QRS score tra i due gruppi, solo il 35% dei pazienti con ATTR mostrava un pattern con bassi voltaggi del QRS. Questo reperto conferma osservazioni precedenti che riportavano un'elevata prevalenza di bassi voltaggi del QRS (50% dei casi) solo in pazienti con cardiomiopatia amiloidotica AL [Rapezzi Circ 2009; Garcia Pavia].

Mentre una lettura accurata di ECG ed ecocardiogramma può consentire una diagnosi differenziale tra cardiomiopatia ATTR e CMPI, la diagnosi differenziale tra ATTR e SSA è fattibile esclusivamente con la genetica poiché, a parte l'età, non ci sono altri reperti clinici o strumentali significativamente differenti tra i due gruppi.

### **Storia naturale**

La storia naturale dell'ATTR è solo parzialmente conosciuta a causa della rarità della malattia e della sua elevata eterogeneità genotipica. La maggior parte dei dati di outcome e prognosi relativi all'amiloidosi cardiaca deriva dai pazienti

con forma AL [Falk 2010; Rosenzweig J Hematol Oncol 2011]. I pazienti con cardiomiopatia da ATTR hanno un decorso più lento di quelli con forma AL e la progressione della neuropatia e lo scompenso rappresentano le loro principali cause di morte [Herlenius Transplantation 2004]. Come nella forma AL anche nell'ATTR il coinvolgimento cardiaco rappresenta un fattore di rischio incrementale per tutti gli eventi e per quelli cardiovascolari. Di conseguenza, le mutazioni non-Val30Met in cui il coinvolgimento cardiaco è più frequente e severo, sono associate ad una prognosi particolarmente infausta, anche dopo un trapianto di fegato riuscito [Herlenius Transplantation 2004]. Ciò è supportato anche nella nostra popolazione, in cui la sopravvivenza generale a 5 aa è, ... ed in cui le curve di Kaplan Meier mostrano come la prognosi dei pazienti con mutazione Val30Met sia significativamente migliore rispetto ai nonVal30Met sia quando non censorizzati che quando censorizzati al trapianto (isolato o combinato). Molto poco si sa sulla causa sottostante e l'incidenza della morte improvvisa che è stato riportato essere associata con la comparsa di blocchi atrio-ventricolari avanzati, tachicardia ventricolare/fibrillazione ventricolare, o (probabilmente più frequentemente) dissociazione elettromeccanica [Falk 2010].

### **Implicazioni terapeutiche**

Quando si considerano pazienti con ATTR ad esclusivo coinvolgimento cardiaco insorgono problemi terapeutici particolari. Nell'ATTR, il trapianto ortotopico di fegato al momento rappresenta l'unico trattamento in grado di modificare l'andamento della malattia in quanto stabilizza, se effettuato per tempo, la progressione della neuropatia [Herlenius Transplantation 2004]. Però, nonostante il trapianto possa avere successo, un numero rilevante di pazienti con coinvolgimento cardiaco manifesta una progressione della cardiomiopatia che talora rappresenta addirittura la causa di morte post-trapianto (4% dei casi; la metà entro i primi 3 mesi) [Dubrey Transplantation 1997; Ohya Surg Today 2011]. Per tale motivo è fondamentale una corretta valutazione pre-operatoria del grado di coinvolgimento cardiaco per stabilire a priori una possibile

necessità di un trapianto combinato cuore-fegato. Abbiamo infatti documentato come in un contesto non endemico come il nostro i dati di sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto combinato piuttosto che isolato sono migliori e ciò è giustificato dal fatto che sia nei Val30Met non endemici (in cui comunque è presente un coinvolgimento cardiaco) che nei nonVal30Met si sospende la progressione del fattore prognostico più negativo: la cardiomiopatia.

Inoltre, nei pazienti con fenotipo esclusivamente cardiaco che prospettano una progressione della cardiomiopatia ma non lo sviluppo di sintomi neurologici, il trapianto di fegato può essere discutibile. La nostra decisione di procedere con il trapianto combinato cuore-fegato, per ora, è emersa dalla necessità di sostituire il cuore e dalle attuali indicazioni relative al trapianto di fegato nei pazienti con ATTR. Riteniamo però che, in casi selezionati con esclusivo fenotipo cardiaco, potrebbe essere ragionevole effettuare un trapianto cardiaco isolato in quanto ci sembra improbabile che il paziente possa sviluppare una recidiva di amiloidosi cardiaca nei tempi di durata del graft e che i rischi aggiuntivi non supportino un concomitante trapianto di fegato. Tale approccio, al momento, è stato scelto in soli 3 casi descritti in letteratura e tutti relativi a pazienti portatori di mutazione Val122Ile. 1) paziente di origine afro-caraibica portatore della mutazione in omozigosi sottoposto a trapianto di cuore isolato all'età di 59 aa. Follow up di 3 aa senza apparente amiloidosi del graft e di altri organi [Hamour Am J of Transplantation 2008] ; 2) paziente di 60 aa deceduto dopo 71 gg dal trapianto per polmonite batterica; 3) paziente di 54 aa con follow up di 1 aa senza segni apparenti di amiloidosi del graft [Varr J Heart and Lung Transplant 2011]. Studi futuri, più ampi, potranno contribuire a scelte terapeutiche più idonee in merito. Inoltre, come avvenuto per i pazienti affetti da neuropatia in cui in uno studio pilota di fase 2/3 condotto su 128 pazienti con documentata mutazione Val30Met lo stabilizzatore della transtiretina Tafamidis Meglumine (molecola a somministrazione orale derivata dal FANS diflunisal) ha evidenziato, nell'arco dei 18 mesi di osservazione, una sospensione di progressione della patologia, un miglioramento della qualità di vita e dello stato nutrizionale [Coelho Neurology 2010; Sekijima Amyloid 2006; Ratner Nat Biotechnol 2009]; anche i pazienti

con fenotipo cardio e con forma senile dovrebbero essere inclusi in protocolli prospettici dedicati in grado di valutare gli effetti di tali farmaci sulla progressione di malattia.

## LIMITAZIONI

Interpretando i nostri dati, ed in particolare la prevalenza dei diversi fenotipi, è necessario considerare il contesto geografico e le origini etniche della popolazione in studio. I nostri dati non necessariamente possono risultare applicabili ad altri contesti geografici con diverso background genetico. Comunque, date le analogie esistenti tra i profili elettrocardiografici ed ecocardiografici dei nostri pazienti e di quelli precedentemente riportati per i pazienti portatori delle mutazioni Val122Ile e Thr60Ala, è plausibile che i nostri suggerimenti per la diagnosi differenziale tra i pazienti affetti da ATTR cardiaca e cardiomiopatia ipertrofica possano essere utilizzati anche in altri contesti. A questo proposito, nonostante le differenze statisticamente significative dei dati clinici e strumentali tra i due sottogruppi analizzati, il numero limitato di pazienti in esame non consente di ottenere valori di cutoff sufficientemente affidabili in termini di sensibilità e specificità.

## CONCLUSIONI

Un sottogruppo rilevante (circa il 15%) di pazienti Caucasiche affetti da ATTR, in un'area non endemica per questa patologia, ha, alla presentazione, un fenotipo esclusivamente cardiaco e non sviluppa sintomi neurologici di rilievo ad un follow up a medio termine. Nel nostro setting la mutazione Ile68Leu è quella maggiormente correlata a questo fenotipo che è caratterizzato dalla netta prevalenza di pazienti di sesso maschile con diagnosi in età più avanzata. Peraltro i pazienti con Ile68Leu mostrano un aplotipo condiviso indicativo di un possibile fondatore comune.

Si conferma quindi che in una malattia descritta come neurologica, esiste, di fatto, uno spettro di espressioni cliniche con una significativa correlazione “genotipo-fenotipo”, che va dalla forma Val30Met (forma portoghese classica) con interessamento essenzialmente neurologico (FAP), alle forme legate alle mutazioni Val122Ile (“Afro-Americana”), Leu111Met (forma Danese”), Thr60Ala (“Irlandese”) e Ile68Leu con fenotipo essenzialmente cardiologico, passando attraverso fenotipi misti che sottendono un numero elevato di mutazioni.

Inoltre, questa cardiomiopatia amiloidotica – associata a diverse mutazioni della TTR – è frequentemente erroneamente confusa, dal punto di vista diagnostico, oltre che con le più comuni cardiopatie ischemico/ipertensiva, con la forma senile o con la cardiomiopatia ipertrofica. Pur non potendo delineare cut-off di diagnosi differenziale possiamo affermare che un'attenta analisi elettrocardiografica ed ecocardiografica può consentire una corretta diagnosi differenziale tra la forma ATTR e la CMPI mentre per la diagnosi differenziale ATTR – SSA è assolutamente necessario il test genetico.

Abbiamo inoltre sollevato il problema del trapianto combinato cuore-fegato nei pazienti con forma ad esclusivo coinvolgimento cardiaco in cui il ruolo della sostituzione del fegato è discutibile.

# **REGISTRO THAOS (II PARTE)**

## **Materiali e metodi**

Il Thaos è un registro osservazionale, multicentrico, multinazionale e longitudinale dei pazienti affetti da amiloidosi familiare transtiretina o da amiloidosi sistemica wild type o semplicemente portatori asintomatici della mutazione. Tale registro è stato istituito nel 2007 in collaborazione con gli esperti clinici di questa patologia e disegnato per :

- descrivere le caratteristiche dei pazienti affetti da malattia;
- caratterizzare la variabilità, la progressione e la storia naturale della malattia;
- caratterizzare le differenze regionali nell'espressione della malattia e la relazione genotipo-fenotipo;
- valutare la qualità di vita/ospedalizzazioni dei pazienti affetti;
- valutare le terapie in atto/trapianto;
- sviluppare nuove raccomandazioni di trattamento;
- fornire pubblicazioni continue sui dati di sopravvivenza.

Attualmente partecipano al registro 46 centri in 19 paesi (figura 10) e sono stati arruolati 1119 pazienti di cui sono riportati dati clinici e strumentali cardiologici, neurologici e di funzionalità renale.



**Figura 10.** Centri partecipanti al registro THAOS

L'istituto di Cardiologia di Bologna, in collaborazione con la Neurologia dell'Ospedale Bellaria, partecipa attivamente al registro internazionale inserendo nel database tutti i pazienti affetti da ATTR in maniera anonima, previa acquisizione di consenso informato ed aggiornando, ad ogni visita di controllo, tutti i dati relativi allo stato clinico e strumentale del paziente.

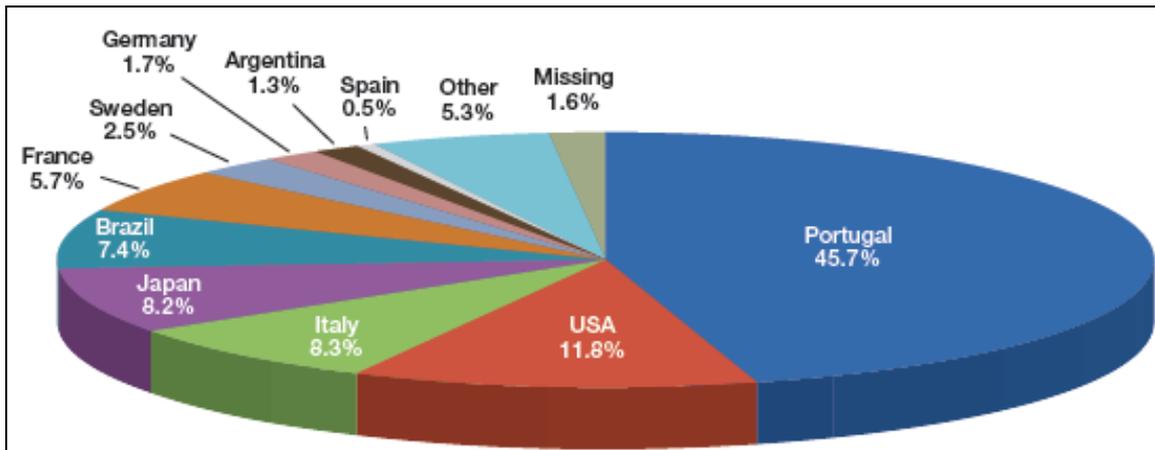
## **Risultati**

### Numero e distribuzione geografica dei pazienti

Al momento dell'analisi (1/09/2011) i dati erano relativi ad 828 pazienti (dei 1119). 69 erano affetti da forma wild type sintomatica, 541 da forma ATTR sintomatica, 217 erano portatori asintomatici di mutazione per la TTR ed 1 era portatore asintomatico di forma wild type.

