

**Alma Mater Studiorum - Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA  
FISIOPATOLOGIA DELL' INSUFFICIENZA CARDIACA  
Ciclo XXII**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/11

**FISIOPATOLOGIA, CLINICA,  
STORIA NATURALE E TERAPIA DELLE  
CARDIOMIOPATIE AMILOIDOTICHE**

Presentata da Dott. Letizia Riva

Coordinatore Dottorato  
Chiar.mo Prof. Angelo Branzi

Relatore  
Chiar.mo Prof. Claudio Rapezzi

---

**Esame finale anno 2009**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>2</b>
SCOPI DEL LAVORO	6
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>7</b>
“CLINICAL SETTING” E PAZIENTI	7
CRITERI DI DIAGNOSI	7
METODICHE STRUMENTALI	9
ANALISI GENETICA	10
FOLLOW-UP	10
ANALISI STATISTICA	10
<b>RISULTATI</b>	<b>12</b>
<u>CONFRONTO DEI TRE PRINCIPALI TIPI DI AMILOIDOSI CARDIACA</u>	12
CARATTERISTICHE CLINICHE	12
CARATTERISTICHE ELETTROCARDIOGRAFICHE	14
CARATTERISTICHE ECOCARDIOGRAFICHE	15
DATI EMODINAMICI	16
CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE	17
OUTCOME	18
<u>STUDIO DEI PAZIENTI AFFETTI DA ATTR<sub>m</sub></u>	20
ANALISI DEI TIPI DI COINVOLGIMENTO CARDIACO	21
ANALISI DEI PRINCIPALI FENOTIPI DI PRESENTAZIONE CLINICA	23
ANALISI DEI PAZIENTI CON INTERESSAMENTO CARDIACO ESCLUSIVO	26
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>38</b>

# INTRODUZIONE

L'amiloidosi cardiaca è considerata la più frequente delle cardiomiopatie specifiche con una fisiopatologia restrittiva nel mondo occidentale. Anche se esistono dei criteri standard di diagnosi, come i tipici reperti istologici, è una malattia ampiamente sottodiagnosticata per diverse ragioni:

- le caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche sono spesso malinterpretate, potendo simulare la cardiomiopatia ipertrofica o la cardiopatia ischemica;
- le conoscenze sull'amiloidosi, sono competenza prevalentemente dell'ematologo, del nefrologo, del neurologo, così che non è infrequente che la malattia sia poco conosciuta negli ambienti cardiologici o di medicina interna;
- la fisiopatologia non è di univoca interpretazione, ma variabile da caso a caso e all'interno della storia naturale di ciascun paziente.

Al di fuori di centri dedicati quindi, raramente il singolo specialista (specialmente il cardiologo) possiede il necessario background culturale per orientare correttamente il work-up diagnostico e terapeutico.

Con il termine Amiloidosi ci si riferisce ad un gruppo eterogeneo di situazioni patologiche che condividono una caratteristica: la deposizione extracellulare di proteine fibrillari insolubili con conseguente disorganizzazione architetturale dei tessuti e degli organi coinvolti<sup>1,2,3</sup>.

Le proteine implicate nel processo variano in ciascun tipo di amiloidosi, ma hanno proprietà tintoriali e strutturali comuni:

- un aspetto di sostanza amorfa al microscopio a luce normale,
- la birifrangenza "apple green" con la colorazione Rosso Congo al microscopio a luce polarizzata,
- un'ultrastruttura composta da fibrille di diametro variabile tra 7 e 10 nm, costituite da amiloide e da altri fattori additivi, quali i proteoglicani,
- una conformazione " $\beta$  pleated-sheet" alla spettroscopia a raggi infrarossi, determinante principale del potenziale amiloidogenico della proteina.

La classificazione dell'amiloidosi attualmente in uso, approvata dal "World Health Organization nomenclature subcommittee" si basa sulla natura della proteina precursore<sup>1</sup>, dato il fatto che quest'ultima determina l'espressione fenotipica della malattia sia per quanto riguarda gli organi coinvolti che per le manifestazioni cliniche di tale coinvolgimento (Tab.1). L'amiloidosi pertanto può essere acquisita o ereditaria, sistemica o localizzata.

**Tab. 1 Classificazione attualmente in uso delle amiloidosi.**

Proteina amiloide	Precursore	Sistemica (S) o localizzata (L)	Sindrome o tessuti coinvolti
AL	Catene leggere Ig	S, L	Primaria Associata al mieloma
AH	Catene pesanti Ig	S, L	Primaria Associata al mieloma
ATTR	Transtiretina	S	Familiare (portoghese, giapponese, svedese) Senile sistemica
AA	(Apo) AA sierica	L?	Tenosinovia
A $\beta_2$ M	$\beta_2$ microglobulina	S	Secondaria, reattiva
AApoA1	Apolipoproteina A1	S	Emodialisi cronica
AApoA2	Apolipoproteina A2	L?	Giunture
AGel	Gelsolina	S	Familiare
ALys	Lisozima	S	Familiare (renale)
AFib	Fibrinogena catena $\alpha$	S	Familiare (finlandese)
ACys	Cistatina C	S	Familiare
A $\beta$	A $\beta$ precursore proteico	L	Familiare (islandese) Malattia di Alzheimer, invecchiamento Familiare (olandese)
APrP <sup>SC</sup>	Proteina prionica	L	Encefalopatie spongiformi
ACal	(Pro)calcitonina	L	Tumori tiroidei a cellule C
AIAPP	"Islet amyloid polypeptide"	L	Isole di Langerhans
AANF	Fattore natriuretico atriale	L	Insulinomi
APro	Prolattina	L	Atri cardiaci Ipofisi dell'anziano Prolattinomi
AIns	Insulina	L	Iatrogena (siti di iniezione dell'insulina)
ALac	Lattoferrina	L	Cornea
AMed	Lactadherin	L	Media dell'aorta
ABri/ADan	Peptide ABri	L/S	Demenza familiare danese, britannica

L'epidemiologia è difficile da definire per il fatto che la malattia è sottodiagnosticata e i dati disponibili provengono da Centri di Riferimento non rappresentativi della popolazione generale. L'amiloidosi acquisita o primaria (AL), dovuta all'accumulo di catene leggere delle immunoglobuline, prodotte nel midollo osseo da cloni plasmacellulari <sup>4,5</sup> con un rapporto di catene  $\kappa:\lambda$  di 1:3, è sicuramente la forma più frequente: negli Stati Uniti ha un'incidenza di 0.9 per 100.000 abitanti all'anno con circa 2.500 nuovi casi annui. La forma ereditaria è più rara: i casi diagnosticati nei Centri di Riferimento statunitensi sono il 10-20% dei casi di AL <sup>2</sup>. Esistono però forme specifiche di particolari aree geografiche: nel Nord del Portogallo un individuo su 600 è portatore della mutazione Val30Met della transtiretina.

L'amiloidosi ereditaria è infatti secondaria all'accumulo di 7 possibili differenti proteine: la transtiretina (ATTRm), l'apolipoproteina A1 e A2 (AApoA1-A2), la gelsolina (AGel), la cistatina C (ACys), la catena  $\alpha$  del fibrinogeno (AFib), il lisozima (ALys).

Tra le forme ereditarie la forma ATTRm è la più frequente. La transtiretina (TTR) è una proteina sierica sintetizzata dal fegato e in minima parte dall'epitelio retinico e dai plessi corioidei, deputata al trasporto della RBP (proteina che lega il retinolo o vitamina A). Allo stato attuale sono state identificate circa 100 varianti della proteina, secondarie a mutazioni puntiformi (sostituzioni di singoli aminoacidi) nel suo gene, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 18, trasmesse in modo autosomico dominante con penetranza incompleta, la maggior parte delle quali risulta amiloidogena <sup>6</sup>. La transtiretina nativa, proteina tetramericata, a seguito delle mutazioni puntiformi suddette, è soggetta a riarrangiamenti che le conferiscono una struttura terziaria monomericata. I

monomeri instabili, aggregano sotto forma di fibrille e si depositano nei tessuti e negli organi con conseguente disorganizzazione architetturale<sup>7,8</sup>.

Per molto tempo la malattia è stata creduta essere conseguenza della sola mutazione Val30Met (sostituzione di una Valina con una Metionina in posizione 30), in quanto tutte le segnalazioni e i casi studiati derivavano da focolai giapponesi<sup>9</sup>, svedesi<sup>10</sup> e portoghesi<sup>11</sup>, aree in cui tale mutazione risulta endemica.

La prevalente estrinsecazione neurologica della malattia nelle forme endemiche relate alla mutazione Val30Met, ha fatto sì che l'ATTRm sia da sempre stata considerata una malattia di pertinenza neurologica, tanto da essere comunemente chiamata Polineuropatia Amiloidotica Familiare (FAP). La successiva segnalazione di nuove mutazioni della TTR<sup>12-16</sup> 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.

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 presentazione clinica rende il riconoscimento dell'ATTRm 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 il clinico verso la corretta diagnosi.

Una mutazione nella proteina della TTR non è un requisito obbligatorio per la precipitazione tissutale. Negli anziani la transtiretina nativa o "wild type" può diventare strutturalmente instabile, portando allo sviluppo di proteine intermedie di alterata conformazione, che infine aggregano e precipitano sotto forma di fibrille di amiloide<sup>8</sup>. L'amiloidosi sistemica senile o da "TTR wild type" (ATTRwt) è una patologia esclusiva del soggetto anziano riscontrata nel 5-76% degli ottantenni, a prevalente estrinsecazione cardiaca<sup>17-19</sup>. La sua incidenza aumenta con l'età. È stato quindi postulato il ruolo dell'invecchiamento nella formazione delle fibrille di amiloide, anche in relazione al fatto che i pazienti affetti da ATTRm sviluppano segni clinici di malattia soltanto dopo l'età adulta, nonostante l'anomalia della proteina sia congenita.

Per quanto riguarda la deposizione delle fibrille, indipendentemente dall'eziologia dell'amiloidosi, è stato dimostrato il ruolo del "seeding" (semina), suggerendo l'ipotesi che "amiloide genera amiloide", fenomeno chiamato anche "effetto nido". Questo potrebbe spiegare perché la precipitazione delle proteine si concentri in determinati organi risparmiando altre parti dell'organismo.

La clinica dell'amiloidosi AL, molto aspecifica, si caratterizza per una severa compromissione sistemica. Nel 74% dei casi vi è interessamento renale con sindrome nefrosica. Il cuore è coinvolto nel 60% dei casi ed è il fattore prognostico più infausto data la rapida evoluzione verso lo scompenso cardiaco. La deposizione di amiloide nel miocardio causa un progressivo ispessimento e

irrigidimento delle pareti dei ventricoli e degli atri, con riduzione della compliance e quindi alterato rilasciamento ventricolare, con progressiva comparsa di fisiopatologia restrittiva. Anche le valvole, in particolare quelle atrio-ventricolari, possono essere ispessite, dando luogo a rigurgiti. Il sistema di conduzione è praticamente sempre interessato: si osservano blocchi seno-atriali e fibrillazione atriale, blocchi atrio-ventricolari e blocchi di branca. Dal punto di vista vascolare la deposizione di amiloide riguarda principalmente i vasi intramurali, con conseguente ischemia miocardica in assenza di lesioni di vasi epicardici.

Il sistema nervoso periferico ed autonomico sono interessati rispettivamente nel 22% e nel 15% dei casi. L'apparato gastroenterico è coinvolto nell'8% dei casi. Nei pazienti affetti da AL si possono riscontrare macchie purpuree al collo e al volto, soprattutto in zona periorbitale. La prevalenza di macroglossia si è ridotta negli ultimi anni, verosimilmente di riflesso ad una diagnosi più precoce.

Il quadro clinico dell'ATTR è dipendente dal tipo di mutazione della transtiretina. Peraltro sono caratteristiche di questa forma di amiloidosi una neuropatia periferica assonale sensitivo-motoria ed autonoma. Nella forma endemica "classica" la polineuropatia moto-sensoriale ha esordio intorno ai 30-35 anni con disfunzione delle fibre periferiche degli arti inferiori. I primi sintomi accusati sono solitamente disturbi della sensibilità termica, disestesie e dolori alle estremità di vario grado, preceduti a volte, anche di qualche anno, dalla sindrome del tunnel carpale (spesso non inquadrata nell'ambito di una polineuropatia diffusa, ma valutata come disturbo localizzato). La componente motoria della neuropatia tende ad essere più tardiva e ad intervenire in fasi più avanzate della storia naturale della malattia. La disfunzione autonoma tende a presentarsi piuttosto precocemente e porta alla comparsa di ipotensione ortostatica, disturbi gastro-intestinali con alterazioni dell'alvo (diarrea, talvolta alternata a stipsi), disfunzione erettile nei maschi ed incontinenza urinaria.

E' noto dai dati disponibili in letteratura, che l'interessamento cardiaco può variare almeno in conseguenza di tre principali fattori che sono:

- il tipo di mutazione
- l'area geografica
- il tipo di aggregazione (endemica vs non endemica), con conseguente ampia varietà anche del "grading" di coinvolgimento miocardico <sup>20</sup>.

Esiste infatti una mutazione peculiare (Val122Ile) <sup>21</sup>, presente in forma eterozigote nel 4% della popolazione Afro-Americana, che dà luogo ad un fenotipo esclusivamente cardiaco.

Per quanto riguarda la situazione nella popolazione caucasica non esistono dati di ampie casistiche in letteratura e non sono note prevalenza e caratteristiche genotipiche/cliniche di soggetti "bianchi" affetti da ATTR con interessamento cardiaco esclusivo.

Nonostante l'eterogeneità patogenetica intrinseca dell'amiloidosi cardiaca, molti studi clinici e strumentali considerano la malattia come una singola entità.

In realtà, nonostante il comune substrato infiltrativo, a seconda dell'eziologia si riscontrano nella comune pratica clinica, importanti differenze inerenti a:

- entità all'ecocardiogramma e conseguenze funzionali dell'aumento della massa ventricolare (severo nell'amiloidosi sistemica senile, moderato nell'AL e nell'ATTRm);
- severità dello scompenso cardiaco (maggiore nell'AL);
- velocità di progressione della malattia (rapida nella forma AL, più lenta nelle forme ATTRm e ATTRwt);
- comorbidità determinata dall'interessamento multiorgano (caratteristica dell'AL).

Pertanto per analizzare in modo corretto le differenze intrinseche alle forme di amiloidosi cardiaca sono importanti gli studi di confronto diretto fra pazienti di uno stesso centro, dato il fatto che non tutte le differenze segnalate sono riconducibili ad una diversa eziopatogenesi. Esistono fattori potenzialmente confondenti legati ad esempio alle differenze etniche e geografiche della popolazione studiata, alla selezione per gravità dei pazienti (tipica dei centri di III° livello) e ai diversi criteri diagnostici utilizzati.

Attualmente in letteratura sono presenti soltanto due studi di confronto “head to head” di pazienti affetti da diverse forme di amiloidosi cardiaca, condotti all'interno di uno stesso centro: Ng et al. hanno confrontato pazienti con AL e ATTRwt selezionati per scompenso cardiaco congestizio <sup>22</sup>, mentre Dubrey et al. hanno paragonato le caratteristiche ecocardiografiche ed il follow-up di casi di AL e di ATTRm <sup>23</sup>.

## **SCOPI DEL LAVORO**

Sulla base di queste premesse il nostro lavoro si è proposto di analizzare tali problematiche attraverso la descrizione e la sistematica comparazione delle caratteristiche cliniche, morfologiche, funzionali e prognostiche di pazienti affetti dai tre principali tipi di amiloidosi cardiaca (AL, ATTRm e ATTRwt), seguiti nel tempo in due centri di riferimento italiani per la malattia, Bologna e Pavia.

Inoltre tra tutti i pazienti affetti da ATTRm sono stati identificati i soggetti con interessamento cardiaco al momento della diagnosi e ne sono stati descritti il tipo e il grado. Sono state in seguito esaminate le principali analogie e differenze tra questi soggetti e quelli con interessamento neurologico esclusivo (fenotipo “NEURO”) e quelli con fenotipo “MISTO” (interessamento cardiaco e neurologico compresenti) al momento della diagnosi.

Infine sono state analizzate caratteristiche genotipiche e cliniche dei pazienti con coinvolgimento cardiaco esclusivo (sintomi neurologici assenti) alla prima osservazione (fenotipo “CARDIO”).

