



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIO NEFRO TORACICHE

Ciclo 38

Settore Concorsuale: 06/D1 - MALATTIE DELL'APPARATO CARDIOVASCOLARE E
MALATTIE DELL'APPARATO RESPIRATORIO

Settore Scientifico Disciplinare: MED/11 - MALATTIE DELL'APPARATO CARDIOVASCOLARE

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELL'AMILOIDOSI TRANSTIRETINORELATA DA
MUTAZIONE P.ILE88LEU E SUA EVOLUZIONE NEL TEMPO.

Presentata da: Alberto Ponziani

Coordinatore Dottorato

Niccolò Daddi

Supervisore

Nazzareno Galiè

Co-supervisore

Carmine Pizzi

INDICE

• <u>ELENCO DEGLI ACRONIMI</u>	p.3
• <u>ABSTRACT</u>	p.5
• <u>INTRODUZIONE</u>	p.7
• <u>CONTRIBUTO SPERIMENTALE</u>	p.17
• <u>METODI</u>	p.19
• <u>ANALISI STATISTICA</u>	p.23
• <u>RISULTATI</u>	p.24
• <u>DISCUSSIONE</u>	p.28
• <u>CONCLUSIONI</u>	p.32
• <u>LIMITAZIONI</u>	p.32
• <u>TABELLE</u>	p.33
• <u>FIGURE</u>	p. 39
• <u>BIBLIOGRAFIA</u>	p. 43

ELENCO DEGLI ACRONIMI

AL: amiloidosi da catene leggere

ASO: oligonucleotide allele-specifico

ATTR: amiloidosi transtiretino-relata

ATTR-v: amiloidosi transtiretino-relata mutata

ATTR-wt: amiloidosi transtiretino-relata wild-type

CA: amiloidosi cardiaca

CA-TTR: amiloidosi cardiaca transtiretino-relata CKD-EPI: Chronic kidney disease epidemiology collaboration

CRISPR/CAS9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated protein 9

DPD: ^{99m}Tc -3,3-difosfono-1,2- acido propanodicarbossilico

ECG: elettrocardiogramma

ECV: Volume extracellulare

FE: Frazione di eiezione

GLS: Global Longitudinal Strain

HMDP: ^{99m}Tc -idrossimetilene- difosfonato

LGE: Late Gadolinium Enhancement

m-PND: modified Polineuropathy disability score

MACE: effetti avversi cardiovascolari

NFL: neurofilamenti a catena leggera

NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide

PCR: Polymerase Chain Reaction

PYP: ^{99m}Tc-pirofosfato

RFLP: polimorfismi dei frammenti di restrizione

SiRNA: small interfering RNA

SNA: sistema nervoso autonomo

TDI: tissue doppler imaging

TTR: transtiretina

ABSTRACT

Introduzione:

L'amiloidosi transtiretino-relata (ATTR) è una patologia sistemica causata dal deposito extracellulare di fibrille amiloidi derivate da transtiretina instabile, in forma wild-type (ATTR-wt) o mutata (ATTR-v). Tra le varianti genetiche responsabili della forma ATTR-v, la mutazione p.Ile88Leu è particolarmente diffusa nell'Italia centro-settentrionale, storicamente associata a un fenotipo principalmente cardiologico.

Obiettivi:

Scopo dello studio è stato valutare l'evoluzione fenotipica, clinica e prognostica dei pazienti con mutazione p.Ile88Leu, analizzando l'impatto temporale della diagnosi e delle terapie "disease modifying" sulla storia naturale della malattia.

Metodi:

È stato condotto uno studio osservazionale, retrospettivo e longitudinale su 90 pazienti con ATTR-v p.Ile88Leu afferiti al Policlinico S. Orsola-Malpighi tra il 2000 e il 2025. I pazienti sono stati stratificati in base all'anno di diagnosi (≤ 2017 vs > 2017) e al fenotipo di presentazione (cardiologico, neurologico o misto). Sono stati analizzati, sia nei pazienti in terapia disease modifying, sia nei pazienti non in terapia, predittori clinici e strumentali di eventi cardiovascolari maggiori (MACE) intesi come morte cardiovascolare, ricoveri per scompenso cardiaco e impianto Pacemaker nel follow-up.

Sono state eseguite analisi di sopravvivenza libera da MACE nei pazienti in terapia disease modifying, confrontati con i pazienti senza terapia.

Risultati:

Alla diagnosi, il 72% dei pazienti presentava un fenotipo cardiologico, il 3% neurologico e il 25% misto. Durante il follow-up mediano di 43 mesi, la percentuale dei pazienti con fenotipo misto (sia cardiologico che neurologico) saliva al 38%. Nei casi diagnosticati dopo il 2017, la malattia è stata identificata in fase più precoce, con minore ispessimento parietale e migliore funzione sistolica. Durante il follow-up (mediana 43 mesi), la terapia con stabilizzatori della transtiretina o silenziatori genici ha migliorato la sopravvivenza libera da MACE ($p=0,0001$). La frazione di eiezione ridotta e il pattern restrittivo transmitralico sono risultati predittori indipendenti di eventi avversi cardiovascolari nei pazienti in terapia disease modifying. Nei pazienti senza terapia i predittori di MACE sono risultati la frazione di eiezione ridotta e la velocità di filtrazione glomerulare ridotta.

Conclusioni:

La mutazione p.Ile88Leu mostra una variabilità fenotipica più ampia di quanto precedentemente descritto, con frequente coinvolgimento neurologico assieme a quello cardiologico. La diagnosi precoce e l'introduzione tempestiva di terapie eziologiche rappresentano fattori determinanti per modificare la prognosi e rallentare la progressione della malattia.

INTRODUZIONE

L'amiloidosi comprende un eterogeneo gruppo di patologie acquisite o ereditarie, localizzate o sistemiche, caratterizzate dalla deposizione extracellulare di proteine fibrillari insolubili che causano una conseguente disfunzione d'organo (1).

Esistono più di 35 proteine amiloidogeniche diverse, tutte con proprietà tintoriali e strutturali simili (2,3,4):

- una conformazione “ β pleated-sheet” alla spettroscopia a raggi infrarossi, principale fattore causa del potenziale amiloidogenico della proteina;
- un aspetto di sostanza amorfa al microscopio a luce normale (Figura 1, sinistra);
- la birifrangenza “apple green” con la colorazione Rosso Congo al microscopio a luce polarizzata
- fibrille di diametro variabile tra 7 e 10 nm, di amiloide e altri fattori additivi, quali i proteoglicani.

Il cuore, il fegato, il rene, i surreni, il sistema nervoso centrale e periferico, sono gli organi più colpiti dall'amiloidosi.

Tra le proteine responsabili delle diverse forme di amiloidosi vi è la transtiretina, responsabile dell'amiloidosi transtiretino-relata (ATTR) un tempo nota come prealbumina per il pattern di migrazione all'elettroforesi sierica.

La transtiretina viene prodotta principalmente dal fegato e in piccola parte dal plesso corioideo e dalla retina (2%) ed è deputata al trasporto di retinolo (vitamina A) e tiroxina nel plasma.(5)

La transtiretina è un tetramero costituito da 4 omo-monomeri, ogni monomero contiene 124-128 amminoacidi. La disfunzione patologica della proteina rende instabile la struttura e causa la dissociazione dei 4 monomeri che vanno incontro ad un fenomeno di misfolding con successiva aggregazione in fibrille insolubili determinanti danno tissutale locale nella sede di accumulo ⁽⁶⁾.

Esistono due forme di amiloidosi transtiretino-relata:

1)l'amiloidosi transtiretino-relata wild type (ATTR-wt), legata all'accumulo di transtiretina non mutata ⁽⁷⁾.

2)l'amiloidosi correlata all'accumulo di transtiretina mutata (ATTR-v), malattia ereditaria autosomica dominante con espressività variabile e penetranza incompleta ⁽⁸⁾;

L'amiloidosi transtiretino-relata wild wild type (ATTR-wt), un tempo chiamata amiloidosi sistemica senile, è causata dall'accumulo di transtiretina in assenza di

mutazioni note del gene TTR. questa forma colpisce prevalentemente il sesso maschile dopo i 60 anni anche se dati più recenti hanno dimostrato che casi di pazienti affetti sotto i 60 anni non sono rari, nel 20% dei casi sono colpite le donne (7,9,10). L'interessamento cardiaco è la principale espressione di questa forma e gli unici sintomi extra-cardiaci sono rappresentati dalla stenosi del canale lombare, dalla rottura del tendine del bicipite e dalla sindrome del tunnel carpale. (11,12).

Nei pazienti anziani la transtiretina, seppur strutturalmente normale, può diventare instabile e formare degli aggregati mal ripiegati che si aggregano e precipitano sottoforma di amiloide, nonostante la patogenesi non sia chiara, pare siano coinvolti fattori post-trascrizionali (13)

Nella maggior parte dei casi, l'accumulo di transtiretina wild-type a livello cardiaco è lieve e non clinicamente significativo (14,15,16), in genere non di entità tale da condizionarne la funzione. In una minoranza di casi vi è un accumulo massivo responsabile dell'insorgenza di scompenso cardiaco nella maggior parte a frazione di eiezione preservata e/ o di bradi/tachiaritmie. Quando sintomatica si definisce un quadro di amiloidosi cardiaca (CA) che si caratterizza per un incremento degli spessori parietali, aumentata rigidità strutturale che causa un rapido incremento delle pressioni intraventricolari con fisiopatologia restrittiva in associazione ad un solo lieve incremento dei volumi di riempimento (17).

Studi autoptici hanno provato la prevalenza della CA-TTRwt nella popolazione generale, dimostrando che circa il 25% degli individui di età superiore a 80 anni presenta depositi di amiloide transtiretino-correlata nei tessuti cardiaci, ma non necessariamente questi depositi costituiscono una cardiomiopatia ⁽¹⁸⁾.

L'amiloidosi correlata alla transtiretina-mutata (ATTR-v) è la forma più frequente di amiloidosi sistemica familiare ed è una malattia multisistemica, autosomica dominante a penetranza incompleta. Il gene della transtiretina (TTR) è localizzato nel cromosoma 18, consta di 7000 paia di basi, e presenta 4 esoni e 3 introni. Il gene venne sequenziato nel 1974 da Kanda et al ⁽¹⁹⁾.