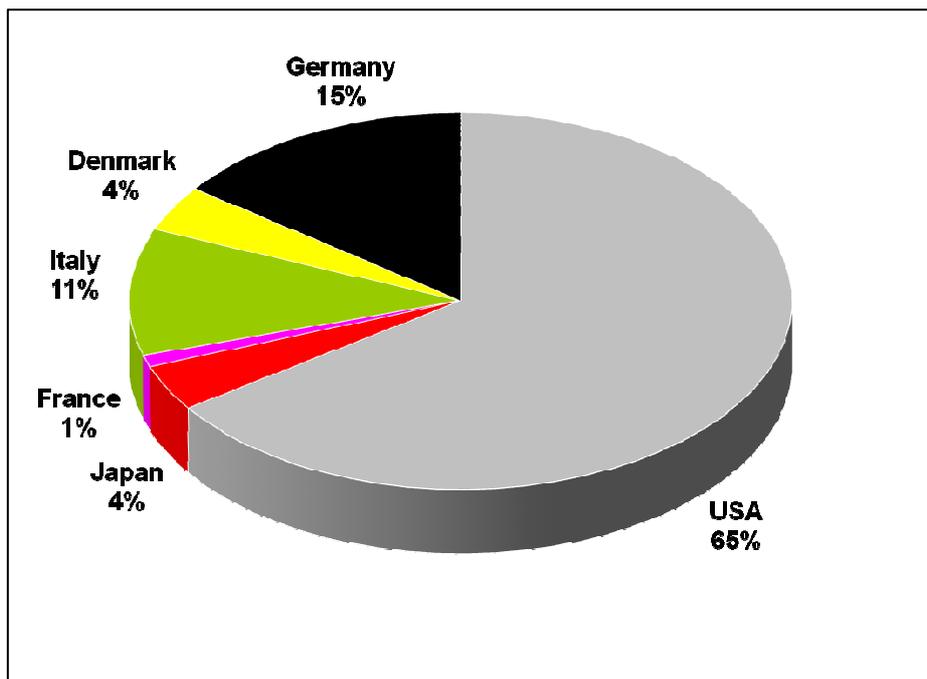
Nelle figure sottostanti è rappresentata la percentuale dei pazienti arruolati in relazione al Paese di provenienza.

Per quanto riguarda la forma ATTR la maggior parte dei pazienti proveniva dal Portogallo e a seguire dagli Stati Uniti, dall'Italia e dal Giappone (figura 11).



**Figura 11.** Percentuale dei pazienti con ATTR arruolati in relazione al Paese di provenienza

Mentre per quanto riguarda la forma wild type la maggior parte dei pazienti proveniva dagli Stati Uniti e a seguire dalla Germania e dall'Italia (figura 12).



**Figura 12.** Percentuale dei pazienti con forma wild type arruolati in relazione al Paese di provenienza

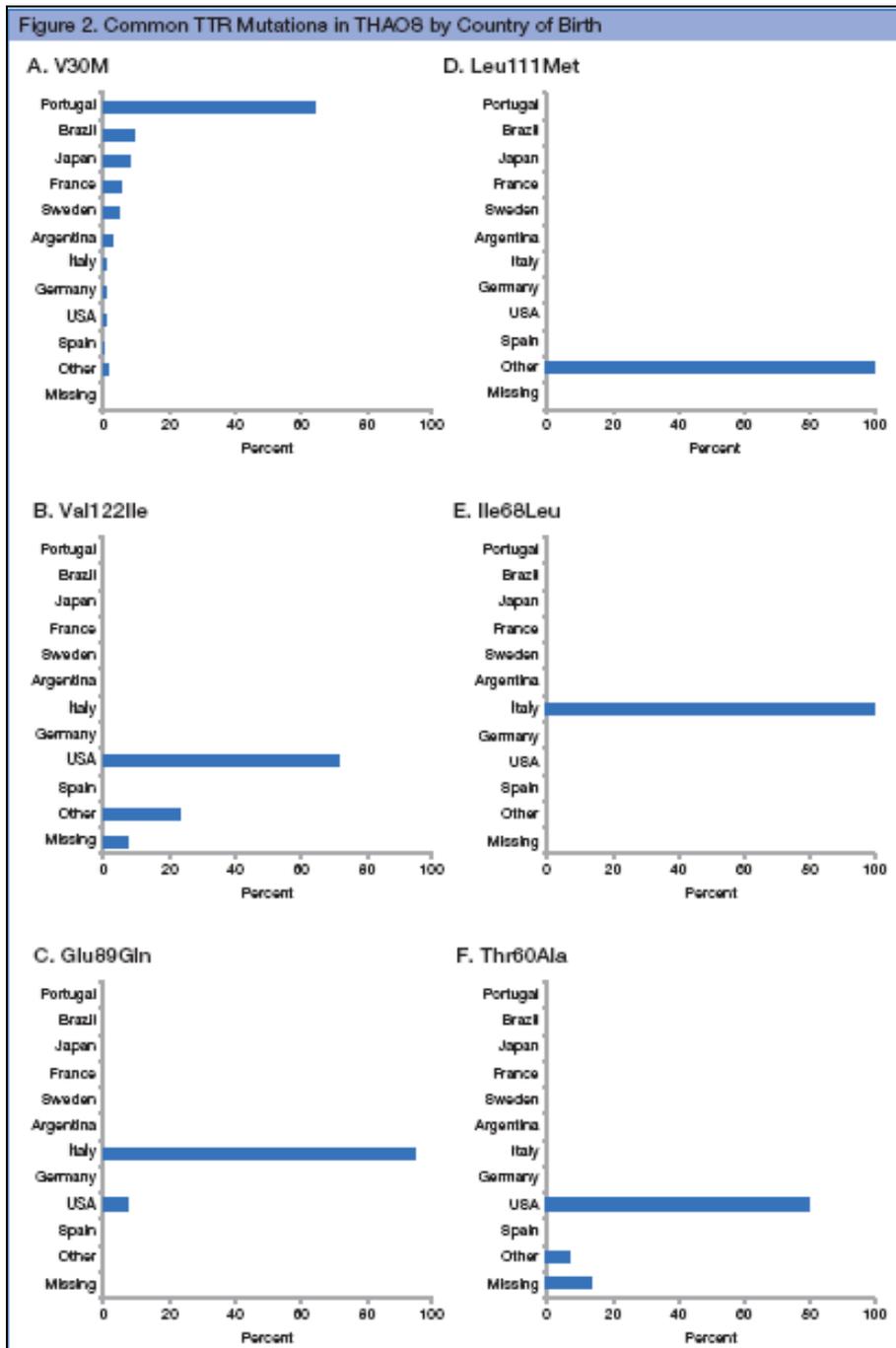
### Distribuzione geografica delle mutazioni

Globalmente sono state identificate 41 mutazioni. La Val30Met è rappresentata nel 66.6% dei casi con massima concentrazione in Portogallo, Brasile e Svezia.

La Val122Ile e la Glu89Gln (rispettivamente 4 e 1.9 %) sono le mutazioni più rappresentate tra le non Val30Met e si trovano prevalentemente e rispettivamente negli Stati Uniti ed in Italia. Subito dopo troviamo la Leu111Met (in Danimarca), la Thr60Ala (Stati Uniti + Irlanda) e l' Ile68Leu in Italia (figura 12+13).

<b>Mutation</b>	<b>Total</b>	<b>% of pts with TTR mutation</b>	<b>Cumulative %</b>
Val30Met	<b>649</b>	66.6	66.6
Val122Ile	<b>39</b>	4.0	70.6
Glu89Gln	<b>19</b>	1.9	71.9
Leu111Met	<b>17</b>	1.7	73.6
Thr60Ala	<b>15</b>	1.5	75.1
Ile68Leu	<b>15</b>	1.5	76.6

**Figura 12.** Espressione numerica e percentuale delle 6 mutazioni principali in relazione alla coorte di pazienti analizzata (tot 828 pz). Da notare che queste mutazioni coprono il 76.6% dei pazienti totali



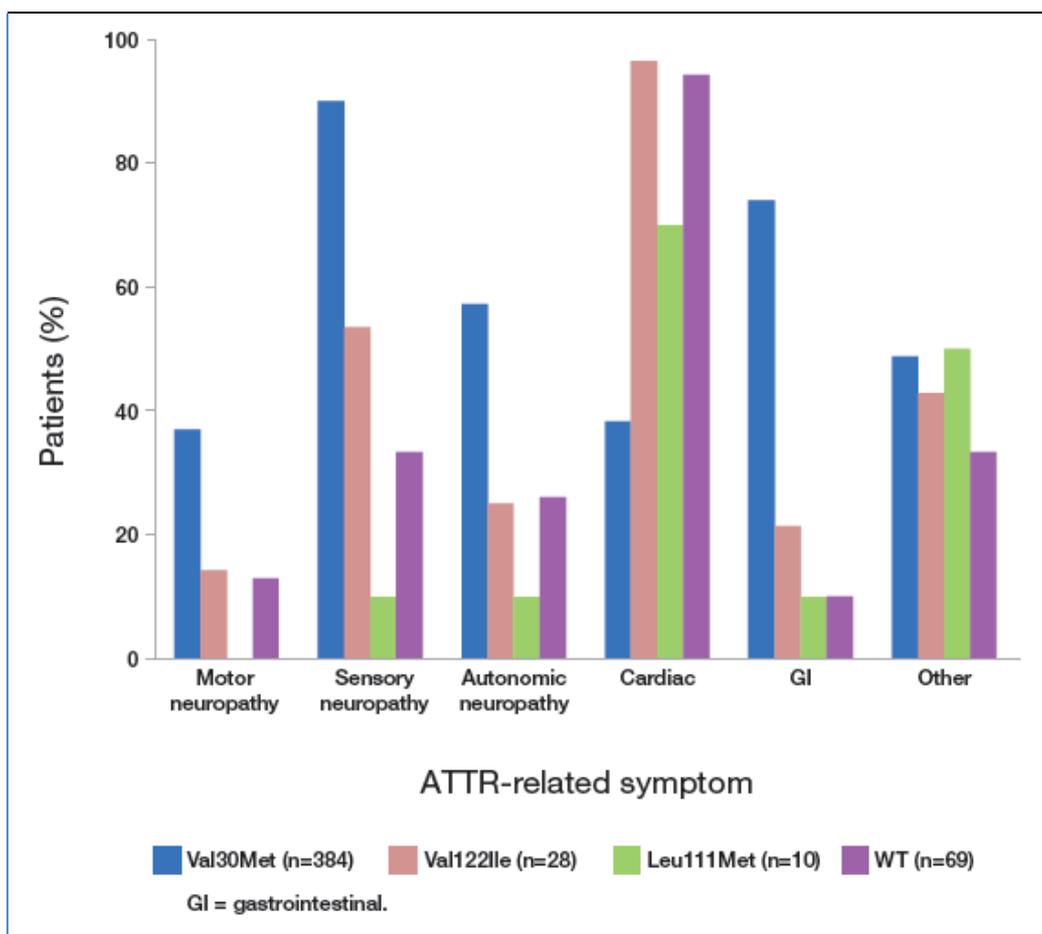
**Figura 12.** Distribuzione geografica delle principali mutazioni

Eterogeneità fenotipica

L'analisi dei dati provenienti dal THAOS ha confermato l'esistenza, tra i pazienti affetti da ATTR, di un'importante eterogeneità fenotipica dipendente in primo luogo dalla specifica mutazione, e quindi dall'area geografica di

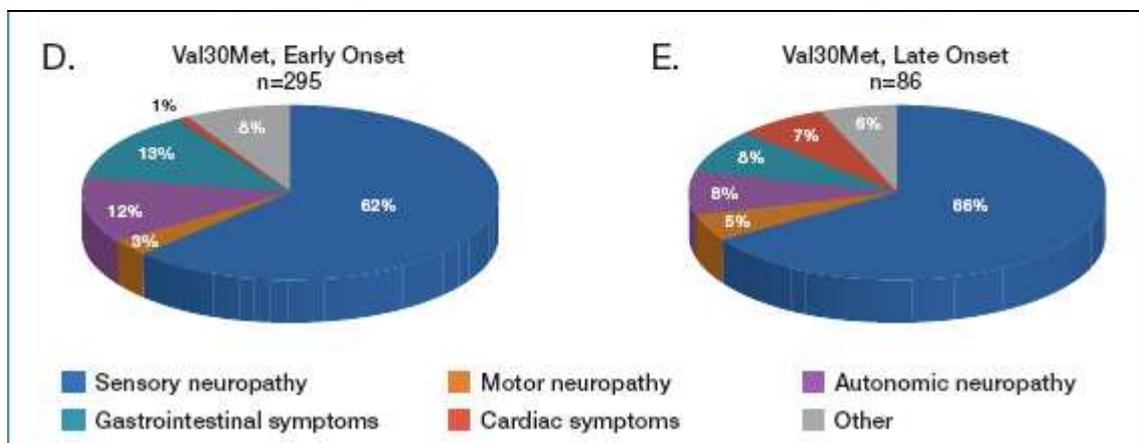
provenienza, dall'età di insorgenza dei sintomi, dal sesso del paziente e del genitore che ha trasmesso la mutazione.