# MATERIALI E METODI

## “CLINICAL SETTING” E PAZIENTI

Dal 1990 è stato istituito un network per la diagnosi e la terapia delle amiloidosi sistemiche tra i dipartimenti di Cardiologia, Ematologia, Nefrologia, Neurologia del nostro Policlinico e il dipartimento di Genetica Medica dell’Università degli Studi di Ferrara. I dati clinici, strumentali e di follow-up dei pazienti sono stati sistematicamente raccolti in un unico database, allestito in rete. Nel tempo è nata anche una stretta collaborazione con il Policlinico universitario di Pavia.

Non è stato necessario richiedere approvazione da parte del Comitato Etico, trattandosi di uno studio osservazionale (multicentrico longitudinale), in cui le procedure eseguite sono di routine nella pratica clinica.

Sono stati analizzati tutti i soggetti affetti da amiloidosi sistemica riferiti al centro di Bologna dal 1990 al Maggio 2008 e al centro di Pavia dal 2003 al Giugno 2004, e sono stati considerati eleggibili per lo studio consecutivamente quelli con cardiomiopatia amiloidotica all’ecocardiogramma. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad analisi genetica per la ricerca di mutazione puntiforme del gene della transtiretina, e tale possibilità insieme ad un valutazione specialistica neurologica e cardiologica è stata offerta anche a tutti i parenti di primo grado dei pazienti affetti nell’ambito di screening familiare.

I pazienti, previo consenso informato per la pubblicazione anonima dei dati scientifici, sono stati sistematicamente comparati attraverso la rilevazione e l’elaborazione di dati clinici e strumentali al momento della prima osservazione e nel follow-up presso i due centri di riferimento.

## CRITERI DI DIAGNOSI

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<sup>24</sup>.

I criteri per la diagnosi differenziale delle tre forme di amiloidosi sono riassunti in tabella 2:

**Tab. 2 Criteri di diagnosi differenziale.**

	AL	ATTRm	ATTRwt
Biopsia tissutale	+	+/-	+ (miocardio)
Discrasia plasmacellulare	+	-	-
Mutazione TTR	-	+	-
Immunoistochimica positiva per TTR	-	+/-	+
Segni neurologici caratteristici	+/-	+	+/-
Cardiomiopatia all’ecocardiogramma	+/-	+/-	+

+ obbligatoriamente presente; - obbligatoriamente assente; +/- non rilevante per la diagnosi



La diagnosi di AL è stata posta in caso di riscontro di discrasia plasmacellulare (gammopatia monoclonale o mieloma multiplo), identificata mediante documentazione di una componente M all'elettroforesi e all'immunofissazione delle proteine sieriche e/o urinarie, oppure mediante documentazione di un infiltrato plasmacellulare midollare (rispettivamente minore del 10% della popolazione mononucleata totale nella gammopatia monoclonale o maggiore del 30% nel mieloma multiplo). Unitamente a questo reperto, per la diagnosi di AL, sono necessarie sia un'immunostochimica<sup>25,26</sup> negativa per la TTR sia l'assenza di mutazioni del gene della TTR all'analisi genica del DNA<sup>22,27</sup>.

La diagnosi di ATTRm è stata definita attraverso la documentazione di una mutazione puntiforme della transtiretina all'analisi genica del DNA<sup>28</sup>.

In caso di documentata assenza di discrasia plasmacellulare e di mutazioni della transtiretina, in presenza di cardiomiopatia amiloidotica con positività dell'immunostochimica per la "TTR wild type" è stata fatta diagnosi di amiloidosi sistemica senile<sup>29</sup>.

Come interessamento cardiaco all'ecocardiogramma (ECOCCG) è stata intesa la presenza di uno spessore diastolico del setto interventricolare superiore a 12 mm, in assenza di qualsiasi altra causa di ipertrofia ventricolare<sup>30</sup>, in associazione ad almeno due delle seguenti caratteristiche:

- ispessimento delle valvole atrio-ventricolari
- ispessimento del setto interatriale
- "granular sparkling" a livello del setto interventricolare (Fig.1).

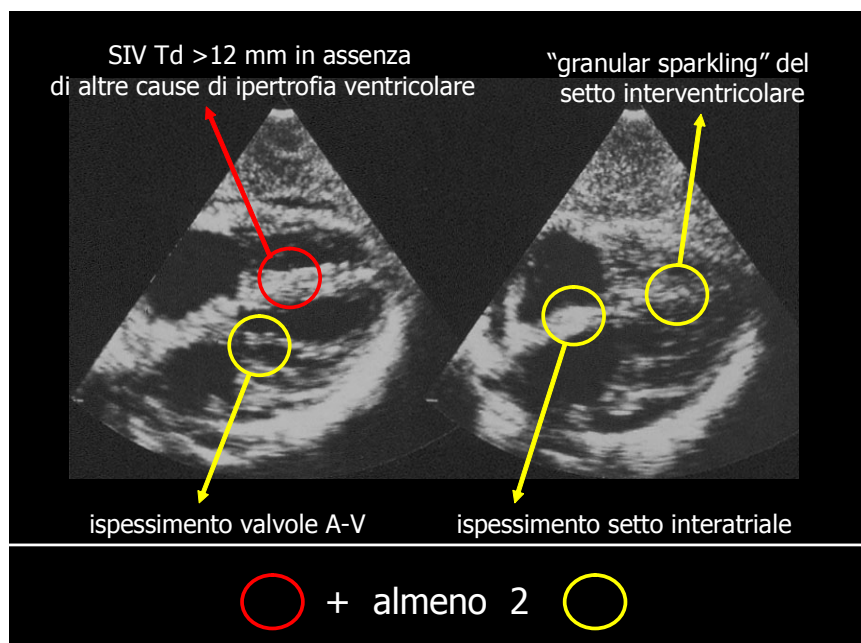


Fig.1 Criteri diagnostici ecocardiografici della cardiomiopatia amiloidotica.

Per interessamento renale è stata intesa la presenza di una proteinuria  $\geq 5$  gr/dl nelle 24 ore<sup>30</sup>, mentre per insufficienza renale è stata considerata una velocità di filtrazione glomerulare (VFG) < 60 ml/min.

L'interessamento del sistema nervoso periferico è stato valutato in base alla presenza di segni e/o sintomi caratteristici di polineuropatia periferica assonale sensitivo-motoria, simmetrica e ascendente. Il coinvolgimento è stato stadiato da 0 a 3 in accordo con lo score di Andrade (0 = assenza di neuropatia; 1 = coinvolgimento limitato agli arti inferiori senza impedimento nella deambulazione autonoma ma con esteso disturbo della sensibilità termica; 2 = atrofia dei muscoli distali degli arti inferiori, deperimento/debolezza dei muscoli della mano ed esteso disturbo della percezione termica e dolorifica degli arti inferiori e superiori; 3 = debolezza muscolare generalizzata, atrofia ed areflessia diffusa, con paziente costretto a letto o in poltrona, e turbe della sensibilità termica e dolorifica estese anche a capo e collo).

Per la determinazione e la valutazione dell'interessamento autonomico, è stata presa in considerazione l'insorgenza dei seguenti disturbi: disfunzione erettile nei maschi, ipotensione ortostatica, alterazioni dell'alvo (diarrea, talvolta alternata a stipsi), incontinenza urinaria e anomalie della sudorazione (dall' ipoidrosi fino all'anidrosi) <sup>30</sup>.

Per lo studio dei genotipi e dei fenotipi dei casi di ATTRm, i pazienti che al momento della prima osservazione avevano un interessamento cardiaco clinico/strumentale in assenza di sintomi neurologici (ad eccezione del rilievo di disfunzione erettile nei maschi di età superiore a 50 anni o di pregresso intervento di decompressione del nervo mediano per sindrome del tunnel carpale), sono stati raggruppati nel fenotipo "CARDIO". Nel gruppo del fenotipo "NEURO" sono stati considerati tutti i pazienti con chiaro interessamento neurologico clinico/strumentale, in assenza di sintomi e/o segni di coinvolgimento cardiaco. I restanti pazienti, che al momento della prima osservazione mostravano contemporaneamente sintomi e/o segni di coinvolgimento cardiaco e neurologico, sono stati considerati nel fenotipo "MISTO". Sono stati invece esclusi dallo studio i portatori sani, asintomatici, di mutazioni della TTR.

## **METODICHE STRUMENTALI**

Gli elettrocardiogrammi (ECG) sono stati registrati e analizzati in accordo con le definizioni standard <sup>31</sup>.

Le misure ecocardiografiche sono state eseguite secondo le raccomandazioni ACC/AHA/ASE edite nel 2003 <sup>32</sup>. In particolare la massa ventricolare sinistra è stata calcolata secondo la formula di Devereux et al. <sup>33</sup>, ed è stata considerata aumentata se  $> 130 \text{ g/m}^2$  nei maschi e  $> 110 \text{ g/m}^2$  nelle femmine. Per pattern di riempimento del ventricolo sinistro di tipo restrittivo è stata intesa la presenza al Doppler pulsato di un deceleration time dell'onda E  $< 150 \text{ msec}$  e di un rapporto onda E/onda A  $> 2.5$  <sup>34</sup>.

Il voltage/mass ratio è stato calcolato secondo la formula di Carroll et al. <sup>35</sup>.

Presso il centro di Bologna sono stati sistematicamente ricavati dai cateterismi cardiaci, effettuati in alcuni pazienti in corso di biopsia endomiocardica diagnostica, i seguenti dati emodinamici: pressione atriale destra media (normalmente  $\leq 5 \text{ mmHg}$ ), pressione capillare media d'incuneamento (normalmente  $\leq 12 \text{ mmHg}$ ), indice cardiaco (di norma compreso tra 2.5 e 4.2 L/min/m<sup>2</sup>) e morfologia a "dip-plateau" della curva di pressione del ventricolo destro.

La documentazione istologica di depositi di amiloide è stata ottenuta mediante biopsia del tessuto adiposo sottocutaneo periombelicale o mediante biopsia endomiocardica (BEM). Per quanto concerne tale procedura sono stati effettuati per ogni paziente cinque prelievi endomiocardici dalla parete destra del setto interventricolare, mediante accesso venoso giugulare interno destro con biotomo Cordis Bipal. I campioni sono stati trattati con irradiazione per cinque minuti, fissati in formalina e processati al microonde. In seguito sono state allestite multiple sezioni di 2 µm, in alcune delle quali, previa colorazione con il Rosso Congo, è stata valutata al microscopio a luce polarizzata la presenza della caratteristica birifrangenza “apple green”, indicativa di depositi di amiloide. La localizzazione dell’amiloidosi è stata distinta in interstiziale, endomiocardica e vascolare<sup>36</sup>. Nelle restanti sezioni sono state effettuate le indagini immunistochemiche mediante l’utilizzo di anticorpi diretti contro la transtiretina secondo il metodo LSAB Streptavidina-Biotina (R.P. Linke, Max Plank Institute of Biochemistry, Germany) o mediante l’immuno-microscopia elettronica (Dako, Ely, UK). Infine un frammento biotico è stato congelato in azoto liquido.

### **ANALISI GENETICA**

Per la genotipizzazione è stato isolato DNA da cellule di sangue periferico. Gli esoni 2, 3 e 4 del gene della TTR sono stati amplificati con la tecnica della “Polymerase Chain Reaction”. I frammenti di DNA amplificati sono stati direttamente sequenziati dal sequenziatore automatico ABI prism 3100. Le mutazioni puntiformi nel gene della TTR sono state studiate con la tecnica di ibridizzazione con oligonucleotide allele-specifico (ASO) e mediante l’analisi dei polimorfismi di restrizione (RFLP)<sup>28</sup>.

### **FOLLOW-UP**

Controlli clinici e strumentali sono stati programmati ed effettuati ogni sei mesi, o anticipatamente o più frequentemente in caso di necessità.

Il follow-up si è concluso nel Novembre 2008. In caso di mancata presenza dei pazienti alle periodiche visite di controllo nei sei mesi precedenti la chiusura del follow-up, è stato accertato lo stato vitale mediante contatto telefonico.

### **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati analizzati con il software di statistica SPSS, versione 13 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.), o STATA, versione 9 (Stata Corp., College Station, Texas, U.S.A).

Le variabili continue sono state espresse come media ± deviazione standard o mediana, le variabili di categoria come percentuali.

Le differenze cliniche e strumentali fra le tre forme di amiloidosi in studio (AL, ATTRm e ATTRwt) sono state valutate con l’analisi della varianza (ANOVA) o con il test  $\chi^2$  di Pearson.

Il test di Bonferroni è stato utilizzato per confronti multipli di variabili statisticamente significative. Una serie di variabili, scelte in base ad un potenziale rilevante ruolo fisiopatologico, sono state testate in modelli multivariati al fine di identificare associazioni indipendenti con il tipo di amiloidosi (categoria di riferimento = AL). Le variabili dipendenti sono state analizzate mediante regressione lineare multivariata, ad eccezione dei bassi voltaggi periferici del QRS, analizzati mediante regressione logistica, in quanto variabile binaria.

Le analisi dei dati emodinamici ed istologici sono state eseguite unicamente nei pazienti riferiti al centro di Bologna.

Modelli multivariati sono stati costruiti anche per identificare le variabili indipendenti associate con la mortalità totale e gli eventi cardiologici avversi maggiori (MACE).

Lo studio del follow-up dei tre sottogruppi di pazienti, è stato condotto secondo il metodo di Kaplan-Meier e le relative curve di sopravvivenza sono state comparate con il test del Log-rank.

Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0.05$ .

# RISULTATI

## **CONFRONTO DEI TRE PRINCIPALI TIPI DI AMILOIDOSI CARDIACA**

Durante il periodo dello studio nei due centri di riferimento, 500 pazienti hanno ricevuto la diagnosi di amiloidosi sistemica. Di questi 233 (47%: AL n=157, ATTRm n=61, ATTRwt n=15) avevano evidenza ecocardiografica di coinvolgimento cardiaco e sono stati pertanto inclusi nelle analisi.

Questi pazienti rappresentavano il 51% dei pazienti AL (in totale 307, di cui rispettivamente 69 pazienti con prima valutazione a Bologna e 88 a Pavia), il 34% dei pazienti ATTRm (in totale 178, di cui rispettivamente 54 pazienti con prima valutazione a Bologna e 7 a Pavia) e il 100% dei pazienti ATTRwt (di cui rispettivamente 14 pazienti con prima valutazione a Bologna e 1 a Pavia).

Tutti i pazienti, eccetto 1, erano di discendenza italiana (la famiglia di un soggetto affetto da ATTRm era originaria della Repubblica di Macedonia).

In 150 casi la cardiomiopatia amiloidotica è stata documentata allo screening ecocardiografico di routine dopo la diagnosi di amiloidosi sistemica (AL n=102, ATTRm n=48). In 3 casi (2 AL, 1 ATTRwt) la diagnosi di amiloidosi cardiaca è stata occasionale. Infine tutti i rimanenti 80 pazienti avevano ricevuto inizialmente una diagnosi di cardiomiopatia ipertrofica, di scompenso cardiaco o di aritmia presso un centro di secondo o terzo livello. In questi casi, il sospetto di amiloidosi cardiaca è nato sempre da una lettura combinata e da una valutazione critica di ecocardiogramma ed ECG (e a volte dai rilievi clinici) prima della diagnosi definitiva di AL (n=53), ATTRm (n=13), ATTRwt (n=14). In particolare elementi ecocardiografici caratteristici e suggestivi di interessamento amiloidotico cardiaco, in aggiunta all'aumento degli spessori parietali del ventricolo sinistro, sono stati l'aspetto a "granular sparkling" del miocardio ventricolare, l'ispessimento delle valvole atrio-ventricolari e/o del setto interventricolare e la presenza di versamento pericardico.

## **CARATTERISTICHE CLINICHE**

Non è stato sorprendente<sup>2,19,22,23</sup> riscontrare che tutti i 15 pazienti affetti da ATTRwt, eccetto 1, fossero maschi di età  $\geq 59$  anni. L'età media era maggiore nei pazienti con AL rispetto a quelli con ATTRm.

Circa i 2/5 dei pazienti con AL e ATTRwt avevano scompenso cardiaco grave. Molti pazienti ATTRm avevano un coinvolgimento neurologico, al contrario dell'interessamento renale che era frequente solo negli AL.

Molti casi di AL sono stati riferiti ad ematologi e cardiologi, mentre tutti i pazienti ATTRwt, eccetto 1, sono stati visti per la prima volta da cardiologi. E' interessante notare come il percorso diagnostico cardiologico, ovvero la presenza iniziale di sintomi di scompenso cardiaco o di aritmie, sia stato proprio dell'ATTRwt (93% dei casi). I sintomi neurologici rappresentavano l'elemento "trigger" del percorso diagnostico dei pazienti con ATTRm nel 52% dei casi; lo screening familiare è stato responsabile delle restanti diagnosi (Tab.3).