Sono descritte più di 150 diverse mutazioni puntiformi del gene della transtiretina ⁽²⁰⁾. La maggior parte di queste sono mutazioni puntiformi-missenso che rendono il tetramero della transtiretina più instabile, facilitando la sua tendenza a scindersi in monomeri e successivamente a formare e a depositarsi sotto forma di fibrille di amiloide nei tessuti ⁽²¹⁾.

Non tutte le mutazioni note a carico del gene della transtiretina sono patologiche, esistono anche alcune rare mutazioni che tendono a stabilizzare il tetramero della transtiretina e risultano quindi essere protettive verso l'insorgenza di amiloidosi, ad esempio la mutazione p.Thr139.Met^(22,23,24).

Nell' ATTR-v gli organi più colpiti sono il cuore e il sistema nervoso periferico, ma in misura minore possono essere interessati anche l'occhio, il sistema nervoso centrale, il sistema gastrointestinale e i reni ⁽⁵⁾.

A livello del Sistema Nervoso Periferico l'amiloidosi familiare transtiretino-relata si presenta con una polineuropatia periferica da disfunzione delle fibre periferiche inizialmente a carico degli arti inferiori che poi si estende alle estremità prossimali e che raggiunge lo stadio terminale in 10-15 anni. Le principali manifestazioni cliniche precoci sono parestesie e disestesie con disturbi della sensibilità termica e dolorifica. Solo tardivamente c'è un interessamento della componente motoria che, nelle fasi terminali, può essere responsabile di gravi disabilità. Spesso c'è anche il coinvolgimento del sistema nervoso autonomico (SNA) che causa disidrosi, alterazione della motilità intestinale, ipotensione ortostatica e incontinenza ^(25,26).

Quando coinvolge il cuore l'ATTR-v determina un quadro di amiloidosi cardiaca del tutto sovrapponibile a quello dell'ATTR-wt

Il tipo di presentazione fenotipica (prevalentemente cardiologico o neurologico) è strettamente correlata al tipo di mutazione, ma dipende anche dall'area geografica da cui proviene il paziente, dal sesso del paziente e del genitore che trasmette la mutazione, dal tipo di fibrille presenti nei depositi ⁽⁵⁾

Esistono dunque mutazioni con un profilo fenotipico esclusivamente neurologico (p.Val50Met, p.Ser70Arg, p.Ala117Ser.), altre con un profilo di espressione quasi esclusivamente cardiologico (p.Ile88Leu, p.Val142Ile, p.Thr80Ala e p.Leu131Met) ed esistono infine mutazioni con un fenotipo di presentazione misto ^(27,28,29).

L'amiloidosi ATTR-v è una malattia dall'andamento progressivo e la sopravvivenza varia tra i 2 e 15 anni dopo l'insorgenza dei sintomi neurologici, e tra i 2 e i 5 anni tra i pazienti affetti da cardiopatia amiloidotica ⁽⁵⁾

DIAGNOSI AMILOIDOSI CARDIACA TTR.

Per porre diagnosi di amiloidosi cardiaca transtiretino-relata (CA-ATTR) gli strumenti principali sono esami di primo livello come l'elettrocardiogramma (ECG), l'ecocardiogramma e in particolare la lettura integrata delle due metodiche, e gli esami ematochimici. L'iter diagnostico prevede poi l'esecuzione di indagini di secondo livello, tra cui la scintigrafia ossea e la risonanza magnetica e, in casi selezionati, la biopsia endomiocardica.

In particolare, per l'amiloidosi cardiaca la diagnosi può essere eseguita in maniera sia invasiva che non invasiva. La diagnosi invasive si ottiene con la biopsia endomiocardica che dimostra direttamente il deposito di sostanza amiloide che presenta la tipica birifrangenza "apple-green" con la colorazione rosso congo sotto il microscopio a luce polarizzata. La diagnosi di amiloidosi cardiaca è anche confermata quando una biopsia extracardiaca dimostra la presenza di depositi di sostanza amiloide con associate tipici aspetti di imaging a all'ecocardiogramma o alla risonanza magnetica cardiaca in assenza di altre cause alternative di ispessimento delle pareti del ventricolo ⁽³⁰⁾.

L'immunoistochimica e la microscopia elettronica possono essere utili per identificare la proteina che forma la sostanza amiloide, ma con queste metodiche la diagnosi viene raggiunta solo nel 60% dei casi a causa di una possibile contaminazione dei tessuti, impedimento sterico alla diffusione degli anticorpi o per epitopi alterati che non si legano agli anticorpi o per la reale coesistenza di differenti precursori di sostanza amiloide. Il gold standard per porre diagnosi sul tipo di amiloide è la spettrometria di massa che presenta una specificità più alta. (31,32).

La diagnosi non invasiva di amiloidosi cardiaca transtiretino-relata può essere raggiunta nel contesto di tipici aspetti all'ecocardiogramma e MR suggestivi per amiloidosi cardiac quando la scintigrafia ossea con ^{99m}Tc-pirofosfato (PYP), ^{99m}Tc-3,3-difosfono-1,2- acido propanodicarbossilico (DPD) o ^{99m}Tc-idrossimetilene-difosfonato (HMDP) mostra un Grado 2 o 3 di uptake miocardico del tracciante osseo e una gammopatia monoclonale è esclusa dai seguenti test : dosaggio nel sangue delle catene leggere libere , elettroforesi sierica e urinaria con immunofissazione sierica e urinaria . La scintigrafia ossea con uno score di captazione cardiaca >1 ha una sensibilità del 99% nell'identificare l'amilidosi cardiaca ATTR e l'assenza di discrasia plasmacellulare esclude l'amilidosi AL (amiloidosi da catene leggere) nel 99% dei casi, quindi la combinazione del grado 2-3 alla scintigrafia ossea e la negatività agli esami di laboratorio per AL raggiunge una specificità di quasi Il 100% per ATTR quando sospettata (33). Una volta che la diagnosi di CA- ATTR è confermata, un test genetico deve essere eseguito per differenziare tra ATTR-v and ATTR-wt.

DIAGNOSI POLINERUOPATIA AMILOIDE DA TTR

Per quanto riguarda la diagnosi di neuropatia periferica ATTR-v, essa è essenzialmente clinica, in pazienti con sintomatologia neuropatica associati a studi neurofisiologici ⁽³⁴⁾. Attualmente sono in sviluppo metodiche per una diagnosi precoce come la biopsia cutanea che può documentare la presenza di iniziale danno assonale e iniziale deposito di sostanza amiloide per porre diagnosi precoce di amiloidosi assieme al dosaggio di biomarker assonali come i neurofilamenti a catena leggera (NFL), ⁽³⁵⁻³⁸⁾ tuttavia queste metodiche non presentano protocolli standardizzati e non sono disponibili in tutte le regioni ⁽³⁹⁾. Per confermare la diagnosi è necessaria la dimostrazione di mutazione patologica a carico del gene della transtiretina.

TERAPIA AMILOIDOSI TRANSTIRETINO-RELATA

Nell'ATTR lo scopo del trattamento è interrompere il processo di formazione di sostanza amiloide questo può essere ottenuto sostanzialmente in 3 modi:

- soppressione della sintesi di transtiretina da parte del fegato;

A questo scopo in passato il trapianto di fegato era unico trattamento disponibile⁽⁴⁰⁾, attualmente sono disponibili specifici silenziatori genetici come il Patisiran, Vutrisiran (SiRNA) eplontersen e inoserten (oligonucleotidi anti-senso) per i quali sono stati eseguiti studi clinici di fase 3 che hanno dimostrato la loro efficacia sia sulla neuropatia amiloidotica familiare che sull'amiloidosi cardiaca⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾. Attualmente queste terapie sono prescrittibili in Italia solo nell'ATTR-v quando vi è un fenotipo neurologico o misto (cardiologico e neurologico contemporaneamente)

Sono in corso fine studi clinici di fase 3 per terapia di genetic editing con il Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated protein 9 (CRISPR-Cas9) che hanno mostrato risultati molto promettenti in studi di fase I ⁽⁴⁵⁾.

-stabilizzazione dei tetrameri di transtiretina;

impedendo quindi la scissione in monomeri e la formazione di sostanza amiloide in questo gruppo di terapia, la medicina più utilizzata Tafamidis⁽⁴⁶⁾, che è attualmente l'unica molecola approvata per il trattamento della CA-TTR in Italia. In passato era stato studiato il Diflusinal, un farmaco antinfiammatorio non steroideo che in studi di fase 2 sulla neuropatia amiloidotica familiare aveva dimostrato di stabilizzare la transtiretina circolante, ma che non è approvato per tale trattamento (prescrizione off-label) a causa delle problematiche gastrointestinali e renali legate a una terapia a lungo termine ⁽⁴⁷⁾.

Recentemente è stato valutato in studio di fase 3 come stabilizzatore l'acoramidis che mima la mutazione P.Thr139Met. citata in precedenza per rendere più stabile il

tetramero e che si è mostrato efficace nel ridurre gli eventi cardiovascolari in pazienti affetti da CA-TTR ⁽⁴⁸⁾

-eliminazione delle fibrille di amiloide già formate nei tessuti;

per questa strategia di trattamento sono attualmente in studio anticorpi specifici in studi di fase 1-2⁽⁴⁹⁾

In passato sono stati valutati anche in studi sperimentali per la rimozione di fibrille amiloide dai tessuti anche la doxiciclina e l'acido taurourodeossicolico⁽⁵⁰⁾, ma attualmente non sono approvati per trattamento dell'amiloidosi transtiretino-relata.

Oltre alla terapia disease modifying, quando vi è l'amiloidosi cardiaca è importante la terapia di supporto dello scompenso cardiaco, ottimizzando la terapia diuretica, tenendo conto della fisiopatologia restrittiva nelle forme più avanzate di coinvolgimento cardiaco da parte dell'amiloidosi cardiaca. Recenti studi osservazionali hanno dimostrato l'efficacia delle gliflozine nel ridurre gli eventi cardiovascolari nel sottogruppo di pazienti con amiloidosi cardiaca ⁽⁵¹⁾.

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

Tra le diverse mutazioni responsabili della A-TTR-v vi è la mutazione p.Ile88Leu.

Tale mutazione risulta essere endemica nel centro-nord Italia (soprattutto nell'area degli Appennini tra Toscana ed Emilia-Romagna) ed era stata descritta inizialmente come una mutazione responsabile di una forma di amiloidosi a fenotipo esclusivamente cardiologico ⁽⁵²⁾.