Il fenotipo dei pazienti affetti da ATTR differisce quindi molto a seconda della mutazione ma è emerso che tutte le mutazioni sono associate ad un coinvolgimento multiorgano di entità variabile. In generale fra i pazienti con ATTR i sintomi di esordio della malattia erano rappresentati dalla neuropatia sensitiva (56.1%) con coinvolgimento da distale a prossimale mentre meno frequentemente la malattia esordiva con una neuropatia motoria (3.8%). Come già noto in letteratura la mutazione Val30Met presenta all'esordio una manifestazione prevalentemente neurologica mentre le mutazioni non Val30Met (in primis Val122Ile e Leu111Met) e la forma senile prevalentemente cardiologica.



**Figura 13.** Espressione del coinvolgimento dei vari organi nelle diverse mutazioni. Prevalentemente neurologico (sensitivo, motorio e disautonomico) nella mutazione Val30Met e prevalentemente cardiologico nella mutazione Val122Ile, Leu111Met e nella forma senile.

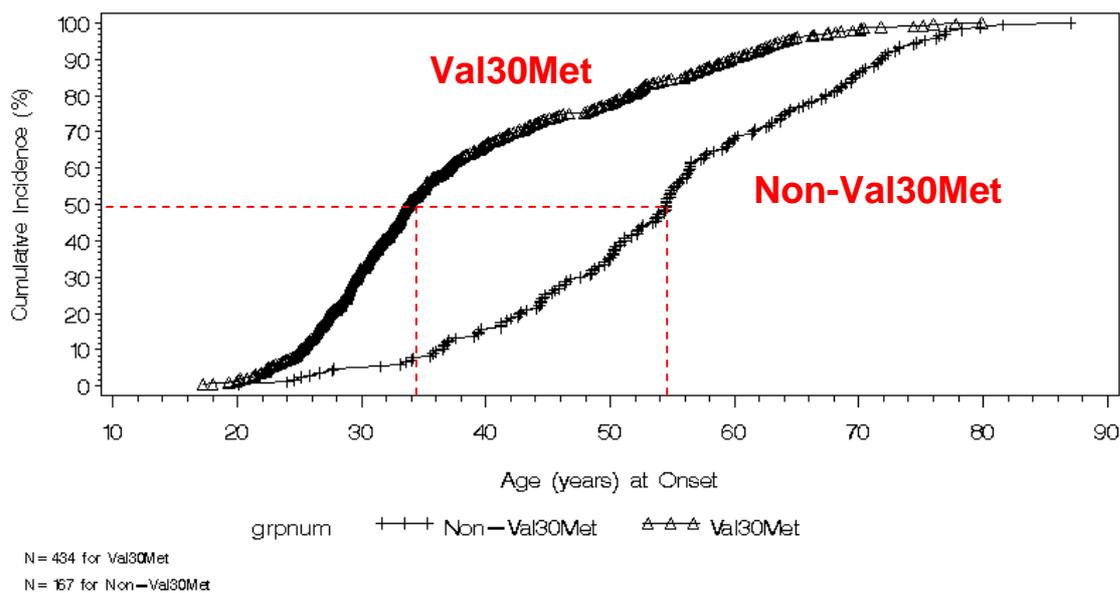
Nell'ambito della mutazione Val30Met vanno poi distinte le forme ad insorgenza precoce (< 50 aa) da quelle tardive (> 50 aa) che in letteratura fanno rispettivamente riferimento alle forme endemiche vs le non endemiche. Infatti, a parità di neuropatia sensitiva, nelle prime prevale la disautonomia e nelle seconde la neuropatia motoria e l'interessamento cardiologico che si presenta con una frequenza di 7 volte maggiore (figura 13-14).



**Figura 14.** Differente manifestazione clinica della mutazione Val30Met a seconda dell'insorgenza precoce (< 50 aa) o tardiva (> 50 aa) della malattia.

Nei pazienti affetti da SSA le manifestazioni cardiologiche erano i primi sintomi di presentazione (77.3%) seguiti dai sintomi correlati alla neuropatia sensitiva (7.6%) che peraltro ancora non è chiaro se siano imputati alla patologia amiloidotica o rappresentino delle semplici comorbidity (fig 13).

Per quanto riguarda l'età di presentazione di malattia in generale è più precoce (di circa 20 aa) per i pazienti con mutazione Val30Met piuttosto che per i pazienti con mutazione non Val30Met (fig 15).



**Figura 15.** Differenza di età di presentazione clinica nei pazienti con Val30Met vs NonVal30Met. Cumulative incidence al 50% 35 vs 55 aa.

### Ruolo del sesso del paziente e del “transmitting parent”

Le differenze di espressione di malattia amiloidotica sesso-relate sono un argomento ancora piuttosto inesplorato. Se da un lato è noto che nella forma AL il rapporto maschi: femmine è circa 1:1 e che nella forma wild type i malati sono quasi solo maschi i dati nella forma ATTR sono decisamente meno lineari.

In letteratura nelle forme Val30Met endemiche il rapporto maschi:femmine è circa 1:1 mentre nelle forme Val30Met non endemiche prevale l’interessamento maschile. Data la dispersione dei casi fra le diverse mutazioni non Val30Met è più difficile fare una valutazione in tal senso. Ciò che è emerso dal registro è che in generale il rapporto fra maschi e femmine è stato 1.15, variando da 0.55 per la mutazione Glu89Gln a 2.88 per la mutazione Val122Ile (considerando le sole mutazioni con almeno 10 pazienti).

Analizzando in dettaglio gli aspetti cardiologici e rapportandoli al sesso del paziente è stato osservato come il valore mediano dello spessore della parete del ventricolo sinistro indicizzato per l’altezza e la massa ventricolare sinistra indicizzata erano maggiori negli uomini rispetto alle donne (8.54 vs 6.62 [ $p < 0.001$ ] e 156.7 vs 101.1 [ $p < 0.001$ ] rispettivamente). I predittori positivi di

incremento dello spessore medio del LV erano il sesso maschile (B 1.218, 95% CI: 0.493 a 1.943,  $p=0.0001$ ) e la mutazione Glu89Gln (B 1.557, 95% CI : 0.5865 a 3.70,  $p=0.1535$ ) mentre la mutazione Val30Met presentava una associazione negativa con l'aumento dello spessore (B -1.7379, 95% CI: -2.512 a -0.9638,  $p<0.0001$ ). La cardiomiopatia era presente in 114 pazienti (degli 828 analizzati); la prevalenza femminile era più bassa in questo sottogruppo (14.9% vs 46.5% nell'intera coorte,  $p<0.0001$ ). Le donne con cardiomiopatia erano più anziane delle altre donne sintomatiche (65.6 aa vs 45.6 aa) e la frazione d'eiezione ventricolare sinistra era maggiore nelle donne che negli uomini (59.9 vs 48.3  $p=0.0041$ ). Pertanto il coinvolgimento miocardico è risultato meno pronunciato nelle donne rispetto agli uomini, supportando l'ipotesi che alcuni fattori biologici possano proteggere la donna dall'interessamento cardiaco in corso di ATTR. Nessuna differenza di sesso in termini di coinvolgimento neurologico e renale fra i pazienti affetti da ATTR.

Inoltre, mentre per i pazienti sintomatici (indipendentemente dal tipo di mutazione Val30Met o non-Val30Met) non si sono osservate differenze in termini di sesso del "transmitting parent", nei pazienti asintomatici la mutazione era più spesso trasmessa dal padre. Inoltre, nei pazienti affetti da ATTR con mutazione Val30Met, la manifestazione dei sintomi (sia neurologici che cardiologici) era più precoce se la mutazione era ereditata dalla madre. Un trend simile (anche se non statisticamente significativo) è stato osservato nei pazienti con ATTR non-Val30Met. Questi risultati suggeriscono che, piuttosto che una penetranza aumentata quando la mutazione viene trasmessa per via materna, vi sia una ridotta penetranza quando essa viene trasmessa per via paterna. E' possibile infatti che la ridotta penetranza della mutazione trasmessa per via paterna, in particolare nei casi di ATTR Val30Met, sia dovuta ad un' inattivazione del gene TTR nei maschi.

### Trapianto d'organo

149 pazienti sintomatici (144 ATTR e 5 SSA) su 610 (24.4%) sono stati sottoposti a trapianto d'organo e la maggior parte in Portogallo. In ogni genotipo il sesso predominante sottoposto a trapianto era quello maschile e per la forma wild type esclusivamente maschile. Il 95.8% dei pazienti ha subito il trapianto di fegato, 11 pazienti il trapianto combinato cuore-fegato e 9 pazienti il trapianto di cuore isolato (4 affetti da forma wild type e 5 ATTR con mutazione Val122Ile o Leu111Met). I pazienti con mutazione Val30Met sottoposti a trapianto avevano la stessa età di quelli non trattati (43.1 vs 44.1 aa) mentre tra i pazienti con mutazione non Val30Met quelli sottoposti a trapianto di fegato erano più giovani di quelli non sottoposti a trapianto di fegato (53.8 vs 60.4 aa  $p=0.002$ ). I pazienti trapiantati con mutazione Val30Met erano più giovani dei trapiantati non Val30Met. In generale inoltre i pazienti trapiantati avevano un'insorgenza di malattia più precoce (statisticamente significativa solo per la forma non Val30Met) ed una storia di malattia più lunga (intera coorte  $p<0.05$ ). La mediana fra l'insorgenza dei sintomi e il trapianto di fegato era di  $4.02 \pm 3.05$  anni per i pazienti affetti da Val30Met e  $4.01 \pm 4.98$  per i nonVal30Met (sostanzialmente sovrapponibile). Questi risultati sono simili a quelli riportati nel registro internazionale FAPWTR (Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Register) [2010].

# TABELLE

**Tabella 1.** Classificazione delle amiloidosi

<b>Proteina amiloide</b>	<b>Precursore</b>	<b>Sistemica (S) o localizzata (L)</b>	<b>Sindrome o tessuti coinvolti</b>
<b>AL</b>	<b>Catene leggere delle immunoglobuline</b>	<b>S, L</b>	<b>Primaria Associata al mieloma</b>
<b>AH</b>	<b>Catene pesanti delle immunoglobuline</b>	<b>S, L</b>	<b>Primaria Associata al mieloma</b>
<b>A<math>\beta_2</math>M</b>	<b><math>\beta_2</math> microglobulina</b>	<b>S L?</b>	<b>Associata all'emodialisi Articolazioni</b>
<b>ATTR</b>	<b>Transtiretina</b>	<b>S L?</b>	<b>Familiare Senile sistemica Tenosinovia</b>
<b>AA</b>	<b>(Apo) AA sierica</b>	<b>S</b>	<b>Secondaria, reattiva</b>
<b>AApoAI</b>	<b>Apolipoproteina AI</b>	<b>S L</b>	<b>Familiare Aorta, menisco</b>
<b>AApoAII</b>	<b>Apolipoproteina AII</b>	<b>S</b>	<b>Familiare</b>
<b>AApoAIV</b>	<b>Apolipoproteina AIV</b>	<b>S</b>	<b>Sporadica, associata all'età</b>
<b>AGel</b>	<b>Gelsolina</b>	<b>S</b>	<b>Familiare (finlandese)</b>
<b>ALys</b>	<b>Lisozima</b>	<b>S</b>	<b>Familiare</b>
<b>AFib</b>	<b>Catena <math>\alpha</math> del fibrinogeno</b>	<b>S</b>	<b>Familiare</b>
<b>ACys</b>	<b>Cistatina C</b>	<b>S</b>	<b>Familiare (islandese)</b>
<b>ABri</b>	<b>ABriPP</b>	<b>S</b>	<b>Demenza familiare (inglese)</b>
<b>ALect2</b>	<b>Fattore chemotattico leucocitario-2</b>	<b>S</b>	<b>Soprattutto renale</b>
<b>ADan</b>	<b>ADanPP</b>	<b>L</b>	<b>Demenza familiare (danese)</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	<b>Precursore proteico A<math>\beta</math> (A<math>\beta</math>PP)</b>	<b>L</b>	<b>Malattia di Alzheimer, invecchiamento</b>
<b>APrP<sup>sc</sup></b>	<b>Proteina prionica</b>	<b>L</b>	<b>Encefalopatie spongiformi</b>
<b>ACal</b>	<b>(Pro)calcitonina</b>	<b>L</b>	<b>Tumori tiroidei a cellule C</b>
<b>AIAPP</b>	<b>Amilina</b>	<b>L</b>	<b>Isole di Langerhans Insulinomi</b>
<b>AANF</b>	<b>Fattore natriuretico atriale</b>	<b>L</b>	<b>Atri cardiaci</b>
<b>APro</b>	<b>Prolattina</b>	<b>L</b>	<b>Ipofisi dell'anziano Prolattinomi</b>
<b>AIns</b>	<b>Insulina</b>	<b>L</b>	<b>Iatrogena (siti di iniezione dell'insulina)</b>
<b>AMed</b>	<b>Lactaderina</b>	<b>L</b>	<b>Tonaca media dell'aorta</b>
<b>AKer</b>	<b>Cherato-epitelina</b>	<b>L</b>	<b>Cornea, familiare</b>
<b>ALac</b>	<b>Lattoferrina</b>	<b>L</b>	<b>Cornea</b>
<b>AOaap</b>	<b>Proteina associata all'ameloblasto odontogenico</b>	<b>L</b>	<b>Tunori odontogenici</b>
<b>ASemI</b>	<b>Semenogelina I</b>	<b>L</b>	<b>Vescicole seminali</b>