**Tab. 3 Caratteristiche cliniche.**

	<b>AL (n=157)</b>	<b>ATTRm (n=61)</b>	<b>ATTRwt (n=15)</b>	<b>p</b>
Sesso maschile (N,%)	104 (66)	49 (80)	14 (93)	<b>0.018</b>
Età alla diagnosi (anni)	60 ± 10.2 ●◆	51.5 ± 12.3 ■	75.5 ± 8	<b>&lt;0.0001</b>
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	116 ± 20.3	122 ± 18	113 ± 11	0.19
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	76 ± 10.2	79 ± 10	74 ± 5	0.17
Ipotensione ortostatica sintomatica (N,%)	22 (14) ◆	21 (34)	1 (7)	<b>0.01</b>
Sindrome del tunnel carpale (N,%)	21 (13) ◆	23 (38)	2 (13)	<b>&lt;0.0001</b>
Macroglossia (N,%)	16 (10)	4 (7)	0 (0)	0.32
NYHA III-IV (N,%)	59 (38)	12 (20)	6 (40)	<b>0.035</b>
Interessamento autonomico avanzato (N,%)	22 (14) ●◆	30 (49)	0 (0)	<b>&lt;0.0001</b>
Neuropatia periferica sensitivo-motoria (Andrade ≥ II) (N,%)	5 (3)	7 (11)	0 (0)	<b>0.029</b>
Interessamento renale (N,%)	90 (59) ●◆	0 (0) ■	2 (13)	<b>&lt;0.0001</b>
Insufficienza renale (n/N,%)	17/146 (12)	4/44 (9)	2 (13)	0.8
Percorso diagnostico:				<b>&lt;0.0001</b>
cardiologico (N,%)	53 (34)	13 (21)	14 (93)	
neurologico (N,%)	6 (4)	32 (52)	0 (0)	
screening familiare (N,%)	0 (0)	15 (25)	0 (0)	
ematologico (N,%)	61 (39)	0 (0)	0 (0)	
nefrologico (N,%)	30 (19)	1 (2)	0 (0)	
diagnosi occasionale (N,%)	2 (1)	0 (0)	1 (7)	
altri percorsi diagnostici (N,%)	5 (3)	0 (0)	0 (0)	

Test di Bonferroni: ● AL vs ATTRwt, ◆ AL vs ATTRm, ■ ATTRm vs ATTRwt

All'interno del sottogruppo di pazienti affetti da ATTRm la distribuzione delle mutazioni della transtiretina era la seguente (Tab.4):

Mutazioni	Pazienti	Famiglie
Glu89Gln	17 (28%)	10
Val30Met	11 (17%)	7
Ile68Leu	10 (16%)	10
Thr49Ala	7 (11%)	4
Glu54Lys	2 (3%)	1
Ala36Pro	2 (3%)	1
Arg34Thr	2 (3%)	1
Ser23Asn	2 (3%)	2
Phe33Val	1 (2%)	1
Thr59Lys	1 (2%)	1
His88Arg	1 (2%)	1
Phe64Leu	1 (2%)	1
Gly47Ala	1 (2%)	1
Val30Ala	1 (2%)	1
Ser50Arg	1 (2%)	1
Val14Leu	1 (2%)	1
TOTALE	61 (100%)	44

**Tab. 4 Distribuzione delle mutazioni della TTR.**

Cinque tra le dieci famiglie, da cui provenivano i pazienti portatori della mutazione Glu89Gln, erano originarie della Sicilia, mentre cinque delle sette famiglie, da cui provenivano i pazienti portatori della mutazione Val30Met, erano originarie del centro Italia.

Infine tutti i dieci soggetti portatori della mutazione Ile68Leu, pur provenendo da dieci famiglie differenti, avevano origini nel nord-est dell'Italia.

Inoltre la mutazione Val14Leu, riscontrata in un unico individuo, non era ancora nota in letteratura.

## CARATTERISTICHE ELETTROCARDIOGRAFICHE

All'analisi univariata degli ECG sono emerse differenze statisticamente significative fra i tre gruppi di pazienti riguardo a blocco di branca sinistra, bassi voltaggi del QRS e score totale del QRS (Tab.5).

Va notato come il blocco di branca sinistra sia stato riscontrato in 6 dei pazienti affetti da ATTRwt (40%), mentre nei soggetti con AL o ATTRm era presente di rado.

**Tab. 5 Caratteristiche elettrocardiografiche.**

	AL (n=157)	ATTRm (n=61)	ATTRwt (n=15)	p
Fibrillazione atriale (N,%)	19 (12)	3 (5)	4 (27)	<b>0.046</b>
Pacemaker (N,%)	4 (3)	2 (3)	2 (13)	0.09
BAV I° (n/N, %)	26/137 (18)	15/60 (25)	5 (33)	0.34
QRS score (mV), (n/N)	91.6 ± 35.8 (146) ●◆	112 ± 33.5 (59)	119.7 ± 37	<b>&lt;0.0001</b>
Bassi voltaggi QRS (n/N, %)	88/146 (60) ◆	15/60 (25)	6 (40)	<b>&lt;0.0001</b>
BBDx (n/N, %)	28/146 (19)	7/60 (12)	2 (13)	0.39
BBSn (n/N, %)	6/146 (4) ●	4/60 (7) ■	6 (40)	<b>&lt;0.0001</b>
Emiblocco anteriore sn (n/N, %)	42/146 (29)	18/60 (30)	3 (20)	0.74
Ipertrofia VSn (Sokolow >35 mm), (n/N, %)	4/146 (3)	3/59 (5)	1 (6)	0.58
Pseudonecrosi (n/N, %)	101/146 (69)	41/59 (69)	10 (66)	0.98
Alterazioni ischemiche (onde T negative), (n/N, %)	70/146 (48)	25/59 (42)	6 (40)	0.69
QTc (msec), (n/N)	453 ± 56.6 (146)	454 ± 49.4 (59)	465 ± 37	0.72
ECG normale (n/N, %)	7 (5)	6 (10)	0 (0)	0.19

Test di Bonferroni: ● AL vs ATTRwt, ◆ AL vs ATTRm, ■ ATTRm vs ATTRwt

All'analisi multivariata i bassi voltaggi del QRS sono risultati essere negativamente associati all'ATTRwt, indipendentemente da età, sesso, spessore parietale medio del ventricolo sinistro e versamento pericardico (Tab.6).

**Tab. 6 Analisi multivariata caratteristiche elettrocardiografiche.**

	Bassi voltaggi QRS		
	OR	95% CI	p
Età (per ogni anno)	0.98	0.95-1.00	0.097
Sesso maschile	0.87	0.45-1.66	0.67
ATTRm	0.17	0.08-0.36	<0.0001
ATTRwt	0.52	0.15-1.78	0.29
Spessore parietale medio VS <sub>n</sub> (per aumento di 1 mm)	1.03	0.93-1.14	0.51
Versamento pericardico	1.63	0.88-3.01	0.12

OR = odd ratio; CI = intervallo di confidenza

## CARATTERISTICHE ECOCARDIOGRAFICHE

All'analisi univariata differenze statisticamente significative sono emerse in relazione ai seguenti descrittori morfologici/funzionali del ventricolo sinistro: spessori diastolici del setto interventricolare e della parete posteriore, spessore parietale medio, diametro atriale sinistro, frazione di eiezione, diametro tele-sistolico, massa (nei maschi) e voltage/mass ratio. Differenze nel deceleration time dell'onda E hanno raggiunto il limite minore di significatività statistica (Tab.7). La frequenza dell' aumento di spessore delle valvole atrio-ventricolari variava dal 47% nelle forme AL, al 67% nelle forme ATTRm.

**Tab. 7 Caratteristiche ecocardiografiche.**

	AL (N=157)	ATTRm (N=61)	ATTRwt (N=15)	p
Spessore tele-diastolico SIV (mm)	15.8 ± 2.8 ●	16.6 ± 3.8 ■	19.7 ± 4.1	<0.0001
Spessore tele-diastolico PP (mm)	14.6 ± 2.9 ●	15.4 ± 3 ■	17.9 ± 3.8	<0.0001
Spessore parietale medio VS <sub>n</sub> (mm)	15.1 ± 2.7 ●	16 ± 3.2 ■	18.8 ± 3.8	<0.0001
Diametro AS <sub>n</sub> (mm)	46.4 ± 7.3 ◆	43.1 ± 7.7 ■	49.5 ± 6.6	0.002
Frazione di eiezione VS <sub>n</sub> (%)	52.5 ± 13.1 ◆	58 ± 13 ■	44.2 ± 15.4	<0.0001
Frazione di eiezione VS <sub>n</sub> < 40% (N, %)	34 (22)	5 (8) ■	6 (40)	0.009
Diametro tele-diastolico VS <sub>n</sub> (mm)	43.9 ± 6.9	45.5 ± 6.8	46.6 ± 7.5	0.15
Diametro tele-sistolico VS <sub>n</sub> (mm)	29.9 ± 6.3 ●	31.2 ± 8.2 ■	36.3 ± 8.5	0.003
Deceleration time onda E (msec)	160.9 ± 48.3 (89)	182.8 ± 61.4 (55)	168.2 ± 20.8	0.049
Pattern restrittivo VS <sub>n</sub> (n/N, %)	82/150 (55)	22/59 (37)	4/14 (29)	0.024
Versamento pericardico (n/N, %)	100 (64)	36 (59)	12 (80)	0.32
Massa VS <sub>n</sub> nei maschi (n/N, g)	338 ± 105 (84) ●	391 ± 149 (40) ■	512 ± 161 (14)	<0.0001
Spessore setto interatriale (n/N, mm)	8.7 ± 2.4 (45)	8.7 ± 2.3 (35)	9.1 ± 1.1	0.81
Valvole A-V ispessite (n/N, %)	31/66 (47)	36/54 (67)	7/14 (50)	0.08
Voltage/mass ratio (n/N)	0.9 ± 0.5 (151) ●◆	1.1 ± 0.5 (60) ■	1.9 ± 0.5	<0.0001

Test di Bonferroni: ● AL vs ATTRwt, ◆ AL vs ATTRm, ■ ATTRm vs ATTRwt



Associazioni indipendenti riguardo la patogenesi sono state documentate in analisi multivariate: l'aumento dello spessore parietale medio del ventricolo sinistro si associava all'ATTRwt, mentre il voltage/mass ratio era fortemente associato all'ATTRm (Tab.8).

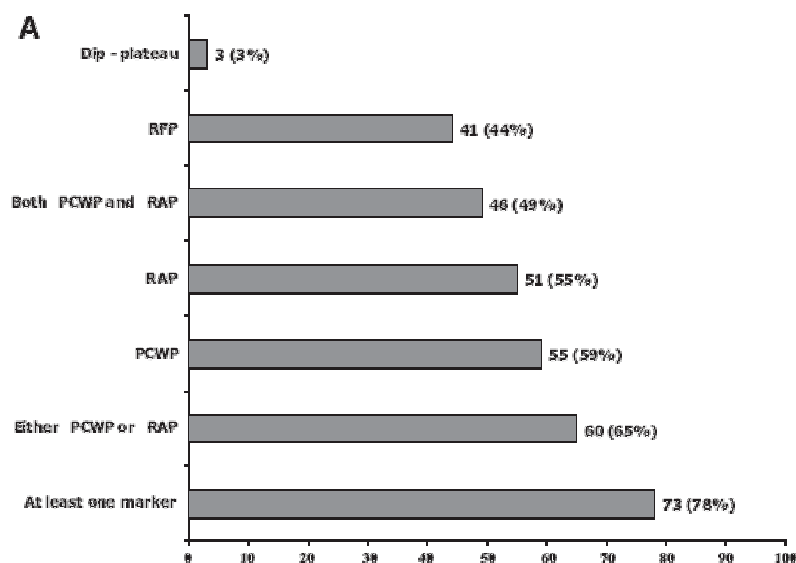
**Tab. 8** Analisi multivariata caratteristiche ecocardiografiche.

	Aumento spessore parietale medio VSn			Aumento voltage/mass ratio			Riduzione frazione di eiezione VSn		
	$\beta$	95% CI	p	$\beta$	95% CI	p	$\beta$	95% CI	p
Età (per ogni anno)	0.04	-0.009-0.08	0.117	-0.00	-0.007-0.006	0.98	-0.17	-0.39-0.06	0.16
Sesso maschile	0.9	-0.22-2.02	0.113	-0.004	-0.16-0.15	0.96	-5.79	-11.45-0.13	0.04
ATTRm	0.87	-0.35-2.09	0.161	0.28	0.10-0.44	0.001	3.04	-2.96-9.04	0.32
ATTRwt	4.08	1.92-6.23	<0.0001	0.12	-0.17-0.42	0.81	-5.16	-15.88-5.56	0.34
Versamento pericardico	1.00	-0.05-2.06	0.06	-0.13	-0.28-0.013	0.075	0.25	-4.96-5.46	0.93

CI = intervallo di confidenza

## DATI EMODINAMICI

L'analisi delle misure emodinamiche è stata ristretta ad un unico centro (Bologna), dove erano disponibili dati di 43 pazienti AL (62%), di 38 pazienti ATTRm (70%) e di 12 pazienti ATTRwt (86%). Differenze all'analisi univariata fra i 3 gruppi sono emerse a riguardo della pressione atriale destra media e aumentata (RAP) e della pressione d'incuneamento capillare media e aumentata (PCWP). La figura 2A riporta le frequenze delle diverse misure espressione di alterata funzione diastolica (aumentata pressione di riempimento del ventricolo sinistro, morfologia della curva di pressione a "dip-plateau", pattern di riempimento del ventricolo sinistro di tipo restrittivo (RFP)). La frequenza delle varie alterazioni variava considerevolmente tra il 78% per almeno un'anomalia delle pressioni di riempimento del ventricolo sinistro e il 3% della morfologia a "dip-plateau" del tracciato della pressione ventricolare destra.



**Fig. 2A** Frequenza delle alterazioni della funzione diastolica.

Confronti fra i 3 tipi patogenetici (Fig.2B) hanno mostrato differenze per misure pressorie singole e combinate. Va sottolineato come i valori anormali siano stati sempre molto frequenti nell'amiloidosi AL.

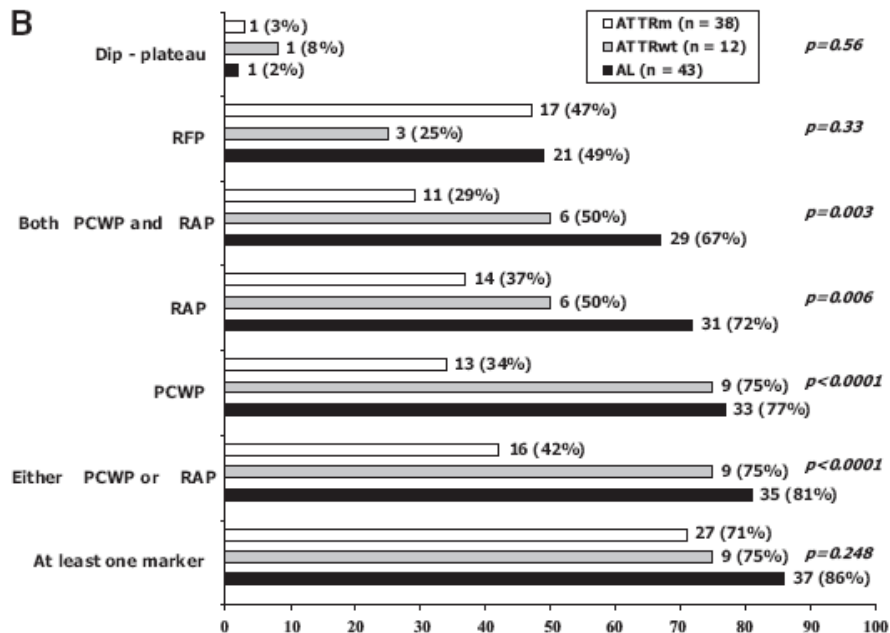


Fig. 2B Frequenza delle alterazioni della funzione diastolica nelle 3 forme eziologiche.

### CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE

Prelievi biotipici clinicamente guidati erano disponibili, presso il centro di Bologna, per gli stessi pazienti di cui si avevano dati emodinamici (rispettivamente di 43 pazienti AL (62%), di 38 pazienti ATTRm (70%) e di 12 pazienti ATTRwt (86%)).