Nel 2018 Gagliardi et al, avevano descritto il profilo fenotipico dell'amiloidosi familiare da mutazione di pIle88Leu, in particolare vennero studiati 67 pazienti con ATTR-v da mutazione p.Ile88Leu, i quali vennero confrontati con una coorte di paziente affetti da ATTR-wt, i risultati furono che l'ATTR-v secondaria a mutazione di p.Ile88Leu dava nella maggior parte dei pazienti un quadro di amiloidosi cardiaca con una presentazione molto simile alla ATTR-wt, con una età mediana di insorgenza di malattia più bassa rispetto ai pazienti con ATTR-wt(71 vs 78). Solo una piccola percentuale di pazienti con ATTR-V aveva un profilo fenotipico misto con un quadro

di polineuropatia associato all'amiloidosi cardiaca (8 pazienti su 67, 12%) e solo 3 pazienti avevano un quadro di polineuropatia senza interessamento cardiaco clinicamente rilevante associato.⁽⁵³⁾

Successivamente nel 2021 Pastorelli et al. Valutarono 29 pazienti con CATTR-v da mutazione p.Ile88Leu e identificarono in 20 pazienti un fenotipo misto con concomitante polineuropatia sintomatica nella metà dei casi. I pazienti con un fenotipo misto furono confrontati con i 9 pazienti con un fenotipo esclusivamente cardiologico e risultavano avere dopo una mediana di Follow-up di 30 mesi una probabilità più alta di eventi cardiovascolari rispetto ai pazienti con un fenotipo esclusivamente cardiologico anche in assenza di una progressione della neuropatia ⁽⁵⁴⁾. Questi dati più recenti indicavano una percentuale più alta di polineuropatia nei pazienti affetti da ATTR- v secondaria a mutazione p.Ile88Leu.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare come si è modificata nel tempo la manifestazione fenotipica della mutazione pIle88Leu sia dal punto di vista clinico che strumentale, che prognostico. Per una maggiore analisi dei suddetti dati abbiamo confrontato le caratteristiche dei pazienti dividendoli in due gruppi a seconda della data di diagnosi di malattia: ≤ 2017 e > 2017 , è stata scelta questa data, perché la data di validazione dell'algoritmo di Gilmore che ha permesso di porre diagnosi non invasiva di amiloidosi cardiaca. Inoltre, sono stati analizzati gli effetti della terapia disease modifying su questa coorte specifica di pazienti.

METODI

CLINICAL SETTING

Abbiamo quindi condotto uno studio osservazionale, retrospettivo monocentrico e longitudinale su una coorte di pazienti affetti da ATTR-V secondaria a mutazione p.Ile88Leu e afferiti presso L'Ambulatorio Amiloidosi del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi dal 2000 al 2025.

I criteri di inclusione erano: età ≥ 18 anni, la presenza di mutazione accertata del gene TTR del tipo p.Ile88Leu e la presenza di malattia ATTR relata con fenotipo cardiologico, neurologico o misto (sia cardiologico che neurologico).

La collezione dei dati è avvenuta attraverso l'utilizzo di un unico database anonimizzato.

Abbiamo valutato le caratteristiche cliniche, laboratoristiche e strumentali dei pazienti affetti da amiloidosi transtiretino-relata secondaria alla mutazione p.Ile88Leu. Successivamente la coorte di pazienti è stata suddivisa in due gruppi in base alla data della diagnosi (≤ 2017 e >2017) valutando le differenze delle caratteristiche al baseline. Inoltre abbiamo valutato l'andamento clinico della malattia nel tempo per valutare i predittori di eventi avversi cardiovascolari maggiori (MACE), intesi come morte cardiovascolare, ricovero per scompenso cardiaco e impianto di pacemaker al follow-up, e analizzato come la terapia farmacologica specifica abbia modificato la storia naturale della malattia

DEFINIZIONE E CRITERI DIAGNOSTICI.

ANALISI GENETICA

L'analisi genetica TTR per constatare la mutazione puntiforme p.Ile88Leu veniva eseguita su sangue o su tampone salivare. Il DNA è stato isolato dai leucociti del sangue periferico o dalle cellule epitelio buccale e le mutazioni puntiformi sono state studiate

con la tecnica di ibridizzazione con oligonucleotide allele-specifico (ASO) e mediante analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione (RFLP) di DNA amplificato, ottenuto con l'utilizzo della "Polymerase Chain Reaction" (PCR).

DIAGNOSI DI ATTR.

Nei pazienti con mutazione accertata p.Ile88Leu del gene della transtiretina, la diagnosi di ATTR-v veniva eseguita nelle seguenti modalità:

-Fenotipo Cardiologico: spessore del setto interventricolare di 12 mm all'ecocardiogramma in assenza di altre cause responsabili di ipertrofia, associato ad altri reperti ecocardiografici come i granular sparkling, l'ispessimento delle valvole cardiache e la presenza di versamento pericardico o aumento dei valori di T1 mapping e del volume extracellulare (ECV) alla Risonanza Magnetica cardiaca in presenza o meno di Late Gadolinium Enhancement (LGE). L'analisi di amiloidosi cardiaca doveva essere poi confermata o in maniera invasiva tramite la biopsia con riscontro di sostanza amiloide secondaria a transtiretina o in maniera non invasiva attraverso l'utilizzo di scintigrafia ossea con DPD con riscontro di positività di uptake miocardico con visual score 2-3 e assenza di una componente monoclonale agli esami ematici, come da pratica clinica. In questi pazienti non è segnalata né documentata manifestazione neurologica della malattia.

-Fenotipo Neurologico:

la presenza di difficoltà nella marcia, disturbi sensitivi o sintomi neurologici rilevanti (sazietà precoce, incontinenza e disturbi autonomici) valutati da un neurologo esperto. Quando indicati venivano eseguiti studi neurofisiologici come test di conduzione dei nervi, elettromiografia e studi dei riflessi cardiovascolari. La severità della neuropatia veniva valutata con la classificazione modified Polineuropathy disability score (mPND). In questi pazienti non vi erano criteri diagnostici per amiloidosi cardiaca

-Fenotipo misto:

pazienti affetti sia da amiloidosi cardiaca che da polineuropatia.

ELETTROCARDIOGRAMMA ED ECOCARDIOGRAMMA.

Per tutte le misure elettrocardiografiche si è fatto riferimento alle definizioni standard (54). Le valutazioni e misure ecocardiografiche sono avvenute in accordo con le raccomandazioni della Società Europea di Ecocardiografia (55,56,57).

SCINTIGRAFIA OSSEA

L'esame consisteva nel somministrare ai soggetti 740MBq di ^{99m}Tc -DPD/HMDP/PYP endovena e nella rilevazioni delle successive immagini acquisite con gammacamera a doppia testata di rilevazione (Siemens). Gli studi total body sono stati eseguiti 5 minuti dopo(precoci) e 3 ore dopo (tardivi) l'iniezione del radiocomposto.

Sulle immagini tardive è stato valutato il grado di uptake miocardico del radiofarmaco tramite un visual score da 0 a 3:

- SCORE 0: captazione cardiaca assente e normale captazione ossea
- SCORE 1: lieve captazione cardiaca, inferiore a quella ossea
- SCORE 2: moderata captazione cardiaca accompagnata da attenuata captazione ossea
- SCORE 3: intensa captazione cardiaca con tenue/assente captazione ossea

ANALISI STATISTICA

Le variabili quantitative sono state riportate con mediane e range interquantili e sono state comparate utilizzando il test U di Mann-Whitney.

Le variabili categoriche sono state riportate come frequenze e percentuali e sono state comparate con il test di Chi-Quadro e il Test esatto di Fisher.

Sono state eseguiti analisi di Cox per costruire univariate e, dove raggiunta significatività statistica sono state incorporate nelle multivariate per valutare i predittori

di eventi avversi maggiori cardiovascolari e sono state eseguite analisi di sopravvivenza con le curve di Kaplan-Meyer.

Le analisi sono state eseguite con il software STATA 18.0.

RISULTATI

La popolazione di studio è costituita da 90 pazienti affetti da ATTR-v con mutazione p.Ile88Leu in eterozigosi. 83(92%) pazienti erano originari dell'Emilia Romagna, 2 erano originari delle Marche (2%) e 5 dalla Toscana (6%). L'età mediana alla diagnosi era 73,57 anni(66,52-78,42) e 72 pazienti erano di sesso maschile (80%)Di questi 90 pazienti al baseline 65 (72%)presentavano un fenotipo cardiologico della malattia, 3 (3%) un fenotipo neurologico e 22 pazienti (25%) presentavano un fenotipo misto (sia neurologico che cardiologico) (**Figura 1a**).

Dell'intera coorte di pazienti 70 pazienti (78%) erano giunti alla diagnosi di ATTR-v in seguito a problematiche cardiologiche, 12(14%) avevano ricevuto una diagnosi di ATTR-v in seguito a un riscontro incidentale, i restanti 8 pazienti (12%) avevano

ricevuto una diagnosi nell'ambito di screening familiare su una mutazione p-ile88Leu già nota (**Figura 2**). Durante una mediana di Follow-up mediano di 43 mesi [25,9-64,9] in alcuni pazienti si è assistiti a un cambiamento del profilo di malattia con passaggio da un fenotipo cardio a un fenotipo misto, e in un paziente da un fenotipo neuro a un fenotipo cardio, per cui al termine del follow-up 54 pazienti presentavano un profilo cardiologico puro (60%) 2 pazienti un profilo neurologico e 34(38%) pazienti un profilo misto(**Figura 1b**).

Durante il follow-up di 38 pazienti hanno iniziato una terapia disease modifying con Tafamidis 20/61 mg(18 pazienti) , Vutrisiran(16 pazienti), Patisiran (3 pazienti) e Inotersen (1 paziente), 2 pazienti invece sono stati sottoposti a trapianto combinato fegato-cuore.

44 pazienti sono deceduti durante il follow-up (49%) (43 per cause cardiologiche).

36 pazienti (40%) sono stati ricoverati per un episodio di scompenso cardiaco e 11 pazienti(12%) sono stati sottoposti a impianto di Pacemaker.