**Tabella 2:** Mutazioni TTR della popolazione in studio secondo famiglie e pazienti

Mutazioni	Famiglie (%)	Pazienti (%)
Val30Met	20 (22.5%)	46 (24.8%)
Glu89Gln	9 (10.2%)	40 (21.5%)
Ile68Leu	22 (24.7%)	27 (14.6%)
Phe64Leu	10 (11.2%)	13 (7%)
Thr49Ala	1 (1.1%)	12 (6.5%)
Gly47Ala	2 (2.3%)	7 (3.8%)
Arg34Thr	1 (1.1%)	6 (3.2%)
Ala36Pro	1 (1.1%)	6 (3.2%)
Ser50Arg	2 (2.3%)	4 (2.2%)
Gly47Arg	2 (2.3%)	3 (1.6%)
Glu54Lys	1 (1.1%)	3 (1.6%)
Val122Ile	3 (3.5%)	3 (1.6%)
Ser23Asn	2 (2.3%)	2 (1.2%)
Gly47Glu	1 (1.1%)	2 (1.2%)
Phe33Val	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Hys88Arg	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Val30Ala	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Val14Leu	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Gly53Ala	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Gly57Arg	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Tyr78Phe	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Ile107Phe	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Thr59Lys	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Glu89Lys	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Glu92Lys	1 (1.1%)	1 (0.5%)
Phe64Ile	1 (1.1%)	1 (0.5%)
<b>Totale</b>	<b>89 (100%)</b>	<b>186 (100%)</b>

**Tabella 3:** Caratteristiche cliniche dei pazienti al baseline secondo la classificazione fenotipica

	Tutti	Cardio	Misto	Neuro	p
<b>Pazienti, n</b>	186	<b>31</b>	<b>109</b>	<b>46</b>	
<b>Maschi, n (%)</b>	130 (70)	29 (94)	73 (67)	28 (61)	0.005†‡
<b>Famiglie, n</b>	89	29	51	28	Na
<b>Mutazioni Transtiretina, n (%)</b>					na
Ile68Leu	27 (14.6%)	23 (74.3)	1 (0.9)	3 (6.5)	
Val30Met	46 (24.8%)	0 (0)	30 (27.5)	16 (34.8)	
Val14Leu	1 (0.5%)	1 (3.2)	0 (0)	0 (0)	
Hys88Arg	1 (0.5%)	1 (3.2)	0 (0)	0 (0)	
Glu89Gln	40 (21.5%)	1 (3.2)	31 (28.5)	8 (17.4)	
Ser23Asn	2 (1.2%)	1 (3.2)	1 (0.9)	0 (0)	



P<0.05 all'analisi post-hoc: † cardio vs misto; ‡ cardio vs neuro; \$ misto vs neuro

**Tabella 4a** : Aspetti elettrocardiografici dei pazienti ATTR con coinvolgimento cardiaco secondo la classificazione fenotipica

<b>ECG</b>	<b>Cardio (n = 31)</b>	<b>Misto (n = 109)</b>	<b>p</b>
<b>Fibrillazione atriale, n (%)</b>	9 (29)	3 (3)	<0.001
<b>Pacemaker, n (%)</b>	4 (13)	1 (1)	0.009
<b>Blocco atrioventricolare I grado, n (%)</b>	4 (13)	12 (11)	0.754
<b>QRS score totale (mV)</b>	123 [99–144]	102 [89–120]	0.003
<b>Bassi voltaggi QRS, n (%)</b>	11 (35)	25 (23)	0.158
<b>Rapporto voltaggi/massa</b>	0.9 [0.5–1.3]	1.1 [0.7–1.5]	0.08
<b>Blocco di branca destra, n (%)</b>	6 (19)	12 (11)	0.232
<b>Blocco di branca sinistra, n (%)</b>	3 (10)	5 (5)	0.375
<b>Emiblocco anterior sinistro, n (%)</b>	12 (39)	31 (28)	0.274
<b>Presenza di aspetto a pseudonecrosi, n (%)</b>	17 (55)	50 (46)	0.378
<b>“Pattern ischemico” (onde T negative), n (%)</b>	17 (55)	29 (27)	0.003
<b>Intervallo QTc (msec)</b>	486 [468–519]	431 [400–460]	<0.001
<b>ECG normale, n (%)</b>	0 (0)	11 (11)	0.122

**Tabella 4 b:** Aspetti ecocardiografici dei pazienti ATTR con coinvolgimento cardiaco secondo la classificazione fenotipica

<b>Ecocardiogramma</b>	<b>Cardio (n = 31)</b>	<b>Misto (n = 109)</b>	<b>P</b>
<b>Spessore setto interventricolare in diastole (mm)</b>	18 [16–20]	16 [13–18]	0.005
<b>Spessore parete posteriore in diastole (mm)</b>	16 [15–18]	14 [13–16]	0.001
<b>Diametro atrio sinistro (mm)</b>	47 [44–51]	42 [38–45]	<0.001
<b>Frazione d’ieiezione (%)</b>	45 [36–51]	58 [52–66]	<0.001
<b>Frazione d’ieiezione &lt;40%, n (%)</b>	10 (32)	7 (6)	<0.001
<b>Frazione d’ieiezione &lt;50%, n (%)</b>	18 (58)	17 (16)	<0.001
<b>Diametro telediastolico ventricolo sinistro (mm)</b>	49 [48–51]	42 [40–46]	<0.001
<b>Diametro telediastolico ventricolo sinistro &gt; 50 mm, n (%)</b>	7 (23)	10 (9)	0.06
<b>Diametro telesistolico ventricolo sinistro (mm)</b>	38 [37–40]	26 [25–30]	<0.001
<b>Deceleration time onda E (msec)</b>	160 [135–175]	176 [145–195]	0.03
<b>Pattern di riempimento restrittivo, n (%)</b>	12 (39)	27 (25)	0.127
<b>Versamento pericardico, n (%)</b>	17 (55)	25 (23)	0.001
<b>Massa ventricolare sinistra maschi (g/m2)</b>	225 [193–261]	185 [128–222]	<0.001
<b>Spessore setto interatriale (mm)</b>	9 [8–10]	9 [7–10]	0.18
<b>Ispessimento valvole atrio-ventricolari, n (%)</b>	19 (61)	43 (39)	0.031

**Tabella 5:** Dati clinici e di follow up dei pazienti sottoposti a trapianto isolato o combinato

	<b>Trapiantati (1993-2011)</b>
Num pz tot	41
Sesso m	30 (73.2%)
Fenotipo all'esordio	4 cardio 33 misto 4 neuro 0 senile
Mutazione	14 Val30Met (34%) 11 Glu89Gln (26.8%) 2 Ile68Leu (5%) Altro (8 mutaz)
Tipo di trapianto	27 fegato (66%) 13 combinati (+ 1 rene) 1 solo cuore
Età esordio sintomi (aa)	44 []
Età primo contatto (aa)	46 []
Durata malattia prima del trapianto (esordio -tx) (mesi)	49 []
Durata malattia prima del trapianto (diagnosi -tx) (mesi)	24 []
Età al trapianto (aa)	48 []
Andrade score al trapianto	0:1 1:20 2:16 3:4
Progressione post tx Cardio Neuro Disautonomia	7 pz (17.1%) 10 pz (24.4%) 15 pz (36.6%)
Durata follow up	31.1 mesi 2.6 aa
Morti al follow up	17 (41.4 %)
Morti per complicanze OLT	3 (18.75 %)
Morti per complicanze OLT-HT	1 (6.25%)
% sopravvivenza 1 aa	
% sopravvivenza 3 aa	

**Tabella 6 a:** caratteristiche cliniche ed elettrocardiografiche dei pazienti ATTR, SSA CMPI

ECG	ATTR con fenotipo cardio (n=31)	SSA (n=30)	CMPI negli anziani (n=30)	p
Età, aa	67 [60–73]	77 [72–80]	64 [61–67]	<0.001 ♦•
Maschi, n (%)	29 (94)	28 (93)	26 (87)	0.65
Fibrillazione atriale, n (%)	9 (29)	11 (37)	2 (7)	0.02 •
Pacemaker, n (%)	4 (13)	11 (37)	5 (17)	0.056
BAV I grado, n (%)	4 (13)	9 (30)	6 (20)	0.243
QRS score totale (mV)	123 [99–144]	122 [110–155]	155 [105–170]	0.023 ^•
Bassi voltaggi QRS, n (%)	11 (35)	10 (33)	2 (7)	0.016 ^•
Rapporto voltaggi/massa	0.9 [0.5–1.3]	0.9 [0.5–1.4]	1.1 [0.8–1.7]	0.398
BBdx, n (%)	6 (19)	6 (20)	4 (13)	0.755
BBsx, n (%)	3 (10)	9 (30)	2 (7)	0.03 •
EAS, n (%)	12 (39)	7 (23)	6 (20)	0.216
Ipertrofia ventricolare sinistra all'ECG, n (%)	2 (7)	3 (10)	17 (57)	<0.001 ^•
Presenza di pattern infartuale, n (%)	17 (55)	10 (33)	11 (37)	0.185
“Pattern ischemico” (onde T negative), n (%)	17 (55)	15 (50)	24 (80)	0.037 ^•
Intervallo QTc (msec)	486 [468–519]	472 [433– 499]	450 [429–469]	0.01 ^
ECG normale, n (%)	0 (0)	0 (0)	2 (7)	0.125

P<0.05 all'analisi post-hoc: ♦ ATTR vs SSA; ^ ATTR vs CMPI; • SSA vs CMPI

**Tabella 6 b:** caratteristiche ecocardiografiche dei pazienti ATTR, SSA CMPI

<b>Ecocardiogramma</b>	<b>ATTR con fenotipo cardio (n=31)</b>	<b>SSA (n=30)</b>	<b>CMPI nell'anziano (n=30)</b>	<b>p</b>
<b>Spessore del setto interventricolare in diastole (mm)</b>	18 [16–20]	18[16–22]	19[17–22]	0.23
<b>Spessore della parete posteriore in diastole (mm)</b>	16 [15–18]	17 [14–19]	14 [13–15]	<0.002 <sup>^</sup> •
<b>Ipertrofia ventricolare sinistra concentrica, n (%)</b>	30 (97)	29 (97)	15 (50)	0.007 <sup>^</sup> •
<b>Massa ventricolare sinistra* indicizzata tra i maschi, g/m<sup>2</sup> (media ± DS<sup>†</sup>)</b>	225 [193–261]	247 [204–288]	186 [176–200]	0.004 <sup>^</sup> •
<b>Diametro atriale sinistro (mm)</b>	47 [44–51]	51 [44–56]	51 [43–53]	0.302
<b>Frazione d'iezione del ventricolo sinistro (%)</b>	45 [36–51]	50 [35–58]	68 [67–76]	<0.001 <sup>^</sup> •
<b>Diametro telediastolico del ventricolo sinistro (mm)</b>	49 [48–51]	47 [43–50]	44 [40–47]	0.002 <sup>^</sup>
<b>Deceleration time onda E (msec)</b>	160 [135–175]	159 [125–180]	185 [180–215]	0.005 <sup>^</sup> •
<b>Pattern di riempimento restrittivo, n (%)</b>	12 (39)	9 (30)	4 (13)	0.079
<b>Versamento pericardico, n (%)</b>	17 (55)	13 (43)	1 (3)	<0.001 <sup>^</sup> •
<b>Ispessimento valvole atrio-ventricolari, n (%)</b>	19 (61)	15 (50)	1 (3)	<0.001 <sup>^</sup> •