La frequenza della localizzazione vascolare variava fra i 3 sottotipi patogenetici in maniera statisticamente significativa: nel gruppo AL 34/43 (79%), nel gruppo ATTRm 8/38 (21%), nel gruppo ATTRwt 0/12 (0%) ( $p = 0.0001$ ), risultando quindi più comune nelle forme AL.

La frequenza dell'infiammazione è apparsa altrettanto varia: nel gruppo AL 6/43 (14%), nel gruppo ATTRm 1/38 (3%), nel gruppo ATTRwt 4/12 (33%) ( $p = 0.0014$ ), risultando quindi più comune nelle forme ATTRwt (Fig.3).

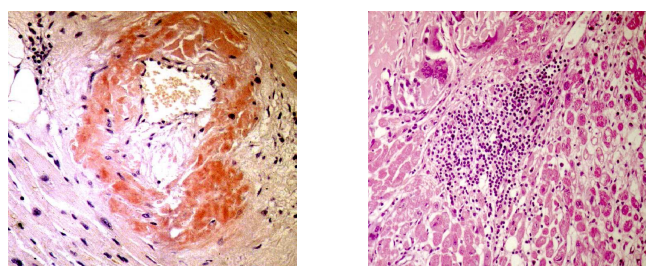


Fig. 3 Localizzazione vascolare (coronarica) ed infiltrato infiammatorio alla BEM.

## OUTCOME

La durata media del follow-up è stata 19 mesi (range interquartile 4 - 46 mesi) nelle AL, 26 mesi (range interquartile 13 - 62 mesi) nelle ATTRm e 19 mesi (range interquartile 10 - 40 mesi) nelle ATTRwt. Tutti i pazienti affetti da AL sono stati trattati con Melphalan e/o Desametasone, e 8 (5%) hanno ricevuto chemioterapia ad alte dosi e trapianto di cellule staminali <sup>37-39</sup>. Un paziente infine è stato sottoposto a trapianto cardiaco seguito da reinfusione di cellule staminali. Dei 61 pazienti affetti da ATTRm, 29 (49%) hanno avuto un trapianto d'organo solido: 20 soggetti hanno ricevuto il trapianto ortotopico di fegato, mentre 9 soggetti sono stati sottoposti a trapianto combinato cuore-fegato <sup>40-43</sup>. Gli eventi cardiaci maggiori avversi (MACE) sono stati i seguenti: morte per cause cardiovascolari in 31 pazienti AL (20%), in 3 pazienti ATTRm (5%) e in 2 pazienti ATTRwt (13%); ospedalizzazione per scompenso cardiaco in 48 pazienti AL (31%), in 10 pazienti ATTRm (16%) e in 4 pazienti ATTRwt (26%); blocco atrio-ventricolare completo in 5 pazienti AL (3%), in 3 pazienti ATTRm (5%) e in 1 paziente ATTRwt (7%); stroke in 5 pazienti AL (11%); fibrillo-flutter atriale in 17 pazienti AL (11%), in 2 pazienti ATTRm (3%) e in 1 paziente ATTRwt (7%). La sopravvivenza globale non aggiustata a 2 anni era del 63% per i pazienti AL, 98% per i pazienti ATTRm e 100% per i pazienti ATTRwt (Fig.4 A-B). La sopravvivenza libera da MACE è stata 51% per i pazienti AL, 77% per i pazienti ATTRm e 69% per i pazienti ATTRwt (Fig.5).

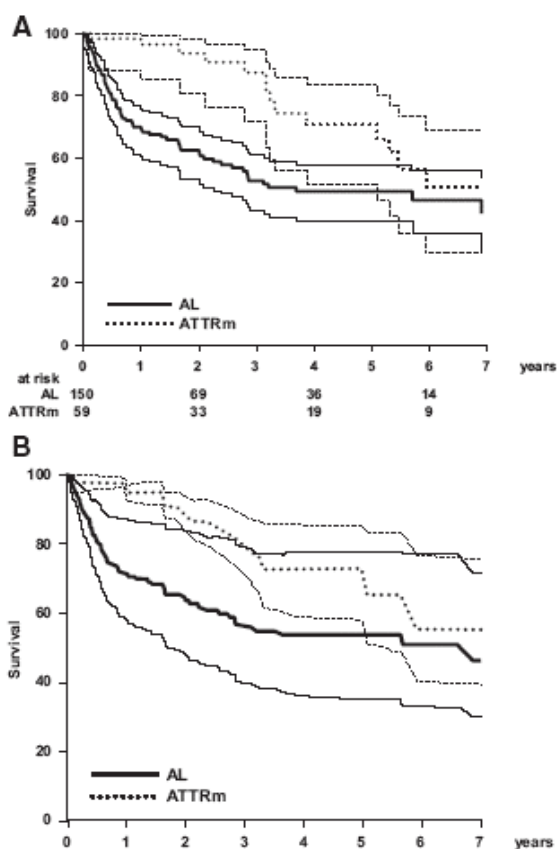


Fig. 4 A-B Sopravvivenza globale degli ATTRm e degli AL prima e dopo aggiustamento per interessamento/insufficienza renale.

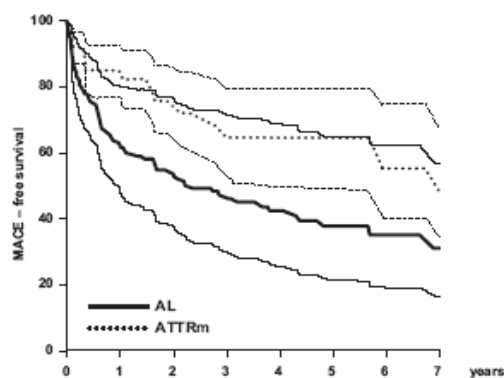


Fig. 5 Sopravvivenza libera da MACE degli ATTRm e degli AL dopo aggiustamento per interessamento/insufficienza renale.

All'analisi multivariata è emerso come i sottotipi ATTRm e ATTRwt siano predittori favorevoli per sopravvivenza globale, mentre un grave scompenso cardiaco (classe funzionale NYHA III o IV), età avanzata e spessore parietale medio del ventricolo sinistro siano predittori sfavorevoli (Tab.9).

Riguardo alla sopravvivenza libera da MACE, ATTRwt era un predittore fortemente favorevole, mentre lo scompenso cardiaco severo (classe funzionale NYHA III o IV), lo spessore parietale medio del ventricolo sinistro, l'insufficienza renale severa e l'età avanzata erano predittori sfavorevoli (il pattern di riempimento del ventricolo sinistro di tipo restrittivo non ha raggiunto la significatività statistica,  $p = 0.08$ ) (Tab.9).

**Tab. 9 Analisi multivariata sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da MACE.**

	HR	95% CI	p
<b>MORTALITÀ TOTALE</b>			
Età (per ogni anno)	1.03	1.002-1.06	<b>0.031</b>
Sesso maschile	0.94	0.48-1.51	0.59
ATTRm vs AL	0.07	0.009-0.55	<b>0.011</b>
ATTRwt vs AL	0.08	0.018-0.41	<b>0.002</b>
Frazione di eiezione VSn	0.98	0.96-1.003	0.09
NYHA III-IV	3.44	1.96-6.05	<b>&lt;0.0001</b>
Interessamento sistema nervoso autonomico	0.76	0.41-1.40	0.38
Spessore parietale medio VSn (per aumento di 1 mm)	1.15	1.04-1.27	<b>0.006</b>
Pattern di riempimento VSn di tipo restrittivo	1.18	0.67-2.09	0.58
Insufficienza renale	1.43	0.83-2.45	0.20
<b>MACE</b>			
Età (per ogni anno)	1.04	1.01-1.06	<b>&lt;0.0001</b>
Sesso maschile	0.86	0.52-1.41	0.54
ATTRm vs AL	0.62	0.29-1.29	0.20
ATTRwt vs AL	0.31	0.11-0.89	<b>0.029</b>
Frazione di eiezione VSn	0.99	0.97-1.009	0.31
NYHA III-IV	3.44	2.13-5.55	<b>&lt;0.0001</b>
Interessamento sistema nervoso autonomico	1.08	0.65-1.77	0.77
Spessore parietale medio VSn (per aumento di 1 mm)	1.12	1.03-1.22	<b>0.009</b>
Pattern di riempimento VSn di tipo restrittivo	1.51	0.95-2.41	0.08
Insufficienza renale	1.64	1.03-2.62	<b>0.038</b>

HR = hazard ratio; CI = intervallo di confidenza

## **STUDIO DEI PAZIENTI AFFETTI DA ATTRm**

Dei 500 pazienti con diagnosi di amiloidosi sistemica, osservati nei due centri di riferimento, 154, esclusi i portatori asintomatici della mutazione al momento della diagnosi (soggetti con assenza di coinvolgimento clinico/strumentale neurologico e cardiologico) hanno ricevuto la diagnosi di ATTRm e sono stati oggetto dello studio.

La tabella 10 sintetizza le principali caratteristiche cliniche e genotipiche dei pazienti studiati, secondo la consueta separazione per ATTRm tra soggetti portatori della mutazione Val30Met e soggetti portatori di altre mutazioni della transtiretina (non Val30Met).

**Tab. 10** Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da ATTRm.

	<b>Totale (n=154)</b>	<b>Val30Met (n=43)</b>	<b>Altre mutazioni (n=111)</b>
Famiglie (N)	62	16	46
Sesso maschile (N,%)	106 (69)	32 (74)	74 (66)
Età alla diagnosi (anni)	52 ± 14	53 ± 17	51 ± 13
Percorso diagnostico:			
neurologico (N,%)	114 (74)	38 (88)	76 (68)
cardiologico (N,%)	21 (14)	0 (0)	21 (19)
screening familiare (N,%)	19 (12)	5 (12)	14 (13)
Età esordio sintomi (anni)	49 ± 14	50 ± 16	48 ± 13
Neuropatia periferica sensitivo-motoria (Andrade):			
0 (N,%)	12 (8)	2 (5)	10 (10)
1 (N,%)	76 (49)	27 (62)	49 (44)
2 (N,%)	57 (37)	11 (26)	46 (41)
3 (N,%)	9 (6)	3 (7)	6 (5)
Interessamento autonomico:			
ipotensione ortostatica sintomatica (N,%)	46 (30)	7 (16)	39 (35)
incontinenza urinaria (N,%)	40 (26)	14 (33)	26 (23)
sintomi gastro-intestinali (diarrea/stipsi) (N,%)	70 (44)	24 (56)	46 (41)
NYHA III-IV (N, %)	16 (10)	0 (0)	16 (14)
Interessamento vitreale (N,%)	16 (10)	2 (4)	14 (13)

Oltre alla Val30Met erano presenti nella casistica altre 21 mutazioni della transtiretina, provenienti da 62 diverse famiglie:

<b>MUTAZIONE</b>	<b>PAZIENTI (N,%)</b>	<b>FAMIGLIE (N)</b>
Val30Met	43 (28)	16
Glu89Gln	34 (21.9)	8
Ile68Leu	16 (10.3)	11
Thr49Ala	11 (7.1)	1
Phe64Leu	10 (6.4)	7
Gly47Ala	7 (4.5)	2
Ala36Pro	6 (3.8)	1
Arg34Thr	5 (3.2)	1
Ser50Arg	4 (2.5)	2
Glu54Lys	3 (2)	1

Gly47Arg	3 (2)	1
Ser23Asn	2 (1.3)	2
Phe33Val	1 (0.7)	1
Hys88Arg	1 (0.7)	1
Val30Ala	1 (0.7)	1
Val14Leu	1 (0.7)	1
Gly53Ala	1 (0.7)	1
Gly57Arg	1 (0.7)	1
Tyr78Phe	1 (0.7)	1
Ile107Phe	1 (0.7)	1
Val122Ile	1 (0.7)	1
Thr59Lys	1 (0.7)	1
<b>TOTALE</b>	<b>154 (100)</b>	<b>62</b>

Tutti i pazienti, eccetto 1, erano di discendenza italiana (la famiglia di un soggetto affetto da ATTRm era originaria della Repubblica di Macedonia).

### ANALISI DEI TIPI DI COINVOLGIMENTO CARDIACO

All'interno della popolazione in oggetto sono stati analizzati quali fossero i principali tipi di interessamento cardiaco e con quale frequenza si presentassero. Tale analisi è stata effettuata sia “dal punto di vista del coinvolgimento cardiaco”, come descritto nella figura 6, descrivendo cioè in maniera non mutuamente esclusiva per ogni paziente, tutti i possibili tipi di interessamento; sia “dal punto di vista dei pazienti”, considerando in maniera mutuamente esclusiva per ogni soggetto i possibili rilievi clinici/strumentali in ordine di gravità (Fig. 7).

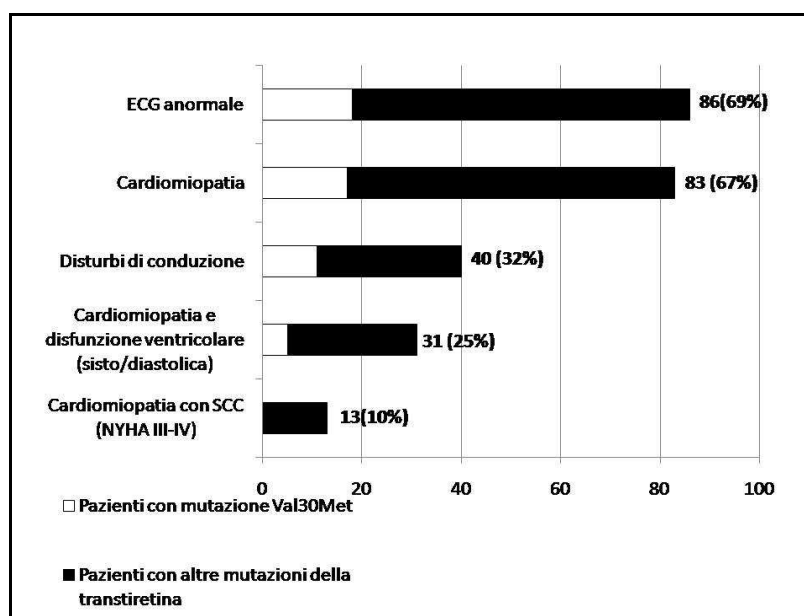
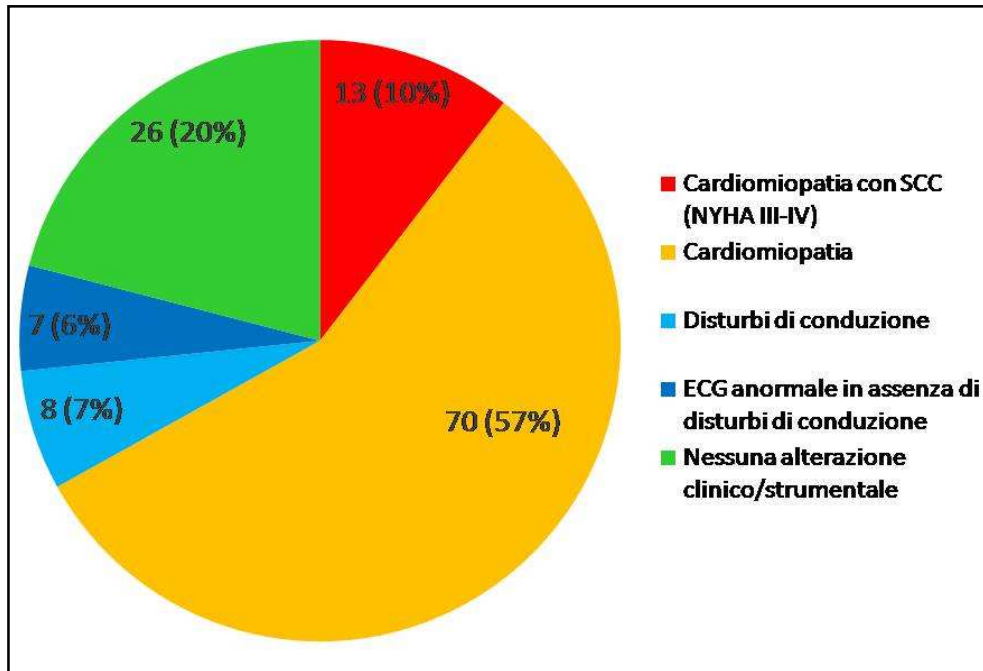


Fig. 6 Prevalenza dei diversi rilievi cardiologici nei pazienti affetti da ATTRm, secondo la consueta divisione Val30Met/non-Val30Met.