Abbiamo suddiviso la popolazione in due sottogruppi divisi in base all' anno della diagnosi di ATTR-v p.Ile88Leu ≤ 2017 (40 pazienti) e > 2017 (50 pazienti). Nella popolazione di ATTR diagnosticate dopo il 2017 la durata della malattia dall'insorgenza della sintomatologia alla diagnosi era significativamente più bassa (4 mesi vs 14,5 p<. 0,0014). mentre l'età alla diagnosi era più avanzata (75,2 VS 70,09 p:0,0283). Al baseline i pazienti del gruppo > 2017 avevano valori significativamente più bassi N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) (1072 vs 3526 p:0,006);l'elettrocardiogramma mostrava valori significativamente minori

dell'intervallo QTc (447 vs 474 ms $p:0,003$) e vi era una percentuale minore di di onde T negative (10, 21% vs 17 44%).

Dal punto di vista ecocardiografico i pazienti con diagnosi di ATTR-v dopo il 2017 avevano dei valori significativamente più bassi di spessore sia del setto interventricolare che della parete posteriore (16 VS 17,5 $p:0,02$ 14,4 vs 15,8 $p:0,02$), inoltre la frazione di eiezione del ventricolo sinistro era significativamente più alta (56% vs 51 %, $p: 0,03$) e vi era una percentuale più bassa di versamento pericardico (12 pazienti vs 21 , $p:0,007$). In tutti e due i gruppi di pazienti i valori di Global Longitudinal Strain (GLS) erano ridotti (9,8 %vs 11,6%, $p:0,03$). Dal punto di vista della sintomatologia neurologica riferita non c'era una differenza statisticamente significativa sia sul tipo di sintomi riferiti dai pazienti sia sul grado di disabilità neurologica valutato con lo score mPND.

Nelle successive analisi abbiamo valutato gli effetti della terapia farmacologica disease modifying specifica per l'amiloidosi da transtiretina.

. Le curve di Kaplan-Meyer mostrano che nei pazienti in terapia farmacologica ($n=38$) la sopravvivenza libera da effetti avversi maggiori cardiovascolari (MACE) fosse maggiore rispetto ai pazienti senza terapia eziologica specifica ($n=52$, $p=0,0001$, **figura 3**).

Abbiamo inoltre eseguito analisi univariate e multivariate per valutare i i predittori di MACE fra i pazienti affetti da ATTR-v ($n=52$) che non hanno mai assunto terapia disease modifying. La frazione d'eiezione del ventricolo sinistro all'ecocardiogramma

(HR: 0,3 ic: 0,3-0,2 p:0,006) e filtrato glomerulare calcolato con la formula Chronic kidney disease epidemiology collaboration (CKD-EPI)(HR:0,97, IC: 0,95-0,99, p:0,004) erano entrambi predittori indipendenti di MACE (**tabella 4**). Stratificando la sopravvivenza libera da MACE in funzione della frazione d'eiezione del ventricolo sinistro ($> 40\%$ vs $\leq 40\%$) le curve di Kaplan-Meyer mostrano una sopravvivenza libera da eventi significativamente migliore nei pazienti con valori maggiori di frazione d'eiezione del ventricolo sinistro, durante un follow up mediano di 47 mesi (p=0,002 **Figura 4**).

Nel sottogruppo di pazienti in terapia farmacologica specifica disease modifying abbiamo valutato quali fossero i predittori di MACE con analisi univariate e multivariate. Anche in questo sottogruppo di pazienti la frazione d'eiezione del ventricolo sinistro $<40\%$ (HR:0,24, ic: 0,06-0,99, p: 0,048) e la presenza di pattern transmitralico restrittivo (HR:7,34 IC 1,5-35, p:0,01) sono risultati predittori indipendenti di MACE (**tabella 5**). Inoltre, i pazienti con una FE $> 40\%$ avevano una sopravvivenza libera da MACE maggiore durante il follow-Up rispetto alla controparte con una frazione di eiezione ridotta (**Figura 5**).

DISCUSSIONE

Il presente studio, unico in letteratura nella numerosità del campione analizzato, ha permesso di concludere che nei pazienti affetti da ATTR-v da mutazione p.Ile88Leu:

- Il fenotipo di manifestazione alla presentazione non è solamente ed esclusivamente cardiologico;
- La diagnosi di malattia negli ultimi anni, dovuta alla maggior conoscenza della patologia stessa, e alla possibilità di fare diagnosi non invasiva, intercetta il paziente in una fase precoce della malattia;
- La frazione d'eiezione del ventricolo sinistro ridotta rappresenta un determinante importante di prognosi e tale parametro ha una sua rilevanza prognostica anche quando il paziente inizia un trattamento eziologico.

La popolazione analizzata ha mostrato come nel 3 % dei pazienti la manifestazione di malattia sia a prevalente interessamento neurologico e nel 25% dei pazienti a espressione mista (cardiologica e neurologica). Questo dato è diverso da quanto emerge in letteratura ⁽⁵³⁾. Infatti, nel lavoro di Gagliardi et al. la percentuale di pazienti con fenotipo misto di malattia era del 12%.

Inoltre, durante il follow-up 13% dei pazienti convertono il fenotipo in misto sviluppando una manifestazione cardiologica o neurologica della malattia. Questo cambio di “paradigma” ha diverse possibili cause: in primis una maggiore conoscenza delle possibili manifestazioni della malattia. Infatti, la cultura cardiologica e

neurologica ha appreso negli anni tutte le possibili “sfumature” con cui si può manifestare la malattia. Inoltre, le tecniche diagnostiche si sono molto raffinate e permettono di identificare il paziente prima ancora che la malattia sia eccessivamente manifesta e quindi difficilmente trattabile. Per capire se nel corso degli anni la diagnosi è avvenuta in maniera precoce abbiamo deciso di suddividere la popolazione in base alla data della diagnosi (≤ 2017 vs > 2017). E' stata scelta questa data perché nel 2017 avveniva la pubblicazione dell'algoritmo diagnostico proposto da Gilmore et al ⁽³³⁾ che ha permesso di raggiungere la diagnosi non invasiva di amiloidosi cardiaca da transtiretina attraverso l'utilizzo della scintigrafia total body con tracciante osseo ed esami volti alla ricerca di clone plasmacellulare.

Analizzando le due sottopopolazioni si evince che la durata di malattia (ossia il periodo compreso dall'insorgenza dei sintomi fino alla diagnosi di malattia) era significativamente più bassa nel sottogruppo di pazienti con diagnosi successiva al 2017. Tale risultato trova la sua spiegazione nella possibilità di eseguire una diagnosi non invasiva attraverso l'algoritmo sopracitato che ha facilitato e ridotto i tempi di diagnosi.

La durata di malattia significativamente più bassa si riflette anche nelle differenze riscontrate a livello strumentale. L'ecocardiogramma infatti mostrava, nel gruppo con diagnosi successiva al 2017, spessori parietali significativamente ridotti, frazione di eiezione del ventricolo sinistro più alta e una percentuale significativamente più bassa di versamento pericardico. Tutti questi dati sono compatibili, infatti, con una diagnosi più precoce di malattia. Inoltre, i valori di Global Longitudinal Strain risultavano ridotti

in tutti i due gruppi. Tale parametro come noto ⁽⁵⁹⁾ rappresenta un indicatore precoce di malattia anche quando i parametri ecocardiografici risultano ancora nella norma, Tali valori nella nostra popolazione analizzata risultano patologici in tutti e due i gruppi mostrando come la patologia sia comunque già presente anche se intercettata precocemente.

Curiosamente, nel gruppo con diagnosi di ATTR-v successiva al 2017, l'età mediana era significativamente più alta (75,21vs 70,09 anni). Questo dato è conforme con le attuali indicazioni e i dati più recenti di letteratura che suggeriscono di eseguire l'analisi genetica del gene della transtiretina per ricerca mutazioni anche nei pazienti di età più avanzata. Nello studio di Porcari et al sono stati analizzati infatti 2029 pazienti con diagnosi di amiloidosi cardiaca da ATTR con età superiore a 70 anni ed è dimostrato come il 20% di questi pazienti erano in realtà portatori di mutazione a carico del gene della transtiretina,⁽⁶⁰⁾. Tale atteggiamento diagnostico è stato sempre ben chiaro e praticato nel nostro Centro.

La maggior attenzione alla diagnosi precoce è anche conseguenza della maggior possibilità di trattamenti eziologici a disposizione ⁽⁶¹⁾. Come atteso, confrontando i pazienti che hanno intrapreso una terapia eziologica durante follow-up con i pazienti che non hanno ricevuto tale trattamento le curve di sopravvivenza sono a favore dei pazienti trattati.

Andando poi a ricercare i possibili predittori di MACE nel gruppo di pazienti che non ha intrapreso terapia eziologica, risulta che la frazione di eiezione del ventricolo sinistro ridotta (<40%) e valori ridotti di filtrato glomerulare rappresentino predittori

indipendenti di eventi. Questi dati sono concordi con quanto noto in letteratura, già infatti nel 2019, Lane et Al avevano studiato 1034 pazienti con amiloidosi transtiretino-relata considerando sia le forme mutate che wild-type, in tale studio sia la frazione di eiezione ridotta che il filtrato ridotto erano importanti predittori di mortalità nei pazienti con amiloidosi cardiaca (62).

Seppure in un gruppo limitato di pazienti, per un periodo di follow-up più limitato (38 pazienti, 12 MACE in follow-up di 30 mesi) con terapia differenti iniziate in tempi dalla diagnosi diverse, abbiamo cercato di identificare i predittori di MACE nei pazienti in terapia eziologica al fine di identificare possibili elementi da attenzione alla diagnosi. Anche in questa analisi, la frazione di eiezione del ventricolo sinistro ridotta ($FEVSn < 40\%$) risultava essere predittore indipendente di MACE così come la presenza di pattern restrittivo.

Questi dati riflettono l'importanza di eseguire una diagnosi precoce e di intraprendere di conseguenza una terapia disease modifying prima che si instauri un quadro di severa disfunzione sisto-diastolica all'ecocardiogramma. Infatti, le attuali terapie come noto sono efficaci nel bloccare o ridurre l'ulteriore di sostanza amiloide nei tessuti e pertanto devono essere iniziate prima che il quadro di interessamento cardiologico sia troppo compromesso.