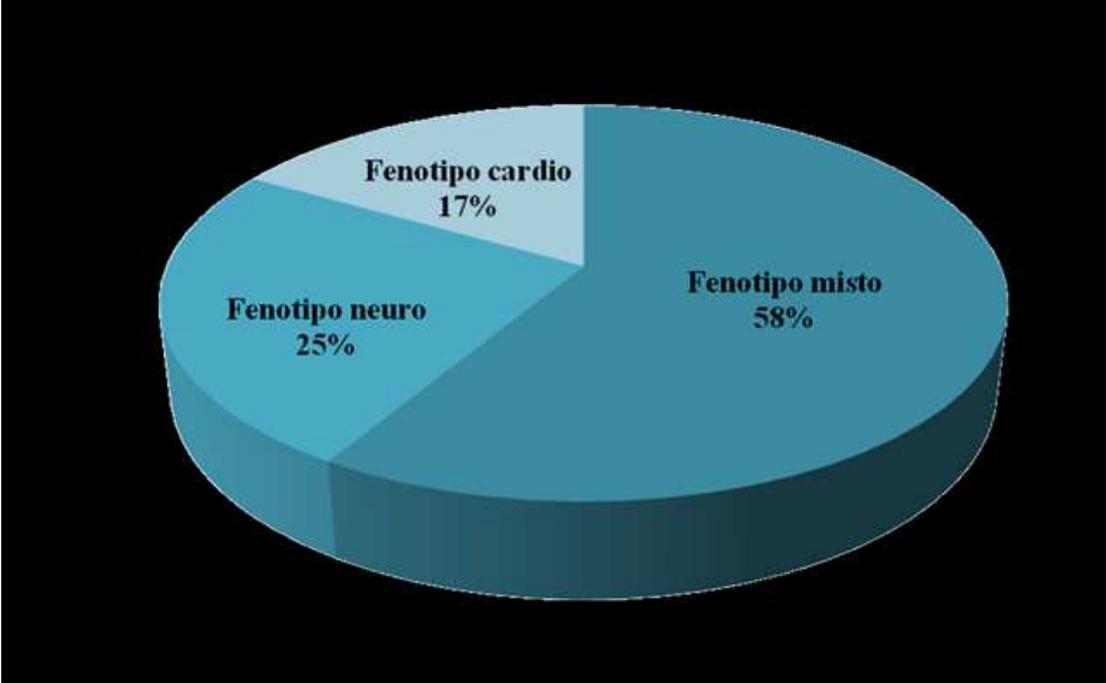
P<0.05 all'analisi post-hoc: ♦ ATTR vs SSA; ^ ATTR vs CMPI; • SSA vs CMPI

# GRAFICI

**Grafico 1: provenienza delle famiglie con ATTR analizzate nel nostro studio**



**Grafico 2:** Distribuzione dei fenotipi cardio, neuro e misto nella nostra popolazione di pazienti ATTR



**Grafico 3:** distribuzione fenotipica dei nostri 3 principali genotipi (Ile68Leu prevalente manifestazione cardio; Glu89Gln prevalente manifestazione mista; Val30Met principale rappresentante nelle forme neuro)

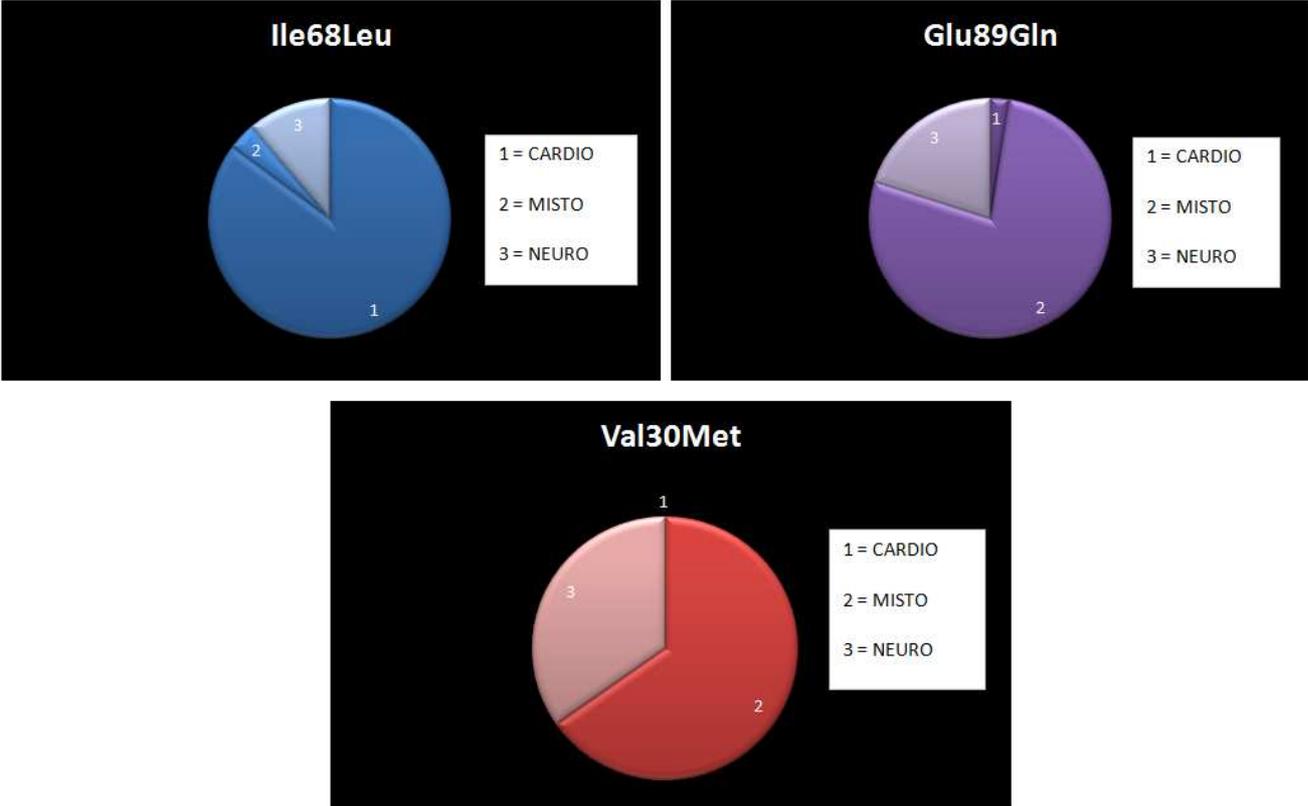
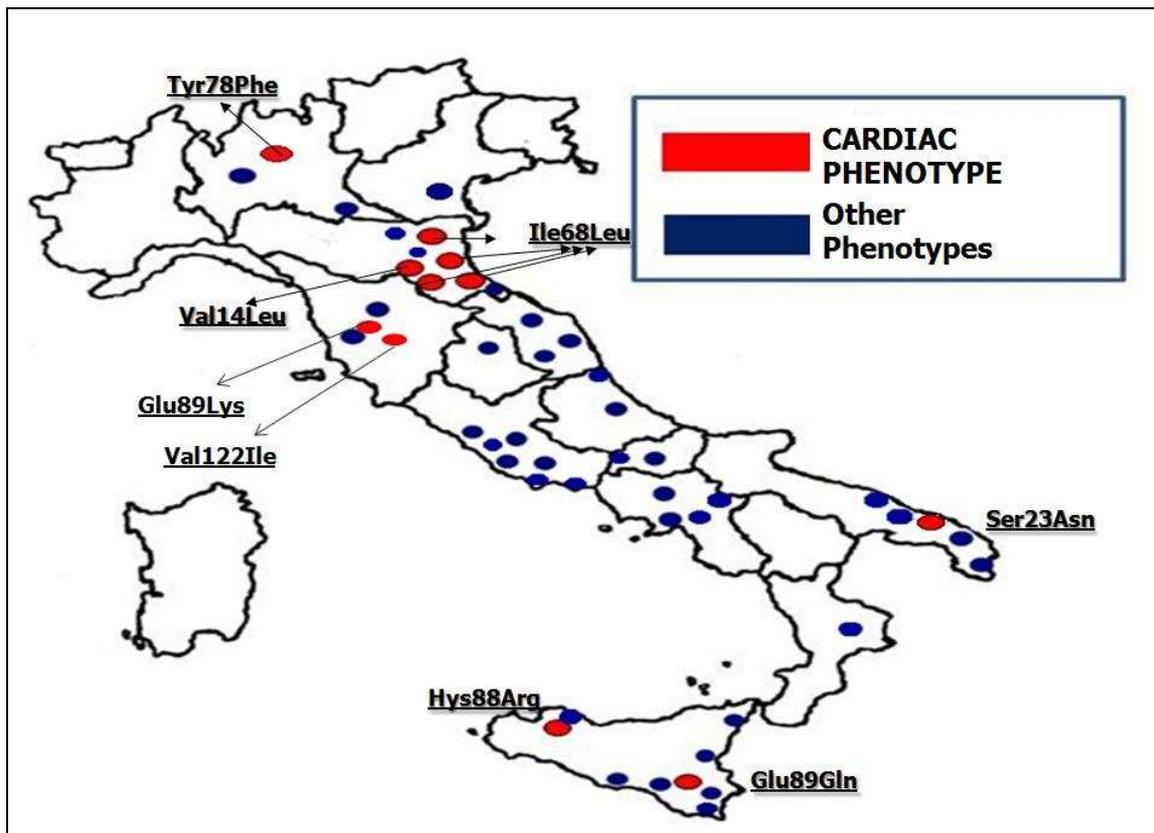
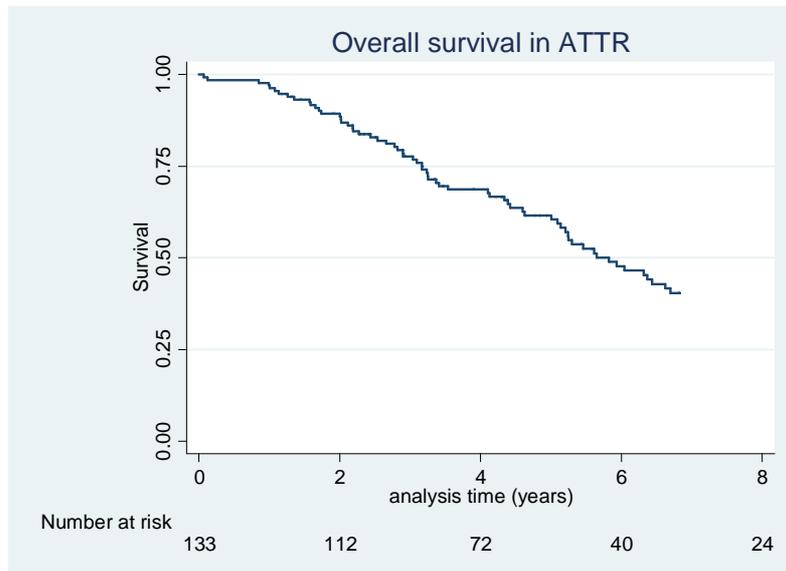


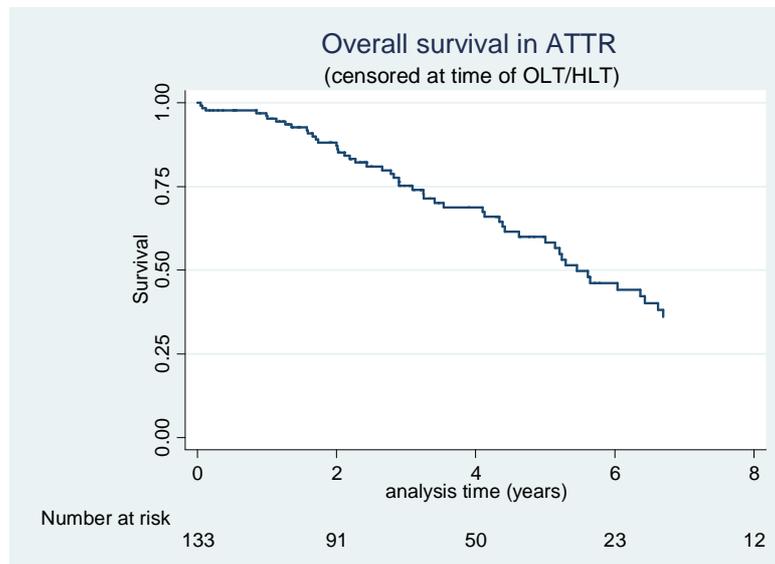
Grafico 4: Distribuzione geografica italiana dei pazienti con fenotipo cardiaco