**Fig. 7** Frequenza nell'ATTRm dei diversi rilievi (clinici, elettrocardiografici ed ecocardiografici) di interessamento cardiaco alla prima osservazione, analizzati in maniera mutuamente esclusiva per ogni paziente, con priorità di importanza in ordine a: cardiomiopatia con scompenso cardiaco, cardiomiopatia, disturbi di conduzione, ECG patologico (in assenza di disturbi di conduzione), nessuna alterazione clinico/strumentale. Per disturbo di conduzione si è intesa la presenza di blocco di branca destra o sinistra, emiblocco anteriore sinistro, blocco atrio-ventricolare. Per cardiomiopatia si è intesa la presenza di cardiomiopatia amiloidotica in classe NYHA I-II al momento della diagnosi.

Come si evidenzia dai grafici, la cardiomiopatia si rivela essere presente in maniera paragonabile alle alterazioni elettrocardiografiche isolate (67 vs 69%), e in misura nettamente prevalente rispetto ai disturbi di conduzione (67 vs 32%).

Se poi si considerano i vari interessamenti in maniera mutuamente esclusiva in ordine di gravità, la cardiomiopatia risulta di gran lunga l'alterazione clinico/strumentale più frequente (57%), mentre i disturbi di conduzione isolati si riscontrano in una percentuale molto minore di pazienti (6%).

Confrontando i pazienti che presentavano cardiomiopatia accertata con i pazienti con alterazioni elettrocardiografiche isolate, non sono emerse differenze statisticamente significative.

E' stata però documentata una chiara tendenza dei soggetti con solo interessamento elettrocardiografico a presentare un'età minore al momento della diagnosi.

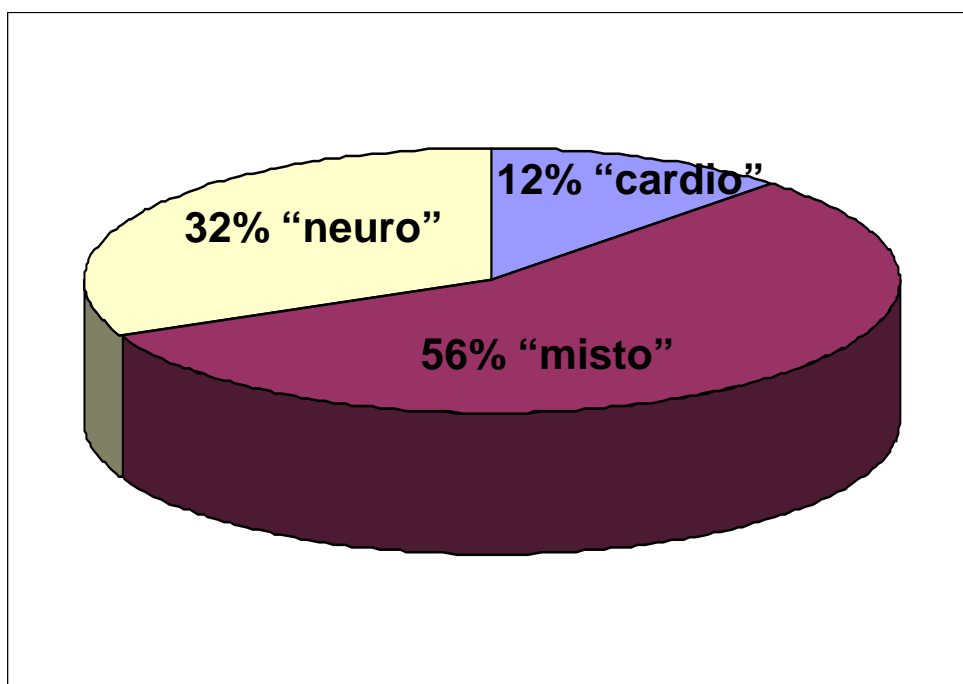
Inoltre è da sottolineare il fatto che almeno il 13% dei pazienti con cardiomiopatia avesse un tracciato elettrocardiografico nei limiti della norma.

## ANALISI DEI PRINCIPALI FENOTIPI DI PRESENTAZIONE CLINICA

Tutti i pazienti in studio sono stati in seguito selezionati in relazione al fenotipo di presentazione della malattia al momento della diagnosi.

Sono stati individuati soggetti con interessamento cardiaco esclusivo (fenotipo “CARDIO”), soggetti con interessamento neurologico esclusivo (fenotipo “NEURO”) e pazienti con presenza al momento della diagnosi di segni/sintomi di coinvolgimento sia neurologico che cardiologico (fenotipo “MISTO”).

In figura 8 sono schematicamente rappresentate le frequenze relative ai tre fenotipi all’interno dell’intera popolazione.



**Fig. 8** Distribuzione dei 3 fenotipi all’interno della popolazione dell’ATTRm.

Le principali caratteristiche cliniche e genotipiche dei tre diversi gruppi, in accordo con il fenotipo di presentazione clinica, sono elencate nella tabella 11.

Dai dati emerge come i pazienti con interessamento cardiaco esclusivo siano più del 10% del totale, e si caratterizzino per una netta prevalenza del sesso maschile e per una età maggiore, rispetto agli altri pazienti, al momento della diagnosi e dell’insorgenza dei sintomi.

Dal punto di vista genotipico è evidente il contributo prevalente (circa 67%) tra questi pazienti della mutazione Ile68Leu, e l’assenza di soggetti con mutazione Val30Met.

Le mutazioni Glu89Gln e Thr49Ala sembrano avere un particolare “tropismo” per il fenotipo “MISTO”, con una netta prevalenza di soggetti con interessamento cardiaco e neurologico compresenti al momento della prima osservazione.



**Tab. 11 Principali caratteristiche cliniche e genotipiche in accordo con i 3 fenotipi.**

	“CARDIO”	“MISTO”	“NEURO”	p
Pazienti (N,%)	18 (12)	86 (56)	50 (32)	n.a.
Maschi (N,%)	17 (94)	62 (72)	27 (54)	<b>0.004</b>
Famiglie (N)	16	42	27	n.a.
Mutazione TTR (N,%):				
• Ile68Leu	12 (66.6)	1 (1.1)	3 (6)	<b>&lt;0.001</b>
• Val30Met	0 (0)	24 (27.9)	19 (38)	<b>0.009</b>
• Val14Ile	1 (5.5)	0 (0)	0 (0)	<b>0.022</b>
• Hys88Arg	1 (5.5)	0 (0)	0 (0)	<b>0.022</b>
• Glu89Gln	1 (5.5)	25 (29)	8 (16)	0.088
• Ser23Asn	1 (5.5)	1 (1.1)	0 (0)	0.2
• Tyr78Phe	1 (5.5)	0 (0)	0 (0)	<b>0.022</b>
• Gly57Arg	1 (5.5)	0 (0)	0 (0)	<b>0.022</b>
• Thr49Ala	0 (0)	9 (10.4)	2 (4)	0.169
• Phe64Leu	0 (0)	4 (4.6)	6 (12)	0.226
• Gly47Ala	0 (0)	4 (4.6)	3 (6)	0.576
• Arg34Thr	0 (0)	3 (3.4)	2 (4)	0.701
• Ala36Pro	0 (0)	4 (4.6)	2 (4)	0.650
• Ser50Arg	0 (0)	3 (3.4)	1 (2)	0.664
• Glu54Lys	0 (0)	2 (2.3)	1 (2)	0.804
• Gly47Arg	0 (0)	1 (1.1)	2 (4)	0.419
• Phe33Val	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0.67
• Val30Ala	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0.67
• Thr59Lys	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0.67
• Gly53Ala	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0.67
• Val122Ile	0 (0)	0 (0)	1 (2)	0.351
• Ile107Phe	0 (0)	1 (1.1)	0 (0)	0.67
Età alla diagnosi (anni)	64 ± 9	53 ± 13	45 ± 16	<b>&lt;0.001</b>
Percorso diagnostico:				
neurologico (N,%)	0 (0)	80 (93)	36 (72)	<b>&lt;0.001</b>
cardiologico (N,%)	18 (100)	3 (3)	0 (0)	<b>&lt;0.001</b>
screening familiare (N,%)	0 (0)	3 (3)	14 (28)	<b>&lt;0.001</b>
Età esordio malattia (anni)	61 ± 9	49 ± 12	43 ± 16	<b>&lt;0.001</b>

Nell’ambito dei pazienti con interessamento cardiaco accertato, sono state confrontate le caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche (Tab. 12) dei pazienti con interessamento miocardico esclusivo rispetto a quelle dei soggetti con interessamento neurologico associato.

Dai rilievi elettrocardiografici emerge una significativa differenza per quanto riguarda la presenza di fibrillazione atriale, necessità di pacemaker, ampiezza dei voltaggi del QRS, presenza di alterazioni della ripolarizzazione ventricolare e di allungamento dell'intervallo QTc.

Dal punto di vista ecocardiografico il fenotipo "CARDIO" si differenzia per una maggiore compromissione morfo-funzionale del ventricolo sinistro (in riferimento ad ispessimento del setto interventricolare, ampiezza del diametro atriale sinistro, riduzione della frazione di eiezione, diametro tele-diastolico e tele-sistolico, massa), per una maggiore frequenza di versamento pericardico e di ispessimento delle valvole A-V.

**Tab. 12 Principali caratteristiche elettrocardiografiche ed ecocardiografiche dei pazienti con interessamento cardiaco esclusivo rispetto ai soggetti con fenotipo "MISTO".**

	"CARDIO" (n=18)	"MISTO" (n=86)	p
<b>ELETTROCARDIOGRAMMA</b>			
Fibrillazione atriale (N,%)	3 (17)	2 (2)	<b>0.048</b>
Pacemaker (N,%)	2 (11)	0 (0)	<b>0.029</b>
BAV I ° (N,%)	2 (11)	11 (13)	0.845
QRS score (mV)	133 ± 37	106 ± 29	<b>&lt;0.001</b>
Bassi voltaggi QRS (N,%)	6 (33)	16+8 (21)	0.408
BBDx (N,%)	3 (17)	6 (7)	0.367
BBSn (N,%)	1 (6)	4 (5)	0.658
Emiblocco anteriore sn (N,%)	6 (33)	23 (27)	0.781
Ipertrofia VS <sub>n</sub> (Sokolow >35 mm) (N,%)	2 (11)	1 (1)	0.129
Pseudonecrosi (N,%)	10 (56)	40 (47)	0.661
Alterazioni ischemiche (onde T negative) (N,%)	10 (56)	21 (24)	<b>0.019</b>
QTc (msec)	489 ± 51	389 ± 138	<b>0.003</b>
ECG normale (N,%)	0 (0)	10 (12)	0.279
<b>ECOCARDIOGRAMMA</b>			
Spessore tele-diastolico SIV (mm)	18 ± 3	16 ± 4	<b>0.048</b>
Spessore tele-diastolico PP (mm)	16 ± 3	15 ± 3	0.201
Diametro AS <sub>n</sub> (mm)	49 ± 7	41 ± 7	<b>&lt;0.001</b>
Frazione di eiezione VS <sub>n</sub> (%)	46 ± 10	58 ± 13	<b>&lt;0.001</b>
Frazione di eiezione VS <sub>n</sub> < 40% (N,%)	5 (28)	6 (7)	<b>0.026</b>
Diametro tele-diastolico VS <sub>n</sub> (mm)	61 ± 21	51 ± 16	<b>0.025</b>
Diametro tele-sistolico VS <sub>n</sub> (mm)	34 ± 20	22 ± 10	<b>&lt;0.001</b>
Deceleration time onda E (msec)	172 ± 67	176 ± 56	0.791
Pattern restrittivo VS <sub>n</sub> (N,%)	7 (39)	22 (26)	0.392
Versamento pericardico (N,%)	10 (56)	23 (27)	<b>0.035</b>
Massa VS <sub>n</sub> nei maschi (n/N, g/m <sup>2</sup> )	236 ± 55 (17)	196 ± 66 (62)	<b>0.025</b>
Spessore setto interatriale (mm)	9 ± 2	8 ± 3	0.180
Valvole A-V ispessite (N,%)	12 (67)	31 (36)	<b>0.033</b>
Voltage/mass ratio	4 ± 1	4 ± 2	1

## ANALISI DEI PAZIENTI CON INTERESSAMENTO CARDIACO ESCLUSIVO

Per meglio caratterizzare e possibilmente identificare i fattori ritardanti la diagnosi, i percorsi diagnostici e la familiarità dei pazienti con interessamento cardiaco esclusivo nell'ambito dell'ATTRm, sono stati analizzati singolarmente 14 soggetti con fenotipo "CARDIO", riferiti al centro di Bologna, come esposto nella tabella 13.

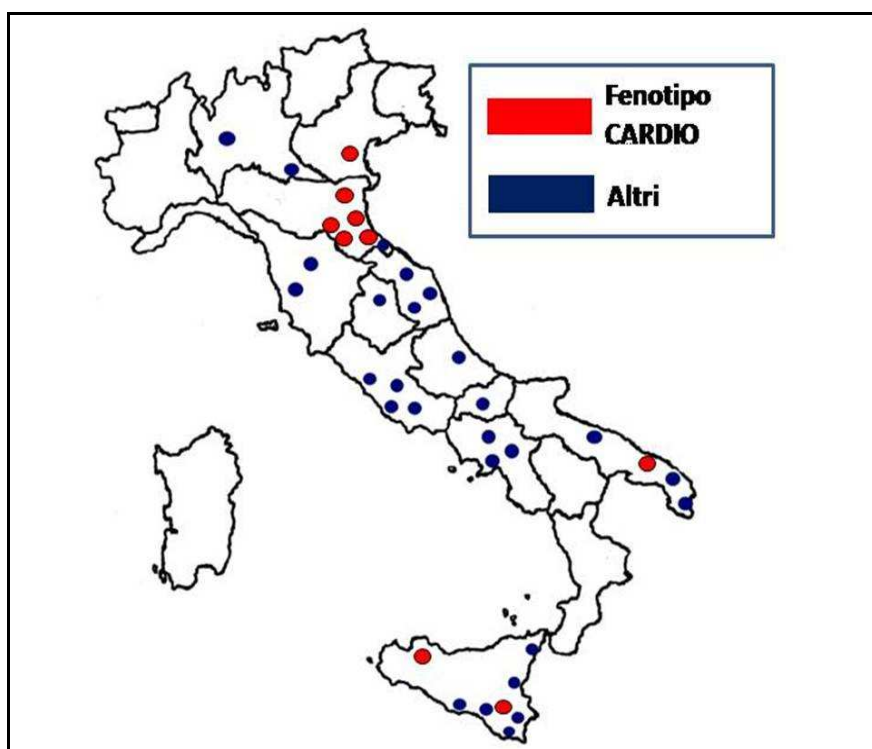


Fig. 9 Provenienza geografica delle famiglie affette da ATTRm.

Nella figura 9 sono invece schematizzate le provenienze geografiche delle famiglie dell'intera popolazione e dei pazienti con interessamento cardiaco esclusivo.

Tab. 13 Principali caratteristiche dei 14 pazienti con interessamento cardiaco esclusivo, riferiti al centro di Bologna.

Pz.	Sesso	Mutazione TTR	Età alla diagnosi	Età all'esordio	Percorso diagnostico (sintomi)	Diagnosi precedente	Familiarità
1	M	Ile68Leu	68	66	Cardiaco (dispnea)	Cardiopatia ipertensiva	Fratello deceduto a 67 anni per causa non nota
2	M	Ile68Leu	49	47	Cardiaco (scompenso cardiaco)	CMPI	Padre deceduto a 64 anni per scompenso cardiaco ad eziologia ignota

3	M	Hys88Arg	55	50	Cardiaco (scompenso cardiaco)	CMPD	Padre deceduto per morte improvvisa
4	M	Ile68Leu	70	62	Cardiaco (dispnea da sforzo)	Cardiopia ipertensiva	/
5	F	Ser23Asn	45	44	Cardiaco (scompenso cardiaco)	nessuna	Madre deceduta per morte improvvisa
6	M	Glu89Gln	59	59	Cardiaco (scompenso cardiaco)	nessuna	Cugina affetta deceduta a 67 anni per scompenso cardiaco
7	M	Ile68Leu	52	51	Cardiaco (dispnea da sforzo)	nessuna	Sorella portatrice della stessa mutazione, asintomatica fino a 67 anni (PNP sensitiva)
8	M	Val14Ile	62	55	Cardiaco (dispnea e astenia)	CMPD	/
9	M	Ile68Leu	78	69	Cardiaco (angina pectoris)	Cardiopia ischemica	/
10	M	Ile68Leu	70	69	Cardiaco (dispnea da sforzo)	CMPI	Figlia portatrice sana della stessa mutazione
11	M	Ile68Leu	64	63	Cardiaco (fibrillazione atriale)	nessuna	/
12	M	Ile68Leu	66	67	Cardiaco (blocco A-V II°)	nessuna	Figlia portatrice sana della stessa mutazione

13	M	Ile68Leu	70	61	Cardiaco (sindrome coronarica acuta)	Cardiopatìa ischemica	/
14	M	Ile68Leu	66	66	Cardiaco (scompenso cardiaco)	nessuna	/

CMPI = cardiomiopatia ipertrofica

CMPD = cardiomiopatia dilatativa

PNP = polineuropatia (amiloidotica)

Da questa breve schematizzazione dei 14 pazienti “CARDIO” emergono:

- il netto ruolo protettivo del sesso femminile, perlomeno per i pazienti con mutazione Ile68Leu. Almeno in tre casi infatti un parente di primo grado, anche di età maggiore ma di sesso femminile, risulta essere portatore asintomatico della malattia o risulta presentare unicamente un lieve interessamento neurologico;
- la reale difficoltà diagnostica in questi casi per il cardiologo clinico. In quasi tutti i casi i pazienti erano stati valutati da un cardiologo e in ben 9 casi su 14 avevano ricevuto una diagnosi errata (più frequentemente cardiomiopatia ipertrofica o cardiopatia ipertensiva).