CONCLUSIONI

In questo studio monocentrico abbiamo analizzato le caratteristiche fenotipiche dei pazienti con ATTR-v p.Ile88Leu. Tale mutazione, storicamente riconosciuta ad esclusivo fenotipo cardiologico, in una era di diagnosi precoce si associa anche a manifestazione neurologica associata.

L'avvento delle terapie disease modifying ha cambiato la storia naturale della malattia, ma tale trattamento deve essere iniziata prima dell'insorgenza di una severa disfunzione sistole/diastolica del ventricolo sinistro all'ecocardiogramma

LIMITAZIONI

La principale limitazione dello studio è data dalla natura monocentrica retrospettiva e osservazionale. Inoltre, dato il lungo periodo di osservazione, alcuni parametri di Strain e di valori di tissue doppler imaging (TDI) per l'inizio di utilizzo di queste metodiche in un'era più moderna. Per lo stesso motivo non era disponibile il valore di NT-proBNP di tutti i pazienti.

TABELLE

Tabella 1: Tabella baseline caratteristiche cliniche e laboratoristiche popolazione divisa in base ad anno diagnosi ≤ 2017 >2017

	Totale	pIle88Leu $\leq$ 2017	pIle88leu >2017	p-value
Sesso maschile	72 (80%)	32 (80%)	40(80%)	1,0000
Età alla diagnosi	73,57[66,52-78,42]	70,09[64,74-77,29]	75,21 [69-79]	0,0283
Durata malattia	6 [3-24]	14,5[4-29,5]	4[2-12]	0,0014
PAS	120[110-135]	120[110-131]	120 [110-135]	0,6
PAD	75[70-80]	76 [70-80]	70 [70-80]	0,5
FC	72[64-80]	75[64-81]	71[64-77]	0,3
creatinina	1,1 [0,9-1,3]	1,16[1-1,27]	1[0,9-1,23]	0,08
VFG	63[52-76]	60[49-76]	65[53-77]	0,38
NT-proBNP	1417[515-3560]	3526[1354-7669] (13 di 40)	1072[198-2365](22 di 50)	0,006
CTS	57(63,3%)	26(65%)	31(62%)	0,76
CTS bilaterale	48 (53,3%)	24(60%)	24 (48%)	0,257
AF	26(29%)	13(32,5%)	13(26%)	0,499
TIA/Ictus	6(6,7%)	4(10%)	2(4%)	0,3
HF Ricovero	38(42%)	18 (45%)	20 (40%)	0,633
Sincope	8(9%)	4(10%)	4 (8%)	0,7
Pregresso infarto/rivascolarizzazione coronaria	11(12,2%)	2(5%)	9(18%)	0,06

NYHA				0,549
I	23(25,56%)	9(22,5%)	14(28%)	
II	53(58,59%)	23(57,5%)	30(60%)	
III	14(15,56%)	8 (20%)	6(12%)	
IV	0	0	0	
mPND				0,543
0	70(77,78%)	32(80%)	38(76%)	
1	17(18,19%)	6(15%)	11(22%)	
2	3(3,33%)	2 (5%)	1(2%)	
3	0	0	0	

Tabella 2: Tabella caratteristiche baseline ECG popolazione divisa in base ad anni diagnosi 2017

	totale	pIle88Leu <2017	pIle88Leu >2017	p-value
Ritmo sinusale	69 (77,5%)	29(72,5%)	40 (81,6%)	0,5
BAV I grado	33(39,29%)	14(36,84%)	19(41,30%)	0,677
Bassi voltaggi (per)	25(28,4%)	20(25,26%)	15(31,25%)	0,565
Pseudonecrosi	62(71,26%)	31(79,49%)	31(64,58%)	0,127
Onde T negative	27(31,76%)	17(44,74%)	10(21,28%)	0,021
PR (ms)	190[160-220]	190 [170-220]	188 [160-220]	0,85
QRS(ms)	104 [90-132]	110,5 [94-138]	96 [90-120]	0,06
QTc(B)(ms)	457[430-480,5]	474,5 [447-497]	447,5 [429,5-461,5]	0,003

Tabella 3: Tabella con caratteristiche Ecocardiogramma Baseline popolazione divisa in base ad anni diagnosi 2017

	Totale	pIle88Leu < 2017	p.Ile88Leu>2017	p-score
SIV (mm)	16,5[15-18]	17,5[15,5-20]	16[15-18]	0,02
PP (mm)	15 [13-17]	16 [14-18]	15 [16-18]	0,02
Spessore medio (mm)	16[14,5-17,5]	16,5[15-18,25]	15,25[13,75-17]	0,0048
DTD (mm)	46[42-49]	48 [46-50]	44[41-48]	0,0024
FE %	55 [49-63]	51 [44,5-60]	60[51-63]	0,03
VTD (ml)	95,5[70-108]	97[80-121]	93[68-104]	0,39
VTD/i (ml/m2)	50 [44-56]	47,5 [44-61]	50 [44-54]	0,83
LAVi (ml/m2)	43,2 (66 di 90)	42[37-53] (23 di 40)	41 [32-49] (43 di 50)	0,27
Dec Time (ms)	183[148-218]	175[140-218]	195[160-230]	0,33
Onda E (cm/sec)	83,5[69,5-101]	84[74-96]	83[68-104]	0,61
Onda A (cm/sec)	57,5[39-75]	51[32-70]	62[45-80]	0,123
Onda S settale (cm/sec)	4,5[4-6] (42 di 90)	3,5 [3-5] (6 di 40)	5[4-6] (36 di 50)	0,16
Onda S laterale	5[5-6] (21 di 90)	5 [4-6] (3 di 40)	5 [5-6] (18 di 50)	0,8
E' settale (cm/sec)	4 [3-6] (55 di 90)	4 [4-5] (17 di 40)	4,5 [3-6] (38 di 50)	0,48
e/e'	18,5[14-25] (55 di 90)	20,5[14-5-29,5] (17 di 40)	17,5[14-23] (38 di 50)	0,3
PAPS	36,5[28-47]	37 [28-47]	36 [27-47]	0,46
TAPSE (mm)	18[16-21]	18[16-21]	18[15-21]	0,84

Pattern restrittivo	35 (40%)	18(45%)	17 (37,17%)	0,403
Versamento pericardico	33(37,1%)	21(52,5%)	12(24,5%)	0,007
GLS (%)	-10,9[(-8,1)-(-13,2)] (41 di 90)	-11,6 [(-8,5)- (13,5)] (27 di 40)	-9,8 [(-7,4)-(-12,8)] (14 di 50)	0,03

Tabella 4: Determinanti di MACE fra i pazienti che non intrapreso trattamento eziologico durante il fup (N=52).

	UNIVARIATA			MULTIVARIATA		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Età alla diagnosi	1.01	0.97 – 1.06	0.56			
Sesso maschile	0.74	0.30 – 1.79	0.50			
Durata della malattia	0.99	0.99 – 1.01	0.38			
Filtrato glomerulare	0.97	0.95 – 0.99	0.001	0.97	0.95 – 0.99	0.004
NT- proBNP	1.01	0.99 – 1.01	0.17			
NYHA classe > 2	3.55	1.63 – 7.75	0.001			
Spessore medio della parete del LV	1.16	1.02 – 1.32	0.03			
LVEF $\geq$ 40%	0.26	0.11 – 0.62	0.002	0.30	0.13 – 0.72	0.006
Volume atriale sinistro indicizzato	1.01	0.98 – 1.04	0.60			
Pattern transmitralico restrittivo	1.47	0.77 – 2.82	0.24			
Versamento pericardico	1.27	0.66 – 2.41	0.47			
GLS	1.02	0.89 – 1.16	0.75			
Fibrillazione atriale	1.49	0.79 – 2.83	0.21			
Durata QRS	1.01	0.99 – 1.01	0.71			
Bassi voltaggi del QRS	1.29	0.64 – 2.60	0.47			
Pseudonecrosi	1.03	0.48 – 2.19	0.94			
Qtc	1.01	0.99 – 1.01	0.22			

Tabella 5: Determinanti di MACE fra i pazienti che non intrapreso trattamento eziologico durante il fup (N=38).

	UNIVARIATA			MULTIVARIATA		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Età alla diagnosi	1.03	0.95 – 1.11	0.51			
Sesso maschile	0.58	0.13 – 2.67	0.49			
Durata della malattia	1.01	0.98 – 1.02	0.57			
Filtrato glomerulare	0.96	0.92 – 1.01	0.07			
NT- proBNP	1.01	0.99 – 1.01	0.71			
Spessore medio della parete del LV	1.20	0.95 – 1.52	0.12			
LVEF $\geq$ 40%	0.27	0.07 – 0.99	0.048	0.24	0.06 – 0.99	0.048
Volume atriale sinistro indicizzato	1.03	0.99 – 1.07	0.09			
Pattern transmitralico restrittivo	9.65	2.11 – 44.20	0.004	7.34	1.57 – 34.59	0.01
Versamento pericardico	1.32	0.42 – 4.09	0.64			
GLS	1.15	0.92 – 1.42	0.22			
Fibrillazione atriale	1.60	0.34 – 7.59	0.55			
Durata QRS	1.01	0.98 – 1.03	0.50			
Bassi voltaggi del QRS	2.05	0.59 – 7.08	0.26			
Pseudonecrosi	8.25	1.06 – 64.49	0.04			
Qtc	1.02	1.01 – 1.04	0.04			

FIGURE

Figura 1a: Profilo fenotipico baseline pazienti affetti da A-TTRv p.Ile88Leu

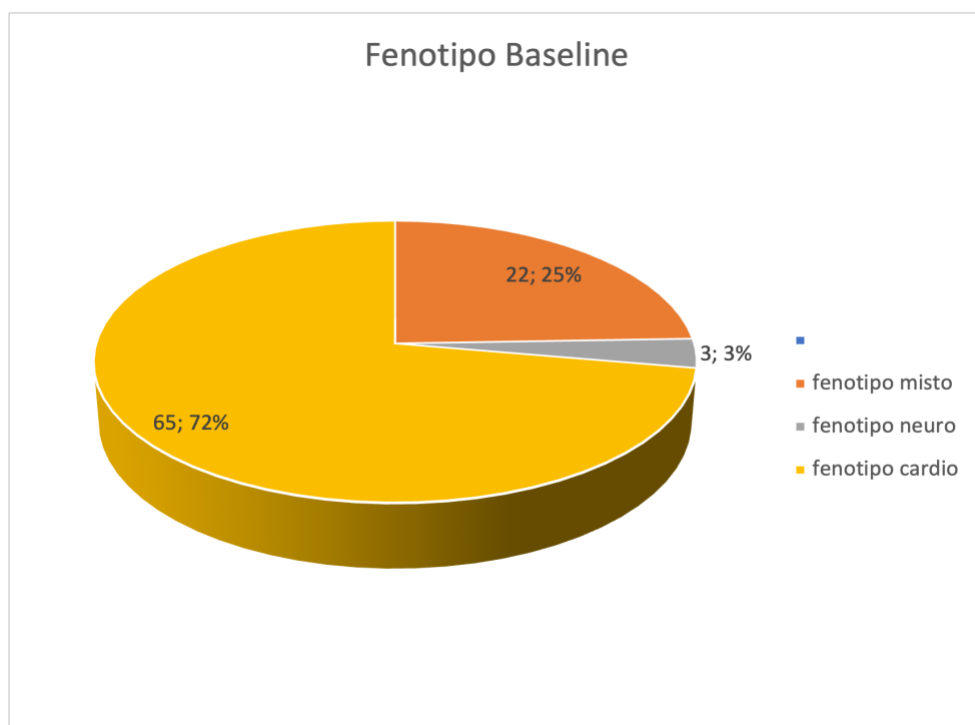


Figura 1b: evoluzione profilo fenotipico durante follow-up pazienti affetti daATTR-v p.Ile88Leu.