**Grafico 5a e 5b.** Curve di Kaplan Meier (rispettivamente dati non censorizzati e censorizzati) per l'intera popolazione in studio

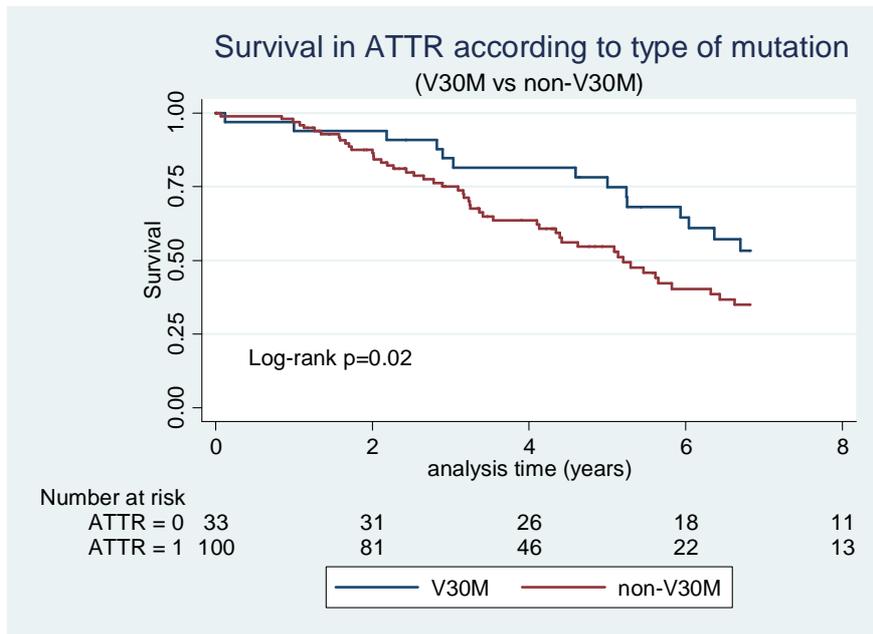


**A**

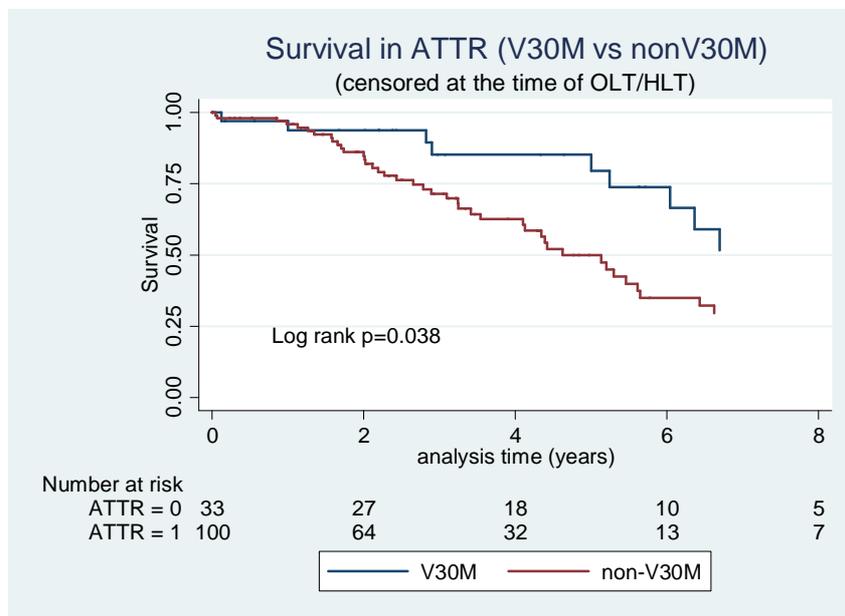


**B**

**Grafici 6a e 6b.** Curve di Kaplan Meier (rispettivamente dati non censorizzati e censorizzati) per l'intera popolazione in studio in relazione alla mutazione Val30Met vs nonVal30Met

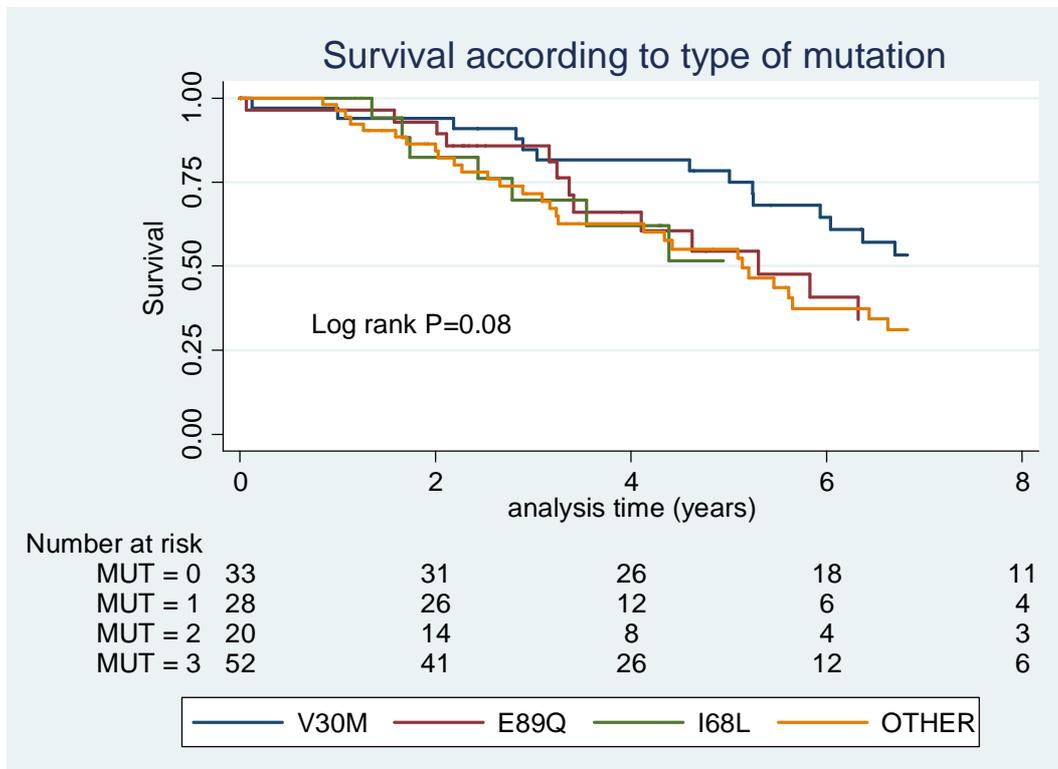


**A**

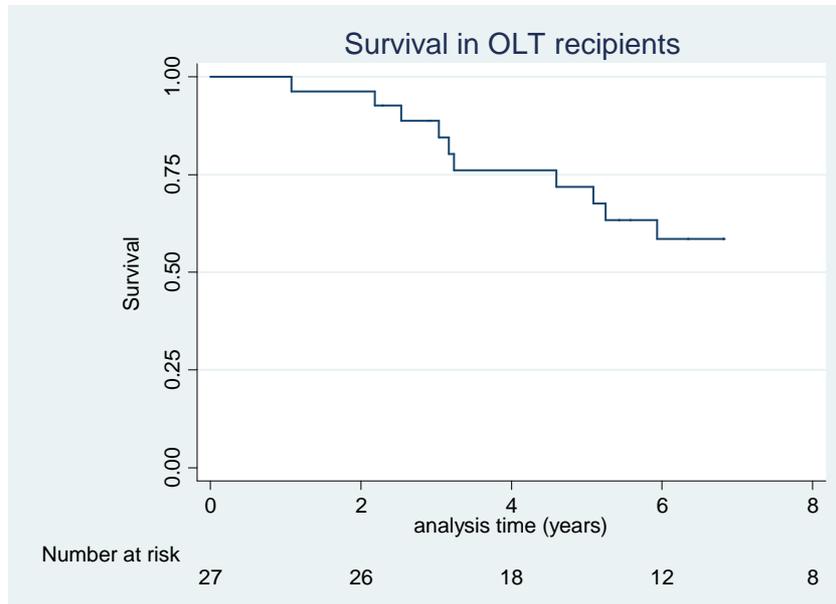


**B**

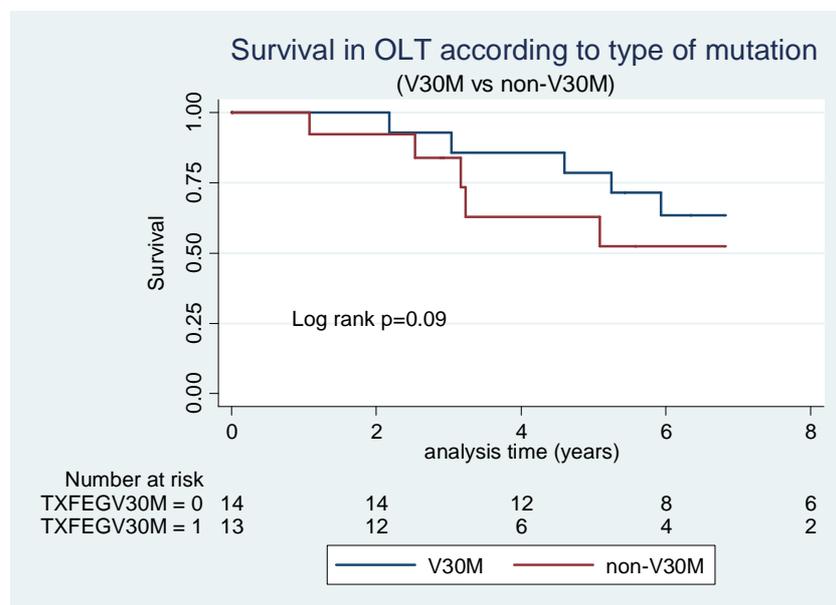
**Grafico 7.** Curve di Kaplan Meier per l'intera popolazione in studio in relazione alle mutazioni 4 mutazioni più rappresentate: Val30Met vs Glu89Gln vs Ile68Leu vs Altro



**Grafico 8.** Curve di Kaplan Meier per i pazienti sottoposti a trapianto di feato (27 su 41). Il grafico a esprime la sopravvivenza a carattere generale, il grafico b in relazione alla mutazione Val30Met vs nonVal30Met