## DISCUSSIONE

Questo lavoro rappresenta il più vasto studio di follow-up disponibile in letteratura sull'amiloidosi cardiaca, innanzitutto grazie alla peculiarità e originalità del "setting" clinico.

Il network creato tra i dipartimenti di Cardiologia, Ematologia, Nefrologia, Neurologia del nostro Policlinico e il dipartimento di Genetica Medica dell'Università degli Studi di Ferrara, nonché la stretta collaborazione con il Policlinico universitario di Pavia, fanno sì che i pazienti siano riferiti per problemi relati a tutte le diverse sfaccettature cliniche tipiche della patologia amiloidotica, mettendo in luce l'ampia diversità dei possibili quadri di presentazione, e permettendo la raccolta di una ampia serie di casi.

I risultati evidenziano profonde differenze fra i 3 più frequenti tipi eziopatogenetici (AL, ATTRm e ATTRwt) di amiloidosi, in termini di profilo patologico e di outcome a lungo termine.

La consapevolezza di questa eterogeneità potrebbe aiutare ad orientare sia aspetti di work-up diagnostico dei pazienti con sospetta amiloidosi cardiaca, sia la gestione clinica successiva.

Relativamente poco è noto circa la relazione tra le cause di amiloidosi, i vari tipi e la severità del coinvolgimento cardiaco. Due studi di un unico centro si sono focalizzati sulle differenze tra AL e ATTRwt<sup>22</sup> e AL e ATTRm<sup>23</sup>. In entrambi i confronti, l'AL è stata associata ad una prognosi peggiore e ad una più rapida progressione dello scompenso cardiaco (nonostante un maggior coinvolgimento cardiaco morfologico nell'ATTRwt e l'assenza di apparenti differenze nel coinvolgimento cardiaco tra AL e ATTRm)<sup>44</sup>.

Il lavoro descrive un' ampia coorte di pazienti affetti da tutte e 3 le principali forme di amiloidosi cardiaca sistemica, facilitato dall'attività coordinata tra due centri di riferimento italiani per la malattia (Bologna e Pavia).

Al momento della prima osservazione i pazienti mostravano le differenze cliniche attese<sup>26</sup>, inclusi un'alta prevalenza di disfunzioni neurologiche nell'ATTRm, l'interessamento renale nelle AL e lo scompenso cardiaco sia nelle AL sia nell'ATTRwt (condizione patologica ritenuta limitata agli uomini anziani)<sup>22,29,45</sup>. L'elevata prevalenza di sindrome del tunnel carpale nei pazienti affetti da ATTRm supporta il concetto che questa condizione preceda frequentemente la diagnosi di cardiomiopatia in questi soggetti<sup>15,46</sup>.

La severità dell'amiloidosi cardiaca è comunemente descritta in termini di aumento degli spessori parietali e compromissione della funzione sisto-diastolica del ventricolo sinistro. E' interessante notare come alterazioni in questi tre indicatori di coinvolgimento cardiaco non sembrino andare di pari passo nei 3 sottogruppi. Morfologicamente, le misure degli spessori parietali del ventricolo sinistro variavano largamente fra i 3 tipi di amiloidosi, con il gruppo ATTRwt, che ha mostrato i più alti valori medi (da 3 a 4 mm maggiori rispetto ad AL e ATTRm). Tutti i pazienti avevano un ventricolo sinistro non aumentato di volume, ma con valori di frazione di eiezione profondamente differenti, con tendenza alla normalità negli ATTRm, ai limiti inferiori della norma negli AL e marcatamente ridotti negli ATTRwt. In parallelo, il valore del diametro atriale medio tendeva ad

essere normale negli ATTRm, lievemente aumentato negli AL ed elevato negli ATTRwt. E' inoltre interessante notare come l'ispessimento delle valvole atrio-ventricolari appariva essere particolarmente frequente nelle 2 forme transtiretino-relate. Una spiegazione plausibile per queste osservazioni morfologiche riguarda la durata della deposizione di amiloide, che sembra essere molto più protratta nelle 2 forme secondarie alla deposizione di transtiretina.

Sebbene l'amiloidosi sia considerata una forma di cardiomiopatia restrittiva (cardiomiopatia con aumentata rigidità delle pareti ventricolari con conseguenti marcati incrementi della pressione endoventricolare a fronte di piccoli incrementi di volume)<sup>36</sup>, la maggioranza dei pazienti nei 3 gruppi non mostrava un pattern di riempimento restrittivo. Sottanalisi dei dati emodinamici iniziali (una delle più vaste serie di dati attualmente disponibili) evidenziano differenze statisticamente significative fra le 3 forme patogenetiche. Fino ad un quinto dei pazienti con valutazione emodinamica non mostravano alcun rilievo anormale (Fig. 2A-B). I 3 gruppi presentavano differenze emodinamiche rilevanti: i pazienti AL hanno più spesso alterazioni nelle differenti misure della funzione diastolica. La più elevata frequenza di alterazioni emodinamiche nei pazienti AL contrasta con il loro minor grado di coinvolgimento morfologico (in termini di valori di spessori parietali del ventricolo sinistro).

Tale mismatch potrebbe essere plausibilmente attribuito alla ben nota tossicità diretta delle catene leggere libere circolanti delle immunoglobuline nella forma AL<sup>47,48</sup>, unitamente ad altri possibili co-fattori. Per inciso, è ragionevole ipotizzare che una maggior frequenza di localizzazione vascolare (coronarica) dei depositi di amiloide nei soggetti affetti da AL, potrebbe essere responsabile di ischemia miocardica, contribuendo alla disfunzione ventricolare. Inoltre, la deposizione graduale nelle forme transtiretino-relate potrebbe lasciare all'organismo il tempo di sviluppare meccanismi di compensazione locale (scenario meno plausibile nella cardiomiopatia amiloidotica a rapido sviluppo dei pazienti AL).

I differenti precursori proteici dell'amiloidosi possono anche determinare differenti gradi di danno miocardico. La misura di marker biochimici come il Peptide Natriuretico Atriale (ANP) e la Troponina, che danno un valido contributo nel valutare il coinvolgimento miocardico nell'amiloidosi sistemica<sup>49-51</sup>, possono far luce su questa eventualità (limiti di numero hanno precluso un'analisi significativa nel presente studio). E' interessante il fatto che l'unico studio attualmente disponibile di comparazione di questi biomarker nelle differenti forme di cardiomiopatia amiloidotica, abbia evidenziato come i valori di ANP e Troponina siano minori nell'ATTRm rispetto all'AL<sup>51,52</sup>.

L'ECG è considerato avere un ruolo chiave nell'orientare il sospetto diagnostico di amiloidosi cardiaca, con i bassi voltaggi del QRS, che rappresentano un indizio non invasivo di particolare valore. Il presente studio ha riguardato pazienti con diagnosi certa per tipo di amiloidosi cardiaca, incluso un numero apprezzabile di soggetti con malattia transtiretino-relata (sia ATTRm che ATTRwt): in questo contesto la prevalenza di bassi voltaggi del QRS al momento della diagnosi era alquanto minore rispetto al altri report della letteratura (in totale circa 45%) ed era particolarmente bassa nel sottogruppo ATTRm (25%) nonostante una maggiore infiltrazione miocardica (come indicato dai valori medi di spessore ventricolare). Pertanto il voltage/mass ratio era maggiore nelle

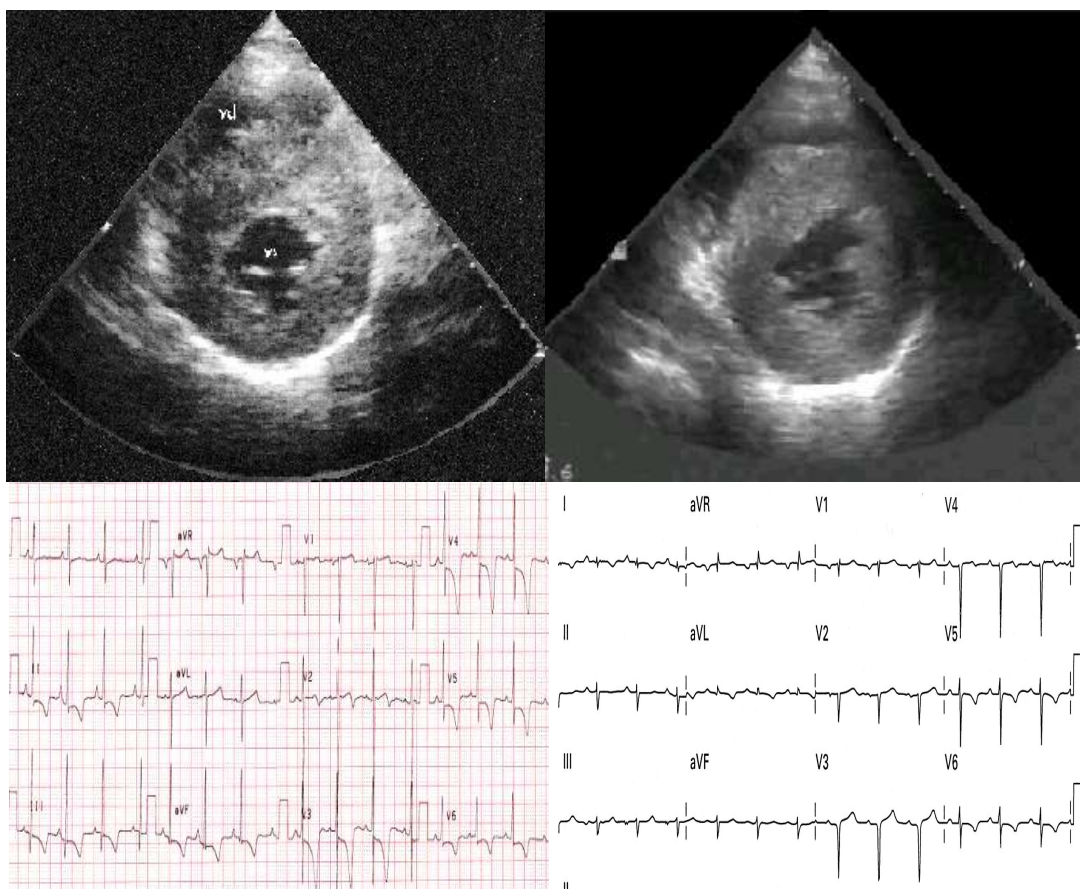
amiloidosi TTR-relate che nelle AL. Inoltre all'analisi multivariata, ATTRm si è dimostrata negativamente associata con i bassi voltaggi del QRS.

Fisiopatologicamente questi rilievi dipingono uno scenario intrigante per una malattia infiltrativa: voltaggi del QRS più alti in pazienti con maggiori spessori parietali ventricolari (nelle due forme TTR-relate). Una possibile spiegazione per questi rilievi potrebbe essere un maggior danno alle cellule miocardiche (rispetto all'incremento di spessore parietale ventricolare) indotto dalla tossicità delle catene leggere libere circolanti delle immunoglobuline nella forma AL.

Un'altra scoperta interessante riguarda la presenza relativamente frequente del blocco di branca sinistra nei pazienti in studio, specialmente in quelli con malattia transtiretino-relata (maggiore del 40% nelle forme ATTRwt). Considerate unitariamente queste osservazioni rimarcano l'importanza di non escludere a priori una diagnosi di cardiomiopatia amiloidotica (soprattutto nelle forme TTR-relate) sulla base di normali voltaggi del QRS o di presenza di blocco di branca sinistra.

Pertanto nell'iter che conduce alla diagnosi finale di amiloidosi cardiaca, è essenziale la fase di sospetto diagnostico, che data l'assenza di segni clinici specifici, spesso nasce dal riscontro di anomalie elettrocardiografiche o ecocardiografiche.

Una lettura integrata ECG-ECOCG rappresenta l'approccio diagnostico più corretto, che consente non solo di fare diagnosi, differenziando la cardiomiopatia amiloidotica da quella ipertrofica e da quella restrittiva idiopatica<sup>53</sup>, ma anche di individuarne l'eziologia specifica (Fig.10).



**Fig. 10** Lettura integrata ECG-ECOCG per la diagnosi di cardiomiopatia amiloidotica.



Per quanto riguarda l'outcome clinico, sono state registrate differenze sostanziali in termini di sopravvivenza totale e libera da eventi cardiaci maggiori avversi (MACE) fra i 3 gruppi, che sembra contrastare con il grado di interessamento morfologico. In particolare il gruppo con minori alterazioni morfologiche (AL) aveva un decorso clinico piuttosto aggressivo. Al contrario il gruppo che mostrava i maggiori spessori parietali del ventricolo sinistro (ATTRwt) è sembrato avere un decorso clinico meno aggressivo, nonostante un'età media maggiore. Queste possibili discrepanze potrebbero dipendere sia da fattori cardiologici sia da fattori non cardiologici. I pazienti affetti da AL potrebbero essere penalizzati dalla severità apparentemente maggiore del danno emodinamico, così come dall'interessamento multiorgano. Va notato come, all'analisi multivariata, lo spessore parietale medio del ventricolo sinistro si sia rivelato essere un predittore di sopravvivenza, insieme all'età e alla severità dello scompenso cardiaco (sorprensamente solo deboli associazioni sono emerse per il pattern di riempimento di tipo restrittivo e la frazione di eiezione del ventricolo sinistro).

Nell'ambito dello studio riguardo i casi di ATTRm, essendo i pazienti riferiti da tutto il territorio italiano, è emersa un'ampia eterogeneità, anche di tipo familiare, sia in assoluto sia all'interno delle singole mutazioni. La non endemicità dell'Italia per la mutazione Val30Met della transtiretina garantisce infatti il vasto spettro delle mutazioni rappresentate nella nostra popolazione. La collaborazione all'interno del network tra i vari dipartimenti ha permesso infine che i pazienti ricevessero contestualmente un'approfondita valutazione neurologica e cardiologica, sia clinica che strumentale.

Dall'analisi emerge come la cardiomiopatia amiloidotica sia frequente in tutte le mutazioni della TTR presenti in Italia, in maniera paragonabile alle alterazioni elettrocardiografiche e in misura quasi doppia rispetto alle turbe di conduzione, ritenute soprattutto nel coinvolgimento subendocardico delle forme Val30Met, il principale segno di interessamento miocardico. Se si vanno ad analizzare i singoli rilievi considerandoli in maniera mutuamente esclusiva in ordine di gravità, la cardiomiopatia in assenza di scompenso cardiaco congestizio, risulta essere il segno/sintomo più rappresentato, in assenza in più del 10% dei casi di alterazioni dell'elettrocardiogramma. Pertanto un ecocardiogramma orientato dal punto di vista diagnostico in tal senso, risulta determinante in contesti evocativi di patologia amiloidotica<sup>54</sup>.

Dal punto di vista elettrocardiografico si riconferma la non alta sensibilità dei bassi voltaggi del QRS, la cui presenza è spesso ritenuta necessaria per orientare il sospetto diagnostico verso la diagnosi di amiloidosi cardiaca.

Dall'analisi effettuata emerge la presenza di un sottogruppo di pazienti (pari al 12%) di una ampia popolazione caucasica, in un contesto "non endemico" di malattia, che presenta al momento della diagnosi di amiloidosi sistemica un interessamento esclusivamente miocardico (fenotipo "CARDIO"). Tali pazienti sono stati confrontati con pazienti con fenotipo neurologico ("NEURO") e con pazienti con fenotipo "MISTO", per possibili analogie e differenze.