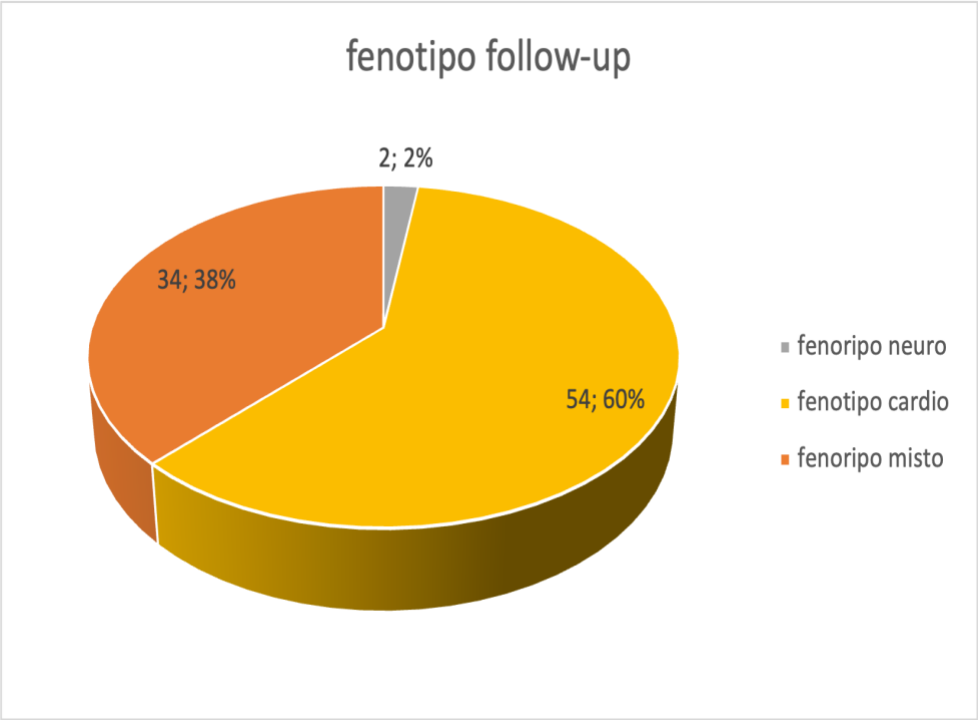


Figura 2: Pathway diagnostico pazienti affetti da ATTR p.Ile88Leu.

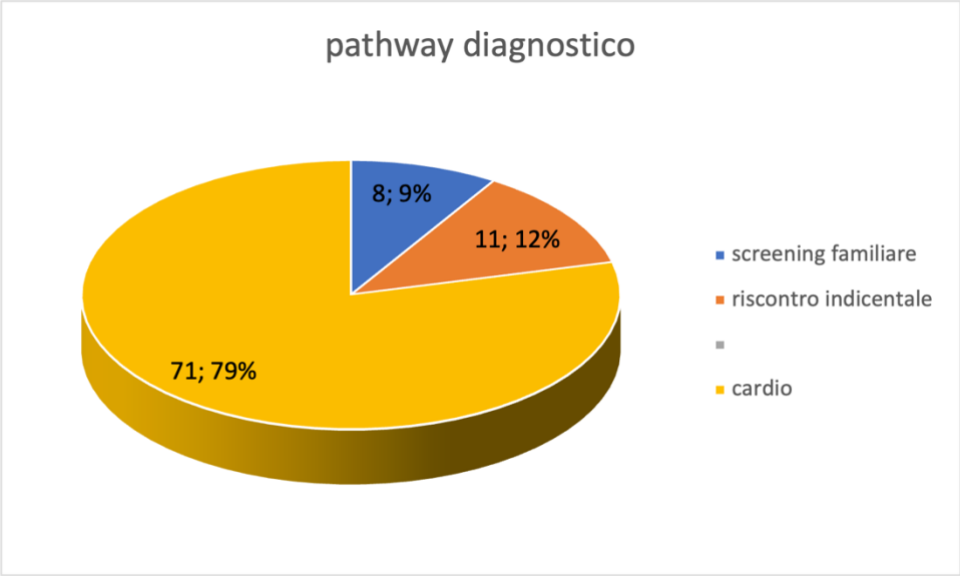


Figura 3: Curva di Kaplan-Meyer sopravvivenza libera da MACE paziente affetti da ATTR-v p.Ile88Leu in terapia disease modifying vs non in terapia. Follow-up mediano 43 mesi.

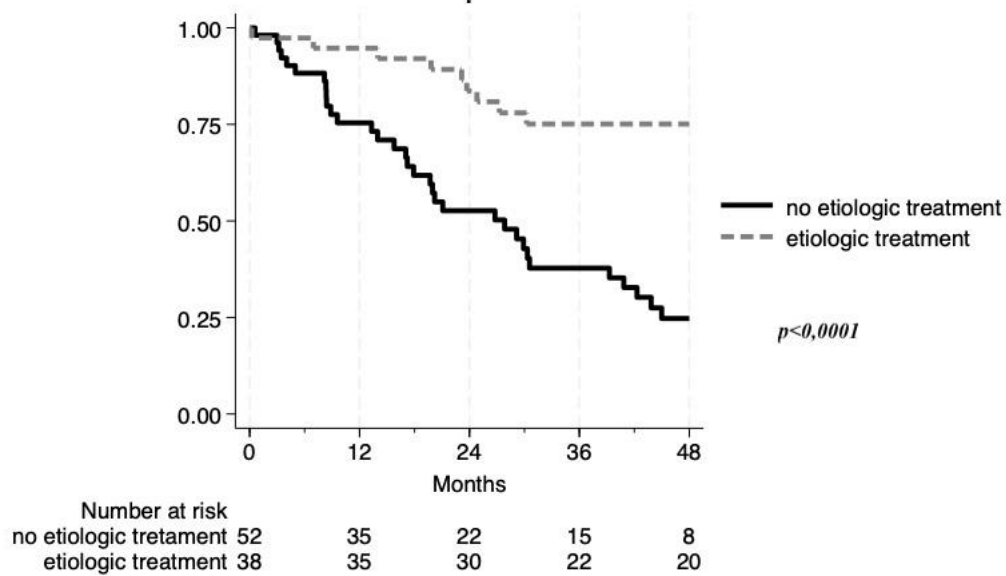


Figura 4: Curva di Kaplan-Meyer sopravvivenza libera da MACE nella popolazione non in trattamento eziologico suddivisa in funzione della frazione d'eiezione del Vsn ($> 0 \leq 40\%$) Follow-up mediano 43 mesi.

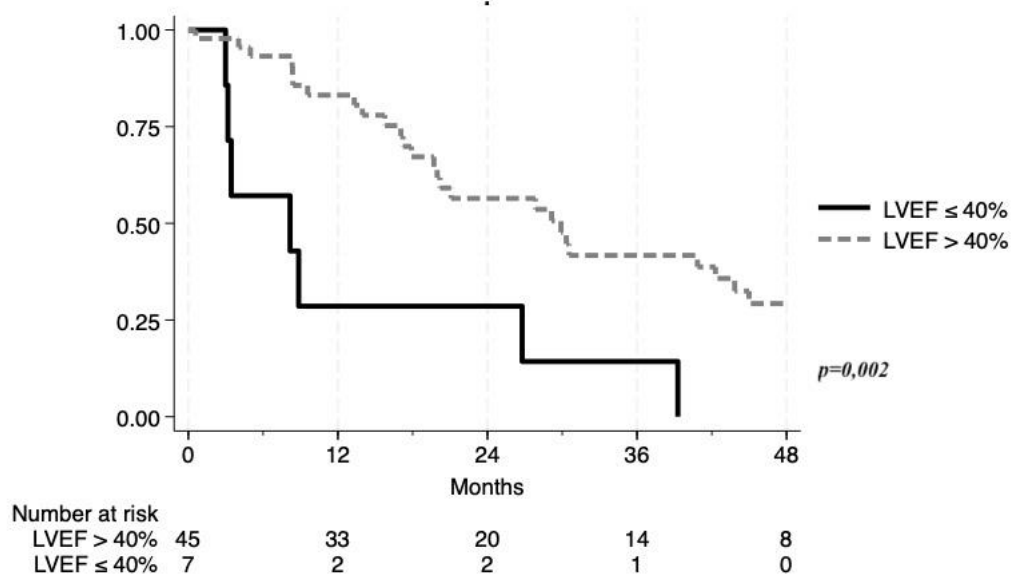
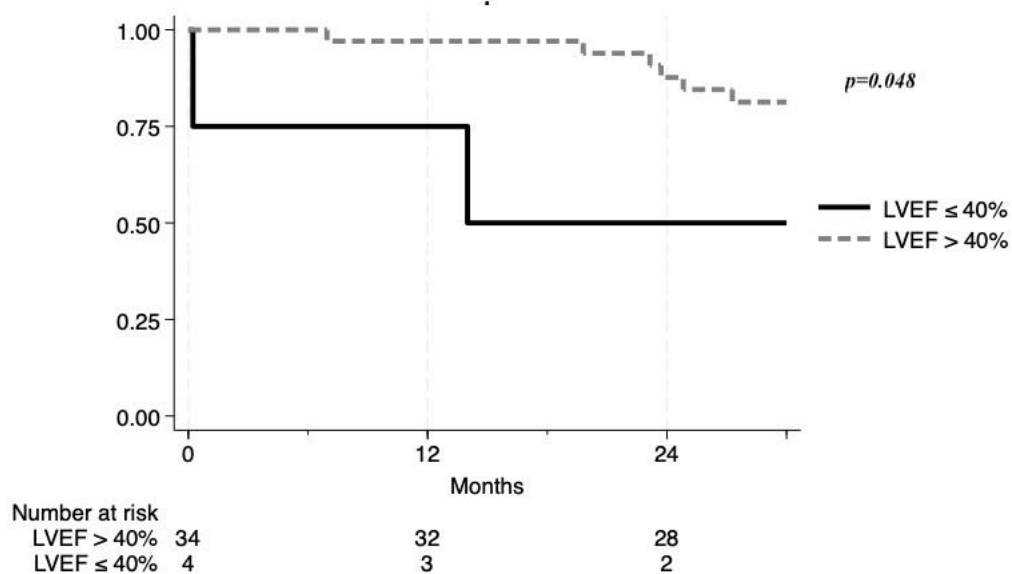