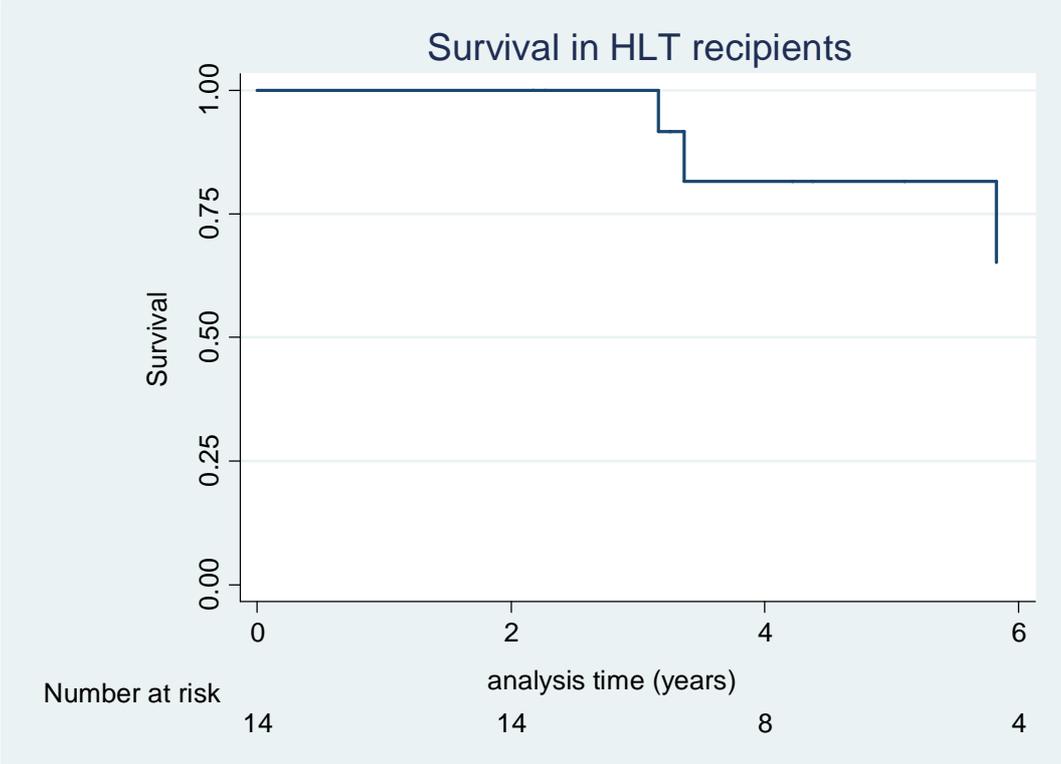


**A**



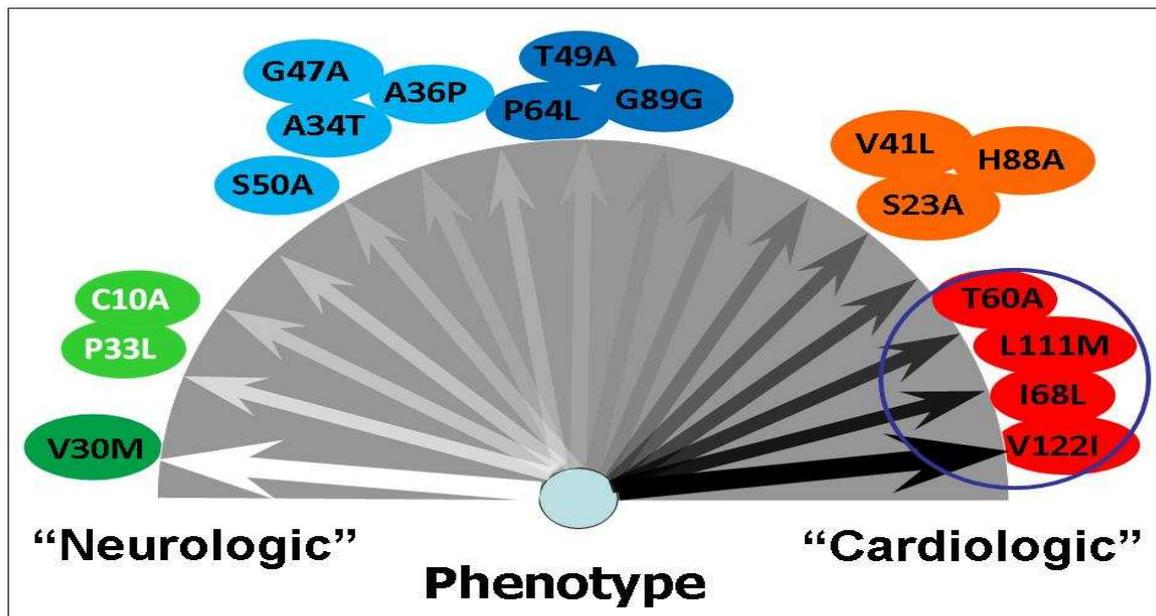
**B**

**Grafico 9.** Curva di Kaplan Meier per i pazienti sottoposti a trapianto combinato cuore-fegato (14 su 41).

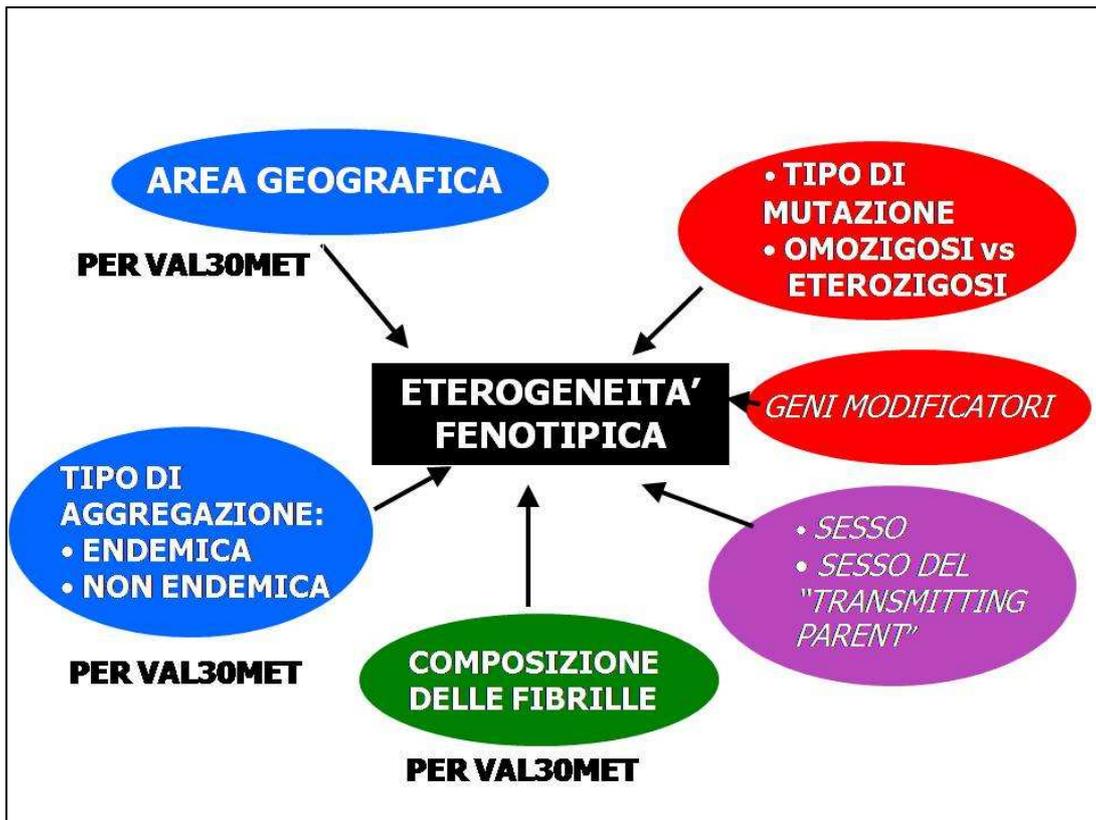


**Grafico 10: Possibile spettro delle correlazioni genotipo-fenotipo nell'ATTR.**

L'espressione fenotipica dell'ATTR varia ampiamente da forme con esclusivo coinvolgimento neurologico con un chiaro contesto familiare (mutazione Val30Met) a casi apparentemente sporadici con un predominante o esclusivo coinvolgimento cardiaco (mutazioni Thr60Ala, Leu111Met, Ile68Leu and Val122Ile). Tra questi ci sono diverse mutazioni TTR che si associano con grado variabile a coinvolgimento cardiologico o neurologico.



**Grafico 11: Principali determinanti dell' eterogeneità clinica nell'ATTR**



## BIBLIOGRAFIA

1. Giampaolo Merlini, Davide C.Seldin, and Morie A. Gertz. Amyloidosis: Pathogenesis and New Therapeutic Options. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1924-1933.
2. Giampaolo Merlini, and Vittorio Bellotti. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *NEJM* 2003; 349:583-96.
3. Falk RH, Dubrey S.W. Amyloid Heart disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2010;52:347–361.
4. Shah KB, Inoue Y, Mehra MR. Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch Intern Med* 2006;166:1805–1813.
5. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, et al. Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 2010;17:101–104.
6. 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;113:1807–1816.
7. 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;29:270–276.
8. Murtagh B, Hammil SC, Gertz MA, Kyle RA, Tajik AJ, Grogan M. Electrocardiographic findings in primary systemic amyloidosis and biopsy –proven cardiac involvement. *Am J Cardiol* 2005; 95: 535-7
9. Rapezzi C, Merlini G, Quarta CC, et al. Systemic Cardiac Amyloidoses. Disease Profiles and Clinical Courses of the 3 Main Types. *Circulation* 2009;120:1203–1212.

10. Garcia-Pavia P, Tomè-Esteban MT and Rapezzi C. Amyloidosis. Also a Heart Disease. *Rev Esp Cardiol* 2011; 64 (9): 797-808
11. Carroll JD, Gaasch WH, McAdam KP. Amyloid cardiomyopathy: characterization by a distinctive voltage/mass relation. *Am J Cardiol* 1982;49:9–13
12. Rahman JE, Helou EF, Gelzer-Bell R, Thompson RE, Kuo C, Rodriguez ER, Hare JM, Baughman KL, Kasper EK. Noninvasive diagnosis of biopsy-proven cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:410–5.
13. Quarta CC, Borghi C, Perlini S, Musca F, Salinaro F, Longhi S, Obici L, Villani C, Gagliardi C, Gallo P, Mingardi F, Biagini E, Branzi A, Merlini G, Rapezzi C. A simple voltage/mass index improves diagnosis of cardiac amyloidosis in patients with unexplained left ventricular "hypertrophy": an electrocardiographic and echocardiographic study of more than 500 patients. *Circulation* 2010;122(21):Abstract 16852
14. Selvanayagam JB, Hawkins PN, Paul B, Myerson SG. & Neubauer S. Evaluation and management of the cardiac amyloidoses. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2101–10.
15. Koyama J, Davidoff, R & Falk RH. Longitudinal myocardial velocity gradient derived from pulsed Doppler tissue imaging in AL amyloidosis: a sensitive indicator of systolic and diastolic dysfunction. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:36–44.
16. Maceira AM, Joshi J, Prasad SK, Moon JC, Perugini E, Harding I, Sheppard MN, Poole-Wilson PA, Hawkins PN, Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance in cardiac amyloidosis. *Circulation* 2005;111:186–93.
17. Glaudemans AW, Slart RH, Zeebregts CJ, Veltman NC, Tio RA, Hazenberg BP, Dierckx RA. Nuclear imaging in cardiac amyloidosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36:702–14.
18. Rapezzi C, Quarta CC, Guidalotti PL, Longhi S, Pettinato C, Leone O, Ferlini A, Salvi F, Gallo P, Gagliardi C, Branzi A. Usefulness and limitations of <sup>99m</sup>Tc-3,3-diphosphono-1,2-propanodicarboxylic acid

- scintigraphy in the aetiological diagnosis of amyloidotic cardiomyopathy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:470–8.
19. Rapezzi C, Quarta CC, Guidalotti PL, Pettinato C, Fanti S, Leone O, Ferlini A, Longhi S, Lorenzini M, Reggiani LB, Gagliardi C, Gallo P, Villani C, Salvi F. Role of (99m)Tc-DPD scintigraphy in diagnosis and prognosis of hereditary transthyretin-related cardiac amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011;4:659–70.
  20. Rapezzi C, Riva L, Quarta CC, Longhi S, Perugini E. I trabocchetti e gli inganni dell'amiloidosi cardiaca. *G Ital Cardiol* 2007; 8 (6): 377-380.
  21. Arbustini E, Verga L, Concardi M, Palladini G, Obici L, Merlini G. Amyloid: *J Protein Folding Disord* 2002; 9:108-114
  22. Dubrey SW, Hawkins PN, Falk RH. Amyloid diseases of the heart: assessment, diagnosis and referral. *Heart* 2011; 97: 75-84.
  23. Stoppini M, Obici L, Lavatelli F, et al. Proteomics in protein misfolding disease. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 627-635.
  24. Rapezzi C, Quarta CC, Riva L, et al. Transthyretin-related amyloidoses and the heart: a clinical overview. *Nat Rev Cardiol* 2010;7:398–408.
  25. Benson MD, Kincaid JC. The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle & Nerve* 2007; 36: 411-423.
  26. Connors LH, Lim A, Prokaeva T, Roskens VA, Costello CE. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants 2003. *Amyloid* 2003; 10:160-184
  27. Tsuzuki T, Mita S, Maeda S, Araki S, Shimada K. Structure of the Human Prealbumin Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260: 1224-1227
  28. Rapezzi C, Riva L, Quarta CC, Perugini E, Salvi F et al. Gender related risk of myocardial involvement in sistemi amyloidosis. *Amyloid* 2008; 15 (1): 40-48.
  29. Bittencourt PL, Couto CA, Clemente C, Farias AQ, Palácios SA, Mies S, Goldberg AC. Phenotypic expression of familial amyloid polyneuropathy in Brazil. *Eur J Neurol* 2005; 12: 289-293.