Dallo studio emerge come, a dispetto di quanto ritenuto precedentemente in letteratura (anche se segnalato solo in forma aneddotica), non esistano mutazioni con tropismo esclusivamente cardiaco

e mutazioni con tropismo esclusivamente neurologico, ma come lo spettro di presentazione sia un continuum tra forme esclusivamente/prevalentemente cardiache fino a forme esclusivamente/prevalentemente neurologiche, in un ampio ventaglio di possibili presentazioni, nel quale il tipo di mutazione della transtiretina si rivela essere la principale variabile (Fig. 11).

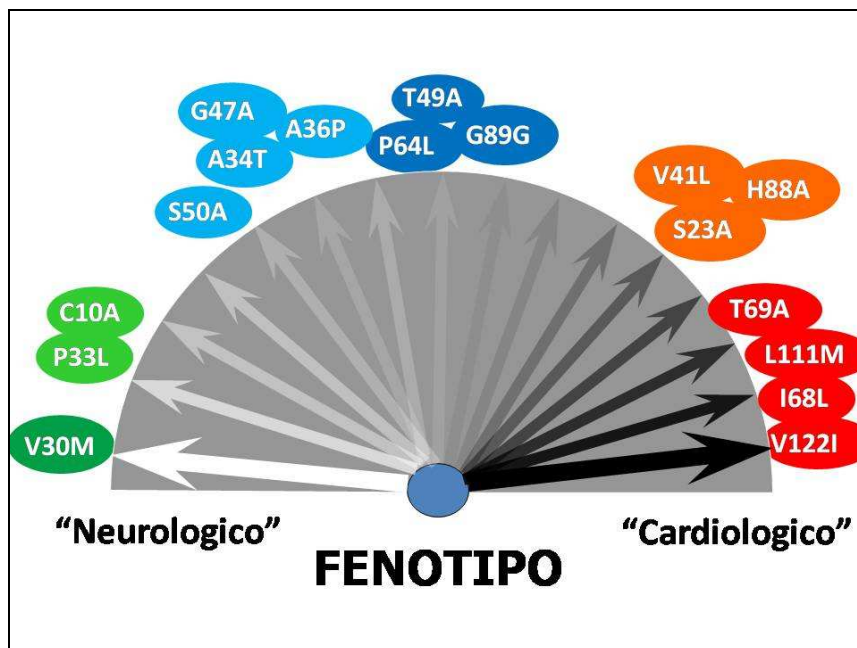


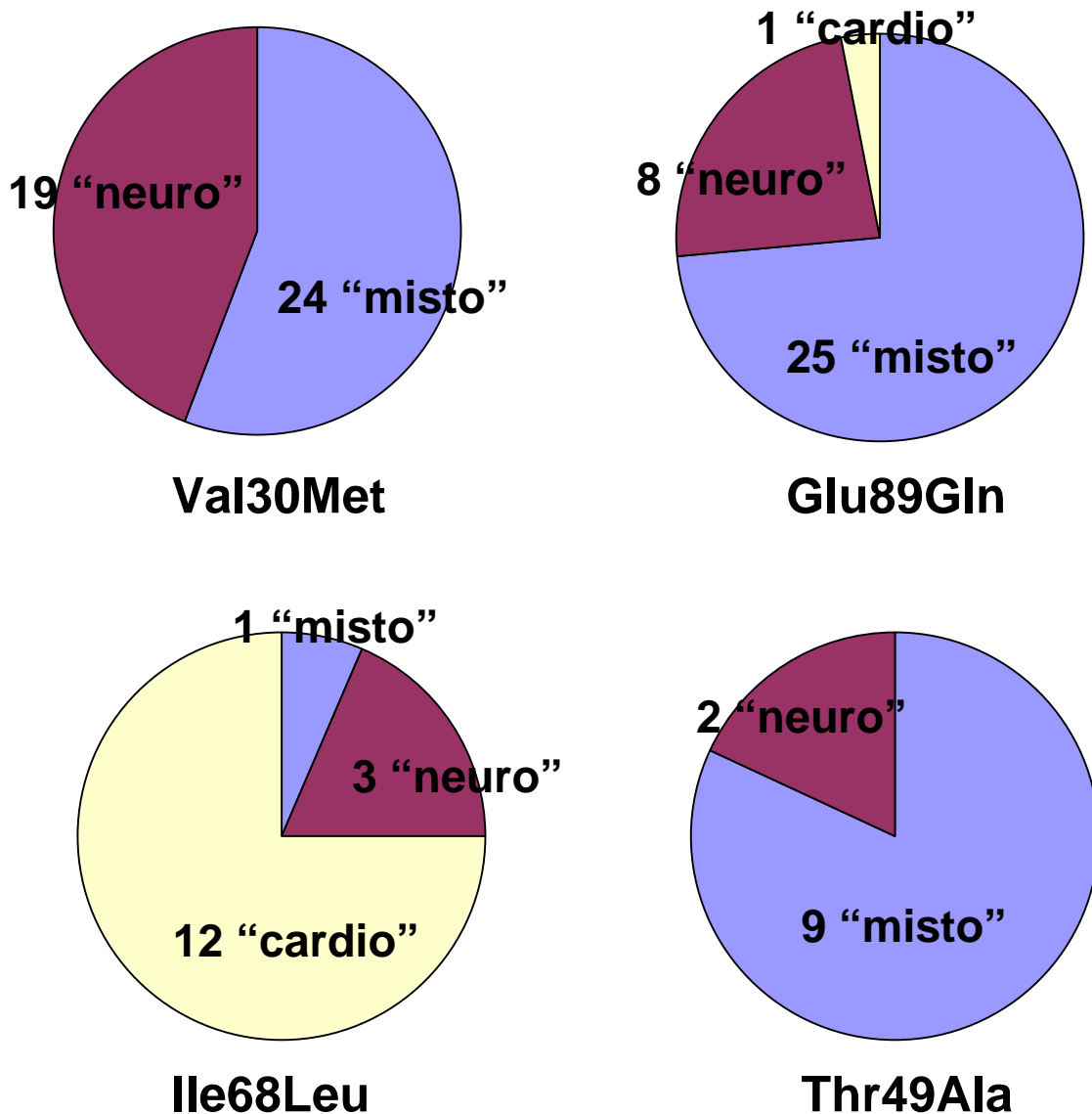
Fig. 11 Spettro delle diverse correlazioni genotipo-fenotipo nell'ATTRm.

Anche focalizzandosi sulle singole mutazioni più frequentemente riscontrate (come schematizzato in figura 12), è evidente il ruolo fondamentale della mutazione nell' "orientare" il fenotipo di presentazione, con ampia variabilità di espressione clinica.

Questo, oltre ad essere un importante contributo conoscitivo, in una malattia ancora oggi ritenuta di pertinenza prevalentemente neurologica <sup>55</sup>, e con analisi su ampie casistiche limitate prevalentemente ad una singola mutazione (Val30Met) nei focolai endemici, rappresenta un possibile punto di partenza per ulteriori lavori in cui andare ad analizzare l'evoluzione nel corso del tempo dei diversi casi con differente quadro di presentazione.

I soggetti con coinvolgimento cardiaco esclusivo sembrano avere rispetto a quelli con fenotipo "MISTO" una più severa compromissione morfo-funzionale. Questo sottogruppo si caratterizza oltre che per la frequenza non sporadica, per l'età media più avanzata all'esordio dei sintomi, per la netta prevalenza del sesso maschile (con ruolo protettivo, all'interno delle stesse famiglie, del sesso femminile), e per la presenza di alcune mutazioni particolari, tra le quali l'Ile68Leu. Tale mutazione sembra ricoprire un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia caratterizzata da prevalente estrinsecazione cardiaca, e sembra delinearci come un possibile analogo italiano delle mutazioni Val122Ile nella popolazione afro-americana e Leu111Met in Danimarca <sup>56,57</sup>. Inoltre, pur essendo tutte le famiglie affette dalla mutazione Ile68Leu apparentemente non relate nelle ultime generazioni, la comune provenienza geografica illustrata in figura 13 sembra suggerire la possibile presenza di un "common founder" all'origine.

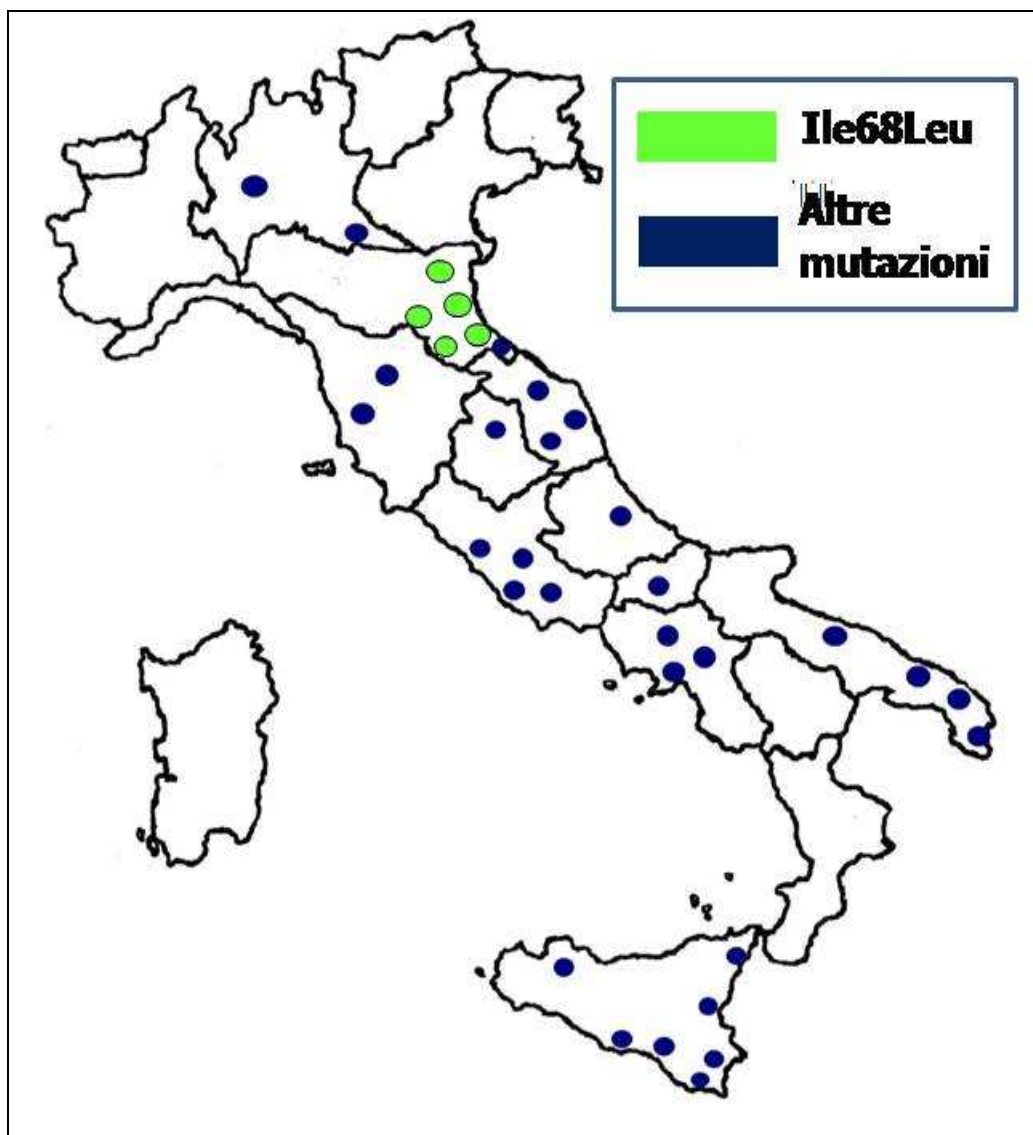
Fig. 12 Distribuzione dei diversi fenotipi tra le mutazioni di più frequente riscontro nell'ATTRm.



Questa identificazione appare altamente rilevante per il cardiologo clinico, suggerendo la possibilità/necessità in una malattia studiata prevalentemente da neurologi e ritenuta di pertinenza neurologica, di effettuare diagnosi di ATTRm nel caso in cui il quadro cardiaco ne sia evocativo, anche in assenza di un chiaro coinvolgimento clinico neurologico.

Tutti i pazienti analizzati in questo sottogruppo sono infatti arrivati alla diagnosi tramite un percorso cardiologico, e quasi tutti avevano precedentemente ricevuto una errata diagnosi più frequentemente di cardiomiopatia ipertrofica, di cardiopatia ipertensiva o di cardiopatia ischemica, nel caso in cui il sintomo di presentazione fosse stato di natura anginoso.

Fig. 13 Provenienza geografica delle famiglie portatrici della mutazione Ile68Leu.

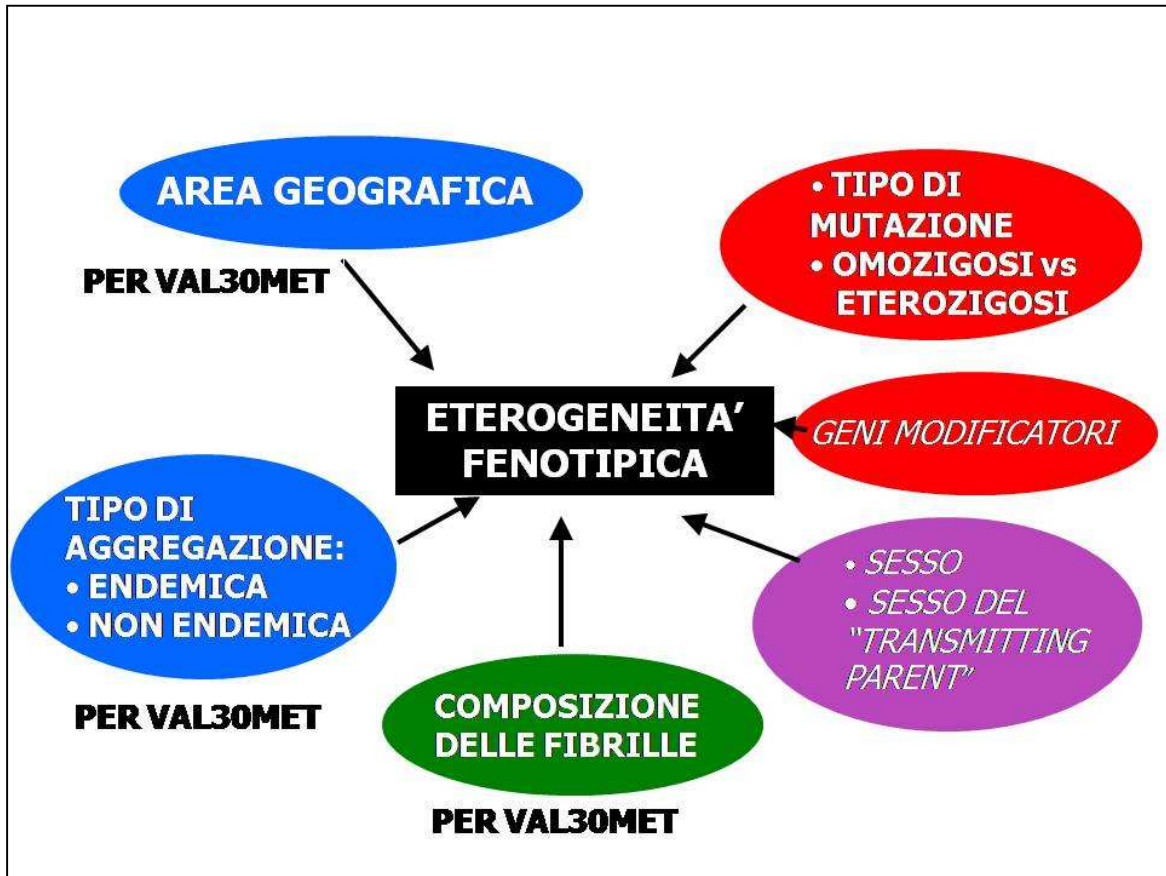


Chiari “pitfall” diagnostici per questa sottopopolazione sono l’insorgenza dei sintomi in età avanzata, in assenza di segni/sintomi evocativi precedenti (se si esclude la presenza di sindrome del tunnel carpale), e un quadro ecocardiografico spesso del tutto indistinguibile dalla cardiomiopatia ipertrofica ad un occhio non esperto, frequentemente non accompagnato all’ECG dai caratteristici bassi voltaggi del QRS.