Figura 5: sopravvivenza libera da MACE nella popolazione in trattamento in funzione della frazione d'eiezione del Vsn ($> o \leq 40\%$). Follow-up 28 mesi.



BIBLIOGRAFIA.

1. Glenner GG, Ein D, Eanes ED, et al. Creation of "amyloid" fibrils from Bence Jones proteins in vitro. Science. 1971 Nov 12;174(4010):712-4.
2. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. N Engl J Med. 2003 Aug 7;349(6):583-96.
3. Shirahama T, Cohen AS. High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. J Cell Biol 1967;33:679-708.
4. Westermark P. Aspects of human amyloid forms and their fibril polypeptides. FEBS J 2005;272:5942-5949.
5. Rapezzi C, Merlini G, Quarta CC et al. Systemic cardiac amyloidoses: disease profiles and clinical courses of the 3 main types. Circulation. 2009 Sep 29;120(13):1203-12.
6. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio ALP, et al. Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Eur Heart J. 2013;34(19):1448-1458.
7. González-López E, Gallego-Delgado M, Guzzo-Merello G, et al. Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. Eur Heart J. 2015;36(38):2585-2594. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHV338

8. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy. Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 1952;75:408–427.
9. Grogan M, Scott CG, Kyle RA, et al. Natural History of Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis and Risk Stratification Using a Novel Staging System. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(10):1014-1020. doi:10.1016/J.JACC.2016.06.033
10. Gillmore JD, Damy T, Fontana M, et al. A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur Heart J*. 2018;39(30):2799-2806. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHX589
11. Nakagawa M, Sekijima Y, Yazaki M, Carpal tunnel syndrome: a common initial symptom of systemic wild-type ATTR (ATTRwt) amyloidosis. *Amyloid*. 2016 Mar; 23(1):58-63.
12. Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T et al. Amyloid deposits derived from transthyretin in the ligamentum flavum as related to lumbar spinal canal stenosis. *Mod Pathol*. 2015 Feb;28(2):201-7. 25. Chung CM, Connors LH, Benson MD, Walsh MT. Biophysical analysis of normal transthytetin. *Amyloid* 2001;8:75-83.
13. Chung CM, Connors LH, Benson MD, Walsh MT. Biophysical analysis of normal transthytetin. *Amyloid* 2001;8:75-83.
14. Pitkänen P, Westermark P, Cornwell GG. Senile systemic amyloidosis. *Am J Pathol* 1984;117:391-399.

15. Westermark P, Sletten K, Johansson B, Cornwell GG. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2843-2845.
16. Cornwell GG, Murdoch WL, Jyle RA, Westermark P, Pitkänen P. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am J Med.*1983;75:618-623.
17. Falk RH, Dubrey SW. Amyloid heart disease. *Progress in cardiovascular disease* 2010 52;347-361.
18. Tanskanen M, Peuralinna T, Polvikoski T, Notkola IL, Sulkava R, Hardy J, Singleton A, Kiuru-Enari S, Paetau A, Tienari PJ, Myllykangas L. Senile systemic amyloidosis affects 25% of the very aged and associates with genetic variation in alpha2-macroglobulin and tau: a population-based autopsy study. *Ann Med* 2008;40:232–239.
- 19.Kanda Y, Goodman DS, Canfield RE, Morgan FJ. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem.* 1974 Nov 10;249(21):6796-805. PMID: 4607556.

20. Rowczenio DM, Noor I, Gillmore JD, Lachmann HJ, Whelan C, Hawkins PN, et al. Online registry for mutations in hereditary amyloidosis including nomenclature recommendations. *Hum Mutat.* (2014) 35:E2403–12. doi: 10.1002/humu.22619
21. Lahuerta Pueyo C, Aibar Arregui MÁ, Gracia Gutierrez A, Bueno Juana E, Menao Guillén S. Estimating the prevalence of allelic variants in the transthyretin gene by analysing large-scale sequencing data. *Eur J Hum Genet.* (2019) 27:783–91. doi: 10.1038/s41431-019-0337-1
22. Wakita Y, Sato T, Chosa K, Suico MA, Sasaki R, Kawano S, et al. Characterization of non-amyloidogenic G101S transthyretin. *Biol Pharm Bull.* (2018) 41:628–36. doi: 10.1248/bpb.b17-01021
23. Bersano A, Bo RD, Ballabio E, Cinnante C, Lanfranconi S, Comi GP, et al. Transthyretin Asn90 variant: amyloidogenic or non-amyloidogenic role. *J Neurol Sci.* (2009) 284:113–5. doi: 10.1016/j.jns.2009.04.015
24. Parker MM, Ticau S, Butler J, Erbe D, Merkel M, Aldinc E, et al. Transthyretin-stabilising mutation T119M is not associated with protection against vascular disease or death in the UK Biobank. *Amyloid.* (2020) 27:184–90. doi: 10.1080/13506129.2020.1758658

25. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy. Familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 1952;75:408–427.
26. Planté-Bordeneuve V, Ferreira A, Lalu T, et al. Diagnostic pitfalls in sporadic transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP). *Neurology* 2007;69:693–8.
- 27 Coelho T, Maurer MS, Suhr OB. THAOS - The Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey: initial report on clinical manifestations in patients with hereditary and wild-type transthyretin amyloidosis. *Curr Med Res Opin.* (2013) 29:63– 76. doi: 10.1185/03007995.2012.754348
28. Parman Y, Adams D, Obici L, Galán L, Guerguelcheva V, Suhr OB, et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr Opin Neurol.* (2016) 29:S3–S13 doi: 10.1097/WCO.0000000000000288
29. Jacobson DR, Pastore RD, Yaghoubian R, Kane I, Gallo G, Buck F, et al. Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black Americans. *N Engl J Med.* (1997) 336:466–73. doi: 10.1056/NEJM199702133360703

30. Quarta CC, Gonzalez-Lopez E, Gilbertson JA, et al. Diagnostic sensitivity of abdominal fat aspiration in cardiac amyloidosis. *Eur Heart J*. 2017;38(24):1905-1908. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHX047
31. Conti M, Poppi I, Cavedagna TM, et al. A targeted proteomics approach to amyloidosis typing. *Clin Mass Spectrom*. 2018;7:18-28. doi:10.1016/J.CLINMS.2018.02.001
32. Gilbertson JA, Theis JD, Vrana JA, et al. A comparison of immunohistochemistry and mass spectrometry for determining the amyloid fibril protein from formalin-fixed biopsy tissue. *J Clin Pathol*. 2015;68(4):314-317. doi:10.1136/JCLINPATH-2014-202722
33. Gillmore JD, Maurer MS, Falk RH, et al. Nonbiopsy diagnosis of cardiac transthyretin amyloidosis. *Circulation*. 2016;133(24):2404-2412.
- 34 Manganelli F, Fabrizi GM, Luigetti M, Mandich P, Mazzeo A, Pareyson D. Hereditary transthyretin amyloidosis overview. *Neurol Sci*. 2022 Dec;43(Suppl 2):595-604. doi: 10.1007/s10072-020-04889-2. Epub 2020 Nov 14. PMID: 33188616; PMCID: PMC9780126.

35. Leonardi L, Adam C, Beaudonnet G, Beauvais D, Cauquil C, Not A, et al. Skin amyloid deposits and nerve fiber loss as markers of neuropathy onset and progression in hereditary transthyretin amyloidosis. *Eur J Neurol.* (2022) 29:1477–87. doi: 10.1111/ene.15268

Ù

36. Freeman R, Gonzalez-Duarte A, Barroso F, Campagnolo M, Rajan S, Garcia J, et al. Cutaneous amyloid is a biomarker in early ATTRv neuropathy and progresses across disease stages. *Ann Clin Transl Neurol.* (2022) 9:1370–83. doi: 10.1002/acn3.51636

37. Khalil M, Teunissen CE, Lehmann S, Otto M, Piehl F, Ziemssen T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders - towards clinical application. *Nat Rev Neurol.* (2024) 20:269–87. doi: 10.1038/s41582-024-00955-x

38. Romano A, Primiano G, Antonini G, Ceccanti M, Fenu S, Forcina F, et al. Serum neurofilament light chain: a promising early diagnostic biomarker for hereditary transthyretin amyloidosis? *Eur J Neurol.* (2024) 31:e16070. doi: 10.1111/ene.16070

39 Guaraldi P, Allegri I, Ariatti A, Baldini T, Barbieri A, Barocelli F, Bartolotti M, Biagini E, Bianchi F, Borghi A, Borghi C, Boriani G, Cani I, Carigi S, Codeluppi L, Currò Dossi M, Dalpozzo F, D'Angelo R, De Gennaro R, Di Spigno F, Gardini E, Lanati G, Leuzzi C, Marzo F, Masullo M, Mazzanti G, Merli E, Milandri A, Monari D, Perugini E, Ponziani A, Postiglione E, Rasia M, Rinaldi R, Scancarello D, Serafini K, Serenelli M, Sguazzotti M, Siena E, Simone AM, Terracciano C, Valenti C, Vitale G, Vitiello M, Longhi S. Monitoring patients and asymptomatic carriers with hereditary

transthyretin amyloidosis: regional protocol of Emilia-Romagna ATTR working group. *Front Neurol.* 2025 Aug 29;16:1666318. doi: 10.3389/fneur.2025.1666318. PMID: 40948648; PMCID: PMC12426949.