30. Hellman U, Alarcon F, Lundgren HE, Suhr OB, Bonaiti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid* 2008;15:181–6.
31. Bonaiti B, Alarcon F, Bonaiti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. Parent-of-origin effect in transthyretin related amyloid polyneuropathy. *Amyloid*. 2009;16:149–50.
32. Bergstrom J, Gustavsson A, Hellman U, Sletten K, Murphy C, Weiss D, Solomon A, Olofsson BO, Westermark P. Amyloid deposits in transthyretin-derived amyloidosis: cleaved transthyretin is associated with distinct amyloid morphology. *JPathol* 2005; 206: 224-232.
33. Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G. Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. *Neurology*. 2002; 58:1001-1007.
34. Suhr OB, Svendsen IH, Andersson R, Danielsson A, Holmgren G, Ramløv PJ. Hereditary transthyretin amyloidosis from a Scandinavian perspective. *J Intern Med* 2003; 254:225-235.
35. Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva MJ, Terazaki H, Suhr O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, Hata A. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Med Genet* 2004; 41:51-55.
36. Conceição I, De Carvalho M. Clinical variability in type I familial amyloid polyneuropathy (Val30Met): comparison between late- and early-onset cases in Portugal. *Muscle Nerve* 2007; 35:116-118.
37. Soares ML, Coelho T, Sousa A, Holmgren G, Saraiva MJ, Jastner DL, Buxbaum JN. Haplotypes and DNA sequence variation within and surrounding the transthyretin gene: genotype-phenotype correlations in familial amyloid polyneuropathy (V30M) in Portugal and Sweden. *Eur J of Human Genetics* 2004; 12:225-237.

38. Ando Y, Nakamura M, Araki S. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Arch Neurol* 2005; 62:1057-1062
39. Drugges U, Andersson R, Chizari F, Danielsson M, Halmgren G, Sandgren O, Sousa A. Familial amyloidotic polineuropathy in Sweden: a pedigree analysis. *J Med Genet* 1993; 30: 388-392.
40. Okamoto S, Zhao Y, Lindqvist P, Backman C, Ericzon BG, Wijayatunga P, Henein MY, Suhr OB. Development of cardiomyopathy after liver transplantation in Swedish hereditary transthyretin amyloidosis (ATTR) patients. *Amyloid* 2011; 18 (4): 200-205.
41. Gasperini RJ and Small DH Neurodegeneration in Familial Amyloidotic Polyneuropathy approved for publication in the *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*.
42. Suhr O, Danielsson A, Holmgren G, Steen L. Malnutrition and gastrointestinal dysfunction as prognostic factors for survival in familial amyloidotic polyneuropathy. *Journal of Internal Medicine* 1994; 235: 479-485.
43. Koike H, Misu K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Ando E, Yamamoto M, et al. Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early vs late-onset form. *Arch Neurol* 2002; 59: 1771-6.
44. Jacobson DR, Pastore R, Malendowics SPS et. al. Revised transthyretin Ile 122 allele frequency in African Americans. *Hum Genet* 1996; 98: 236-238.
45. Jacobson DR, Pastore RD, Yaghoubian R, Kane I, Gallo G, Buck FS, Buxbaum JN. Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans. *NEJM* 1997;336:466-473.
46. Jacobson D, Tagoe C, Schwartzbard A, Shah A, Koziol J, Buxbaum J. Relation of clinical, echocardiographic and electrocardiographic features of cardiac amyloidosis to the presence of the transthyretin V122I allele in older African-American men. *Am J Cardiol* 2011; 108:440-444.
47. Dharmarajan K, Maurer MS. Transthyretin Cardiac Amyloidoses in Older North Americans. *J Am Geriatr Soc* 2012.

48. Benson MD, Wallace MR, Tejada E, Baumann H and Burnestine P. Hereditary Amyloidosis: Description of a new American kindred with late onset cardiomyopathy. *Appalachian Amyloid. Arthritis and Rheumatism* 1987; (30) 2: 195-200.
49. Sattianayagam PT, Hahn AF, Whelan CJ, Gibbs SD, Pinney JH, Rowczenio D, Pflugfelder PW, Fox Z, Lachmann HJ, Wechalekar AD, Hawkins PN, Gillmore JD. Cardiac phenotype and clinical outcome of familial amyloid polyneuropathy associated with transthyretin alanine 60 variant. *Eur Heart J* 2011 [Epub ahead of print, doi:10.1093/eurheartj/ehr383].
50. Ranløv I, Alves IL, Ranløv PJ, Husby G, Costa PP, Saraiva MJ. A Danish kindred with familial amyloid cardiomyopathy revisited: identification of a mutant transthyretin-methionine111 variant in serum from patients and carriers. *Am J Med* 1992;93:3-8.
51. Almeida MR, Hesse A, Steinmetz A, Maisch B, Altland K, Linke RP, Gawinowics MA, Saraiva MJM. Transthyretin Leu 68 in a form of cardiac amyloidosis. *Basic Res Cardiol* 1991; 86: 567-571
52. Perfetto F, Cappelli F, Bergesio F. Asymptomatic homozygous gene carrier in a family with Ile68Leu ATTR amyloidosis: a new endemic region in northern Tuscany. Letter to the editor. *Journal of Cardiovascular Medicine* 2011; 2 (6): 450-451.
53. Atroshi I, Gummesson C, Johnsson R, Ornstein E, Ranstam J, Rosèn I. Prevalence of carpal tunnel syndrome in a general population. *JAMA* 1999; 282: 153-158.
54. Rosenzweig M, Landau H. Light chain (AL) amyloidosis: update on diagnosis and management. *J Hematol Oncol* 2011;4:47.
55. Herlenius G, Wilczek HE, Larsson M, Ericzon BG, Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. *Transplantation* 2004;77:64-71.

56. Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, et al. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP – met 30). *Clin Genet* 1991; 40: 24-26.
57. Sharma P, Perri RE, Sirven JE, Zeldenrust SR, Brandhagen DJ, Rosen CB, Douglas DD, Mulligan DC, Rakela J, Wiesner RH, Balan V. Outcome of liver transplantation for familial amyloidotic polineuropathy. *Liver Transplantation* 2003; 9: 1273-1280.
58. Plantè-Bordeneuve V, Said G. Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol* 2011; 10: 1086-97.
59. Stangou AJ, Hawkins PN, Heaton ND, et al. Progressive cardiac amyloidosis following liver transplantation for familial amyloid polineuropathy: implication for amyloid fibrillogenesis. *Transplantation* 1998; 66: 229-233.
60. Jonsen E, Suhr OB, Tashima K, Athlin E. Early liver transplantation is essential for familial amyloidotic polyneuropathy patients' quality of life. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 2001; 8: 52-57.
61. Arpesella G., Chiappini B, Marinelli G, Mikus PM, Dozza F, Pierangeli A, Magelli C, Salvi F, Leone O. Combined heart and liver transplantation for familial amyloidotic polineuropathy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003; 125: 1165-6.
62. Sekijima Y, Kelly WJ, Ikeda S. Pathogenesis of and Therapeutic Strategies to ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14: 3219-3230.
63. Coelho T, Maia L, Martins da Silva A, et al. Tafamidis (Fx-1006A): a first-in-class disease modifying therapy for transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 2010;74: A286
64. Cornwell GG III, Murdock WL, Kyle RA et al. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am J Med* 1983; 75: 618-23.
65. Belinda Ng, Connors LH, Davidoff R, Skinner M, Falk RH. Senile systemic amyloidosis presenting with heart failure. A comparison with

- light chain-associated amyloidosis. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1425-1429.
66. Ikeda S, Sekijima Y, Tojo K, Koyama J. Diagnostic value of abdominal wall fat pad biopsy in senile systemic amyloidosis. *Amyloid* 2011; 18 (4): 211-215.
  67. Kyle RA, Spittel PC, Gertz MA, et al. The premortem recognition of systemic senile amyloidosis with cardiac involvement. *Am J Med* 1996; 101:395-400.
  68. Dubrey SW, Burke MM, Hawkins PN, Banner NR. Cardiac transplantation for amyloid heart disease: the United Kingdom Experience. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1142-53.
  69. Ferlini A, Fini S, Salvi F, Patrosso MC, Vezzoni P, Forabosco A. Molecular strategies in genetic diagnosis of transthyretin-related hereditary amyloidosis. *FASEB J* 1992;6:2864-2866.
  70. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, Fermand JP, Hazenberg BP, Hawkins PN, Merlini G, Moreau P, Ronco P, Sanchorawala V, Sezer O, Solomon A, Gateau G. Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th international symposium on amyloid and amyloidosis. *Am J Hematol* 2005;79:319-328.
  71. Rapezzi C, Perugini E, Salvi F, Grigioni F, Riva L, Cooke RMT, Ferlini A, Rimessi P, Bacchi-Reggiani L, Ciliberti P, Pastorelli F, Leone O, Bartolomei I, Pinna A, Arpesella G, Branzi A. Phenotypic and genotypic heterogeneity in transthyretin-related cardiac amyloidosis: towards tailoring of therapeutic strategies? *Amyloid* 2006; 13 (3): 143-153.
  72. Surawicz B, Knilans TK. *Chou's electrocardiography in clinical practice*. Fifth edition 2001.
  73. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *Guidelines*

- update for the clinical application of echocardiography. *Circulation* 2003;108:1146-1162.
74. Garcia MJ, Thomas JD, Klein AL. New Doppler echocardiographic applications for the study of diastolic function, *J Am Coll Cardiol* 1998;32:865-875.
  75. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986;57:450-458.
  76. Saraiva M, Almeida M, Alves I, Moreira P, Gawinowics M, Costa P, Rauh S, Banzhoff A, Altland K. Molecular analysis of an acidic transthyretin Asn90 variant. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1004:1008.
  77. Yamamoto K, Hsu SP, Yoshida K, Ikeda S, Nakazato M, Shiomi K, Cheng SY, Furihata K, Ueno I, Yanagisawa N. Familial amyloid polyneuropathy in Taiwan: identification of transthyretin variant (Leu55-->Pro). *Muscle Nerve* 1994; 17:637-641.
  78. Plante-Bordeneuve V, Lalu T, Misrahi M, Reilly MM, Adams D, Lacroix C, Said G. Genotypic-phenotypic variations in a series of 65 patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 1998; 51:708-714.
  79. Mak CM, Kwong YL, Lam CW, Chan SC, Lo CM, Fan ST, Chang CM, Lau YK, U LS, Tam S. Identification of a novel TTR Gly67Glu mutant and the first case series of familial transthyretin amyloidosis in Hong Kong Chinese. *Amyloid* 2007;14:293-297.
  80. Connors LH, Prokaeva T, Lim A, Théberge R, Falk RH, Doros G, Berg A, Costello CE, O'Hara C, Seldin DC, Skinner M. Cardiac amyloidosis in African Americans: comparison of clinical and laboratory features of transthyretin V122I amyloidosis and immunoglobulin light chain amyloidosis. *Am Heart J* 2009; 158: 607-614.
  81. Almeida M, Ferlini A, Forabosco A, Gawinowics MA, Costa P, Salvi F. et al. Two transthyretin variants (TTR Ala-49 and TTR Gln 89) in two sicilian kindreds with hereditary amyloidosis. *Hum Mutation* 1992; 1: 211-215.

82. Tardiff JC. Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. *Heart Fail Rev* 2005;10:237-248.
83. Soares ML, Coelho T, Sousa A, Batalov S, Conceição I, Sales-Luís ML, Ritchie MD, Williams SM, Nievergelt CM, Schork NJ, Saraiva MJ, Buxbaum JN. Susceptibility and modifier genes in Portuguese transthyretin V30M amyloid polyneuropathy: complexity in a single-gene disease. *Hum Mol Genet* 2005;14:543-553.
84. Lewis J, Maron BJ. Elderly patients with hypertrophic cardiomyopathy: a subset with distinctive left ventricular morphology and progressive clinical course late in life. *JACC* 1989; 13: 36-45.
85. Dubrey SW, Davidoff R, Skinner M, Bergethon P, Lewis D, Falk RH. Progression of ventricular wall thickening after liver transplantation for familial amyloidosis. *Transplantation* 1997;64:74-80.
86. Ohya Y, Okamoto S, Tasaki M, Ueda M, Jono H, Obayashi K, Takeda K, Okajima H, Asonuma K, Hara R, Tanihara H, Ando Y and Inomata Y. Manifestations of Transthyretin-related familial amyloidotic polineuropathy: long term follow up of Japanese patients after liver transplantation. *Surg Today* 2011; 41: 1211-1218.
87. Hamour IM, Lachman HJ, Goodman HJB, Petrou M, Burke MM, Hawkins PN and Banner NR. Heart transplantation for homozygous familial transthyretin (TTR) V122I cardiac amyloidosis. *American Journal of transplantation* 2008; 8:1056-1059.
88. Varr BC, Liedtke M, Arai S, Lafayette RA, Schrier SL, Witteles RM. Heart transplantation and cardiac amyloidosis: approach to screening and novel management strategies. Article in press. *J Heart and Lung Transplant* 2011.
89. Sekijima Y, Dendle MA, Kelly JW. Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis. *Amyloid* 2006;13:236-49.

90. Ratner M. Spotlight focuses on protein-misfolding therapies. *Nat Biotechnol* 2009;27:874.
91. Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Register and Domino Transplant Register. Update on behalf of reporting members of the FAPWTR December 2010.