40 Carvalho A, Rocha A, Lobato L. Liver transplantation in transthyretin amyloidosis: issues and challenges. *Liver Transpl.* 2015 Mar;21(3):282-92. doi: 10.1002/lt.24058. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25482846.

41 Maurer MS, Kale P, Fontana M, Berk JL, Grogan M, Gustafsson F, Hung RR, Gottlieb RL, Damy T, González-Duarte A, Sarswat N, Sekijima Y, Tahara N, Taylor MS, Kubanek M, Donal E, Palecek T, Tsujita K, Tang WHW, Yu WC, Obici L, Simões M, Fernandes F, Poulsen SH, Diemberger I, Perfetto F, Solomon SD, Di Carli M, Badri P, White MT, Chen J, Yureneva E, Sweetser MT, Jay PY, Garg PP, Vest J, Gillmore JD; APOLLO-B Trial Investigators. Patisiran Treatment in Patients with Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2023 Oct 26;389(17):1553-1565. doi: 10.1056/NEJMoa2300757. PMID: 37888916; PMCID: PMC10757426.

42 Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, Polydefkis M, Dyck PJ, Wang AK, Planté-Bordeneuve V, Barroso FA, Merlini G, Obici L, Scheinberg M, Brannagan TH

III, Litchy WJ, Whelan C, Drachman BM, Adams D, Heitner SB, Conceição I, Schmidt HH, Vita G, Campistol JM, Gamez J, Gorevic PD, Gane E, Shah AM, Solomon SD, Monia BP, Hughes SG, Kwoh TJ, McEvoy BW, Jung SW, Baker BF, Ackermann EJ, Gertz MA, Coelho T (2018) Inotersen treatment for patients with hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* 379:22–31

43 Witteles RM, Garcia-Pavia P, Damy T, Grogan M, Sheikh FH, Morbach C, Bender S, Exter J, Eraly SA, Fontana M. Vutrisiran Improves Survival and Reduces Cardiovascular Events in ATTR Amyloid Cardiomyopathy: HELIOS-B. *J Am Coll Cardiol.* 2025 Apr 30:S0735-1097(25)06170-4. doi: 10.1016/j.jacc.2025.04.008. Epub ahead of print. PMID: 40380962.

44 Coelho T, Marques W Jr, Dasgupta NR, Chao CC, Parman Y, França MC Jr, Guo YC, Wixner J, Ro LS, Calandra CR, Kowacs PA, Berk JL, Obici L, Barroso FA, Weiler M, Conceição I, Jung SW, Buchele G, Brambatti M, Chen J, Hughes SG, Schneider E, Viney NJ, Masri A, Gertz MR, Ando Y, Gillmore JD, Khella S, Dyck PJB, Waddington Cruz M; NEURO-TTRansform Investigators. Eplontersen for Hereditary Transthyretin Amyloidosis With Polyneuropathy. *JAMA.* 2023 Oct 17;330(15):1448-1458. doi: 10.1001/jama.2023.18688. PMID: 37768671; PMCID: PMC10540057.

45 Gillmore JD, Gane E, Täubel J, Pilebro B, Echaniz-Laguna A, Kao J, Litchy W, Shahda S, Haagensen A, Walsh L, Smith D, Kachadourian J, Ward JH, Lebowitz D,

Zhu P, Xu Y, Leung A, Sonderfan A, Gutstein DE, Manvelian G, Adams D. Nexiguran Ziclumeran Gene Editing in Hereditary ATTR with Polyneuropathy. *N Engl J Med*. 2025 Oct 9;393(14):1375-1386. doi: 10.1056/NEJMoa2510209. Epub 2025 Sep 25. PMID: 41002250.

46. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, et al. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2018;379(11):1007-1016. doi:10.1056/NEJMOA1805689

47. Takahashi R, Ono K, Shibata S, Nakamura K, Komatsu J, Ikeda Y, Ikeda T, Samuraki M, Sakai K, Iwasa K, Kayano D, Yamada M (2014) Efficacy of diflunisal on autonomic dysfunction of late-onset familial amyloid polyneuropathy (TTR Val30Met) in a Japanese endemic area. *J Neurol Sci* 345:231–235

48. Gillmore JD, Judge DP, Cappelli F, Fontana M, Garcia-Pavia P, Gibbs S, Grogan M, Hanna M, Hoffman J, Masri A, Maurer MS, Nativi-Nicolau J, Obici L, Poulsen SH, Rockhold F, Shah KB, Soman P, Garg J, Chiswell K, Xu H, Cao X, Lystig T, Sinha U, Fox JC; ATTRIBUTE-CM Investigators. Efficacy and Safety of Acoramidis in Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2024 Jan 11;390(2):132-142. doi: 10.1056/NEJMoa2305434. PMID: 38197816.

49. Emdin M, Aimo A, Rapezzi C, et al. Treatment of cardiac transthyretin amyloidosis: an update. *Eur Heart J*. 2019;40(45):3699-3706. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHZ298
50. Cardoso I, Martins D, Ribeiro T, Merlini G, Saraiva MJ (2010) Synergy of combined doxycycline/TUDCA treatment in lowering transthyretin deposition and associated biomarkers: studies in FAP mouse models. *J Transl Med* 8:74
51. Laborante R, Elia S, Savarese G, Patti G, D'Amario D. Tolerability and efficacy of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in patients with cardiac amyloidosis: a meta-analysis of observational studies. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2025 Jul 7;11(4):356-364. doi: 10.1093/ehjcvp/pvaf033. PMID: 40380981; PMCID: PMC12231128.
52. Rapezzi C, Quarta CC, Obici L, Perfetto F, Longhi S, Salvi F, Biagini E, Lorenzini M, Grigioni F, Leone O, Cappelli F, Palladini G, Rimessi P, Ferlini A, Arpesella G, Pinna AD, Merlini G, Perlini S. Disease profile and differential diagnosis of hereditary transthyretin-related amyloidosis with exclusively cardiac phenotype: an Italian perspective. *Eur Heart J*. 2013 Feb;34(7):520-8. doi: 10.1093/eurheartj/ehs123. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745357.

53 Gagliardi C, Perfetto F, Lorenzini M, Ferlini A, Salvi F, Milandri A, Quarta CC, Taborchi G, Bartolini S, Frusconi S, Martone R, Cinelli MM, Foffi S, Reggiani MLB, Fabbri G, Cataldo P, Cappelli F, Rapezzi C. Phenotypic profile of Ile68Leu transthyretin amyloidosis: an underdiagnosed cause of heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2018 Oct;20(10):1417-1425. doi: 10.1002/ejhf.1285. Epub 2018 Aug 2. PMID: 30070416.

54 Pastorelli F, Fabbri G, Rapezzi C, Serenelli M, Plasmati R, Vacchiano V, Ferlini A, Manfrini M, Salvi F. Neurological involvement in Ile68Leu (p.Ile88Leu) ATTR amyloidosis: not only a cardiogenic mutation. *Amyloid*. 2021 Sep;28(3):173-181. doi: 10.1080/13506129.2021.1917357. Epub 2021 May 28. PMID: 34047656.

55. Surawicz B, Knillas TK. Chou's Electrocardiography in Clinical Practice. 5th edition. Philadelphia, PA:WB Saunders, 2001.

56. Neskovic NA, Edvardsen T, Galderisi M et al. Focus cardiac ultrasound: the European Association of Cardiovascular Imaging viewpoint. *European Heart Journal – Cardiovascular Imaging* 2014; 15: 956-960.

57. Roberto M et al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European Heart Journal – Cardiovascular Imaging* 2015; 16: 233-271.

58. Voigt JU, Pedrizzetti G, Lysyansky P et al. Definitions for a common standard for 2D speckle tracking echocardiography: consensus document of the EACVI/ASE/Industry Task Force to standardize deformation imaging. *European Heart Journal – Cardiovascular Imaging* 2015; 16: 1-11.

59. Phelan D, Collier P, Thavendiranathan P, Popović ZB, Hanna M, Plana JC, Marwick TH, Thomas JD. Relative apical sparing of longitudinal strain using two-dimensional speckle-tracking echocardiography is both sensitive and specific for the diagnosis of cardiac amyloidosis. *Heart*. 2012 Oct;98(19):1442-8. doi: 10.1136/heartjnl-2012-302353. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22865865.

60. Porcari A, Razvi Y, Masi A, Patel R, Ioannou A, Rauf MU, Hutt DF, Rowczenio D, Gilbertson J, Martinez-Naharro A, Venneri L, Whelan C, Lachmann H, Wechalekar A, Quarta CC, Merlo M, Sinagra G, Hawkins PN, Fontana M, Gillmore JD. Prevalence, characteristics and outcomes of older patients with hereditary versus wild-type transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2023 Apr;25(4):515-524. doi: 10.1002/ejhf.2776. Epub 2023 Jan 30. PMID: 36644836.

61. Fontana M, Berk JL, Drachman B, Garcia-Pavia P, Hanna M, Lairez O, Witteles R. Changing Treatment Landscape in Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Circ Heart Fail*. 2025 Aug;18(8):e012112. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.124.012112. Epub 2025 Mar 31. PMID: 40160093; PMCID: PMC12356574.

62. Lane T, Fontana M, Martinez-Naharro A, Quarta CC, Whelan CJ, Petrie A, Rowczenio DM, Gilbertson JA, Hutt DF, Rezk T, Strehina SG, Caringal-Galima J, Manwani R, Sharpley FA, Wechalekar AD, Lachmann HJ, Mahmood S, Sachchithanantham S, Drage EPS, Jenner HD, McDonald R, Bertolli O, Calleja A, Hawkins PN, Gillmore JD. Natural History, Quality of Life, and Outcome in Cardiac Transthyretin Amyloidosis. *Circulation*. 2019 Jul 2;140(1):16-26. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038169. Epub 2019 May 21. Erratum in: *Circulation*. 2019 Jul 30;140(5):e185. doi: 10.1161/CIR.0000000000000714. PMID: 31109193.