Nella nostra esperienza clinica, si possono rivelare un valido ausilio per il clinico le nuove tecniche di imaging cardiaco in grado di rivelare in maniera non invasiva la presenza di deposizione di amiloide, e nel caso della Scintigrafia Ossea con  $^{99m}\text{Tc-DPD}$  di orientare la diagnosi differenziale eziologica <sup>58-63</sup>.

Il tipo di mutazione della transtiretina e il sesso si confermano quindi come due dei possibili determinanti del tipo coinvolgimento sistemico nella patologia amiloidotica, tra quelli attualmente noti e già segnalati in letteratura (Fig. 14) <sup>64</sup>.

Fig. 14 Principali determinanti dell' eterogeneità clinica nell'ATTRm.



## CONCLUSIONI

All'interno di un gruppo di cardiomiopatie infiltrative tradizionalmente considerate restrittive, il grado di infiltrazione (valutato mediante l'aumento dello spessore parietale medio ventricolare) non sembra essere associato alla severità del danno emodinamico restrittivo.

Questo studio supporta inoltre il concetto che le cardiomiopatie risultanti dall'amiloidosi, AL, ATTRm e ATTRwt, dovrebbero essere considerate 3 malattie cardiache distinte con substrati fisiopatologici e decorso clinico differenti.

In particolare, la cardiomiopatia secondaria all'AL sembra essere associata a spessori parietali ventricolari di poco aumentati, ma sembra mostrare la più alta frequenza di alterazioni emodinamiche (da disfunzione diastolica) e bassi voltaggi del QRS all'ECG, e un decorso clinico piuttosto aggressivo. A fronte di un severo deterioramento generale, è la compromissione cardiaca stessa causa di elevata mortalità, probabilmente per l'effetto tossico prodotto dalle catene leggere libere circolanti delle immunoglobuline o per l'interessamento vascolare (coronarico).

Le amiloidosi ATTRm e ATTRwt sembrano, al contrario, essere associate a spessori parietali ventricolari marcatamente aumentati, ma meno frequentemente ad alterazioni emodinamiche, con decorso clinico meno aggressivo di quello dell'AL, nonostante la maggiore età media dei pazienti e le anomalie morfologiche. Nei due tipi di cardiomiopatie transtiretino-relate, il voltage/mass ratio tende ad essere maggiore che nei pazienti affetti da AL (con possibilità di presenza di blocco di branca sinistra all'ECG) e l'ispessimento delle valvole atrio-ventricolari appare piuttosto frequente. La consapevolezza delle diversità sottostanti l'etichetta comune di amiloidosi cardiaca è importante su diversi livelli, dalla classificazione della malattia, alla diagnosi e alla gestione clinica.

Più del 10% dei pazienti affetti da amiloidosi ereditaria da mutazione della transtiretina (ATTRm) ha un'espressione fenotipica esclusivamente cardiologica. Questo sottogruppo si caratterizza per una netta prevalenza del sesso maschile, per una diagnosi in età più avanzata e per una frequenza particolarmente elevata della mutazione Ile68Leu. Nei soggetti portatori di tale mutazione inoltre il sesso femminile sembra avere un determinante ruolo protettivo.

In una malattia descritta come neurologica, esiste di fatto un ampio spettro di espressioni cliniche con una significativa correlazione "genotipo-fenotipo", che va dalla forma Val30Met (variante portoghese classica) con interessamento essenzialmente neurologico (FAP), alle forme legate alle mutazioni Val122Ile (variante afro-americana), Leu111Met (variante danese) e Ile68Leu con fenotipo essenzialmente cardiologico, passando attraverso fenotipi "MISTI", che sottendono un numero elevato di mutazioni.

Per quanto riguarda il tipo di interessamento cardiaco anche nei pazienti con compromissione neurologica, la presenza di cardiomiopatia amiloidotica si rivela un rilievo molto frequente, al pari, in termini di prevalenza, delle tipiche alterazioni elettrocardiografiche.

## BIBLIOGRAFIA

1. Westermark P, Benson MD, Buxbaum JM, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe J. *Amyloid protein fibril nomenclature*. *Amyloid* 2002;9:197-200.
2. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. *The systemic amyloidoses*. *N Engl J Med* 1997;337:898-909.
3. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. *Amyloidosis: recognition, confirmation, prognosis, and therapy*. *Mayo Clin Proc* 1999;74:490-494.
4. Rajkumar SV, Dispenzieri A, Kyle RA. *Monoclonal gammopathy of undetermined significance, Waldstrom macroglobulinemia, AL amyloidosis, and related plasma cell disorders: diagnosis and treatment*. *Mayo Clin Proc* 2006;81(5):693-703.
5. Dubrey SW, Cha K, Anderson J, Chamarthi B, Reisinger J, Skinner M, Falk RH. *The clinical features of immunoglobulin light-chain (AL) amyloidosis with heart involvement*. *QJM* 1998;91:141-157.
6. Connors LH, Lim A, Prokaeva T, Roskens VA, Costello CE. *Tabulation of human transthyretin (TTR) variants*. *Amyloid* 2003;10:160-184.
7. Chung CM, Connors LH, Benson MD, Walsh MT. *Biophysical analysis of normal transthyretin*. *Amyloid* 2001;8:75-83.
8. Merlini G, Bellotti V. *Molecular mechanisms of amyloidosis*. *N Engl J Med* 2003;349:583-596.
9. Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G. *Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity*. *Neurology* 2002;58:1001-1007.
10. Suhr OB, Svendsen IH, Andersson R, Danielsson A, Holmgren G, Ranlov PJ. *Hereditary transthyretin amyloidosis from a Scandinavian perspective*. *J Intern Med* 2003;254:225-235.
11. Coelho T, Sousa A, Lourenco E, Ramalheira J. *A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected*. *J Med Genet* 1994;31:293-299.
12. Plante-Bordeneuve V, Carayol J, Ferreira A, et al. *Genetic study of transthyretin amyloid neuropathies: carrier risks among French and Portuguese families*. *J Med Genet* 2003;40:120.
13. Planté-Bordeneuve V, Ferreira A, Lalu T, Zaros C, Lacroix C, Adams D, Said G. *Diagnostic pitfalls in sporadic transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP)*. *Neurology* 2007;69:693-698.

14. Adams D, Reilly M, Harding AE, Said G. *Demonstration of genetic mutation in most of the amyloid neuropathies with sporadic occurrence.* Rev Neurol 1992;148:736-741.
15. Ando Y, Nakamura M, Araki S. *Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy.* Arch Neurol 2005;62:1057-1062.
16. Rapezzi C, Perugini E, Salvi F, Grigioni F, Riva L, Cooke RM, Ferlini A, Rimessi P, Bacchi-Reggiani L, Ciliberti P, Pastorelli F, Leone O, Bartolomei I, Pinna AD, Arpesella G, Branzi A. *Phenotypic and genotypic heterogeneity in transthyretin-related cardiac amyloidosis: Towards tailoring of therapeutic strategies?* Amyloid 2006;13:143-153.
17. Cornwell GG, Murdoch WL, Kyle RA, Westermark P, Pitkanen P. *Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid: a clinico-pathologic correlation.* Am J Med 1983;75:618-623.
18. Westermark P, Sletten K, Johansson B, Cornwell GG. *Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1990;87:2843-2845.
19. Pitkanen P, Westermark P, Cornwell GG. *Senile systemic amyloidosis.* Am J Pathol 1984;117:391-399.
20. 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;51:708-814.
21. Hamour IM, Lachmann HJ, Goodman HJ, Petrou M, Burke MM, Hawkins PN, Banner NR. *Heart transplantation for homozygous familial transthyretin (TTR) Val122Ile cardiac amyloidosis.* Am J Transplant 2008;8:1056-1059.
22. Ng B, Connors LH, Davidoff R, Skinner M, Falk RH. *Senile systemic amyloidosis presenting with heart failure: a comparison with light chain-associated (AL) amyloidosis.* Arch Intern Med 2005;165:1425-1429.
23. Dubrey SW, Cha K, Skinner M, LaValley M, Falk RH. *Familial and primary (AL) cardiac amyloidosis: echocardiographically similar diseases with distinctly different clinical outcomes.* Heart 1997;78:74-82.
24. Arbustini E, Verga L, Concardi M, Palladini G, Obici L, Merlini G. *Electron and immuno-electron microscopy of abdominal fat identifies and characterizes amyloid fibrils in suspected cardiac amyloidosis.* Amyloid 2002;9:108-114.
25. Lachmann HJ, Booth DR, Booth SE, Bybee A, Gilbertson JA, Gillmore JD, Pepys MB, Hawkins PN. *Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis.* N Engl J Med 2002;6:346:1786-1791.
26. Falk RH. *Diagnosis and management of the cardiac amyloidoses.* Circulation 2005;112:2047-2060.



27. Palladini G, Perfetti V, Merlini G. *Therapy and management of systemic AL (primary) amyloidosis*. Swiss Med Wkly 2006;136:715-720.
28. 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.
29. Kyle RA, Spite PC, Gertz MA, Li CY, Edwards WD, Olson LJ, Thibodeau SN. *The premortem recognition of systemic senile amyloidosis with cardiac involvement*. Am J Med 1996;101:395-400.
30. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, Fermand JP, Hazenberg BP, Hawkins PN, Merlini G, Moreau P, Ronco P, Sanchirawala V, Sezer O, Solomon A, Grotz 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.
31. Surawicz B, Knilans TK. *Chou's Electrocardiography in Clinical Practice*. 5th Ed. Philadelphia, Pa: Saunders; 2001.
32. Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, Douglas PS, Faxon DP, Gillam LD, Kimball TR, Kussmaul WG, Pearlman AS, Philbrick JT, Rakowski H, Thys DM, Antman EM, Smith SC Jr, Alpert JS, Gregoratos G, Anderson JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Fuster V, Jacobs AK, Gibbons RJ, Russell RO; American College of Cardiology; American Heart Association; American Society of Echocardiography. *ACC/AHA/ASE 2003 guideline update for the clinical application of echocardiography: summary article: a report of the 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)*. Circulation 2003;108:1146-62.
33. 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.
34. Garcia MJ, Thomas JD, Klein AL. *New Doppler echocardiographic applications for the study of diastolic function*. J Am Coll Cardiol 1998;32:865-875.
35. Carroll JD, Gaasch WH, McAdam KP. *Amyloid cardiomyopathy: characterization by a distinctive voltage/mass relation*. Am J Cardiol 1982; 49:9-13.
36. McCarthy RE, Kasper EK. *A review of the amyloidoses that infiltrate the heart*. Clin Cardiol 1998;21:547-552.
37. Gertz MA, Lacy MQ, Gastineau DA, Inwards DJ, Chen MG, Tefferi A, Kyle RA, Litzow MR. *Blood stem cell transplantation as therapy for primary systemic amyloidosis (AL)*. Bone Marrow Transplant 2000;26:963-969.
38. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A. *Myeloablative chemotherapy with stem cell rescue for the treatment of primary systemic amyloidosis: a status report*. Bone Marrow Transplant 2000;25:465-470.

39. Palladini G, Perfetti V, Obici L, Caccialanza R, Semino A, Adami F, Cavallero G, Rustichelli R, Virga G, Merlini G. *Association of melphalan and high-dose dexamethasone is effective and well tolerated in patients with AL (primary) amyloidosis who are ineligible for stem cell transplantation.* Blood 2004;103:2936-2938.
40. Suhr OB, Herlenius G, Friman S, Ericzon BG. *Liver transplantation for hereditary transthyretin amyloidosis.* Liver Transplant 2000;6:263-276.
41. Dubrey SW, Burke MM, Khaghani A, Hawkins PN, Yacoub MH, Banner NR. *Long-term results of heart transplantation in patients with amyloid heart disease.* Heart 2001;85:202-207.
42. Olofsson BO, Backman C, Karp K, Shur OB. *Progression of cardiomyopathy after liver transplantation in patients with familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type.* Transplantation 2002;73:745-751.
43. Ruygrok PN, Gane EJ, McCall JL, Chen XZ, Haydock DA, Munn SR. *Combined heart and liver transplantation for familial amyloidosis.* Intern Med J 2001;31(1):66-67.
44. Kristen AV, Perz JB, Schonland SO, Hegenbart U, Schnabel PA, Kristen JH, Goldschmidt H, Katus HA, Dengler TJ. *Non-invasive predictors of survival in cardiac amyloidosis.* Eur J Heart Fail 2007;9:617-624.
45. Johansson B, Westermark P. *Senile systemic amyloidosis: a clinicopathological study of twelve patients with massive amyloid infiltration.* Int J Cardiol 1991;32:83-92.
46. Misu K, Hattori N, Nagamatsu M, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Takei Y, Hanyu N, Usui Y, Tanaka F, Harada T, Inukai A, Hashizume Y, Sobue G. *Late-onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan: clinicopathological and genetic features.* Brain 1999;122:1951-1962.
47. Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, Wang B, Connors LH, Skinner M, Apstein CS, Liao R. *Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress.* Circ Res 2004;94:1008-1010.
48. Liao R, Jain M, Teller P, Connors LH, Ngoy S, Skinner M, Falk RH, Apstein CS. *Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts.* Circulation 2001;104:1594-1597.
49. Palladini G, Campana C, Klersy C, Balduini A, Vadacca G, Perfetti V, Perlini S, Obici L, Ascari E, d'Eril GM, Moratti R, Merlini G. *Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis.* Circulation 2003;107:2440-2445.
50. Schubert D, Behl C, Lesley R, Brack A, Dargusch R, Sagara Y, Kimura H. *Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:1989-1993.

51. Suhr OB, Anan I, Backman C, Karlsson A, Lindqvist P, Mörner S, Waldenström A. *Do troponin and B-natriuretic peptide detect cardiomyopathy in transthyretin amyloidosis?* J Intern Med 2008;263:294-301.
52. Palladini G, Saraiva MJ, Coelho T, Reis H, Obici L, Vezzoli M, Vadacca G, Merlini G, Perlini S. *Differential effects on amyloid-induced myocardial dysfunction and N-terminal-pro brain natriuretic peptide release of different amyloidogenic proteins.* Eur Heart J 2004;25(suppl):36. Abstract.
53. Perugini E, Rapezzi C, Reggiani LB, Poole-Wilson P, Branzi A, Henein MY. *Comparison of ventricular long-axis function in patients with cardiac amyloidosis versus idiopathic restrictive cardiomyopathy.* Am J Cardiol 2005;95(1):146-149.
54. Palka P, Lange A, Donnelly E et al. *Doppler echocardiographic features of cardiac amyloidosis.* J Am Soc Echocardiogr 2002;15:1353-1360.
55. Benson MD, Kincaid JC. *The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy.* Muscle Nerve 2007;36:411-423.
56. Jacobson DR, Pastore R, Pool S et al. *Revised transthyretin Ile 122 allele frequency in African Americans.* Hum Genet 1996;98:236-238.
57. 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-Methionine 111 variant in serum from patients and carriers.* Am J Med 1992;93:3-8.
58. Simons M, Isner JM. *Assessment of relative sensitivities of non-invasive tests for cardiac amyloidosis in documented cardiac amyloidosis.* Am J Cardiol 1992;69:425-427.
59. Rapezzi C, Guidalotti P, Salvi F, Riva L, Perugini E. *Usefulness of <sup>99m</sup>Tc-DPD scintigraphy in cardiac amyloidosis.* J Am Coll Cardiol. 2008;15:1509-1510.
60. Perugini E, Rapezzi C, Piva T, Leone O, Bacchi-Reggiani L, Riva L, Salvi F, Lovato L, Branzi A, Fattori R. *Non-invasive evaluation of the myocardial substrate of cardiac amyloidosis by gadolinium cardiac magnetic resonance.* Heart 2006;92:343-349.
61. Fattori R, Rocchi G, Celletti F, Bertaccini P, Rapezzi C, Gavelli G. *Contribution of magnetic resonance imaging in the differential diagnosis of cardiac amyloidosis and symmetric hypertrophic cardiomyopathy.* Am Heart J 1998;136:824-830.
62. Thomson LE. *Cardiovascular magnetic resonance in clinically suspected cardiac amyloidosis: diagnostic value of a typical pattern of late gadolinium enhancement.* J Am Coll Cardiol 2008;51:1031-1032.
63. Hawkins PN. *Serum amyloid P component scintigraphy for diagnosis and monitoring amyloidosis.* Curr Opin Nephrol Hypertens 2002;11:649-655.

64. Rapezzi C, Quarta CC, Riva L, Salvi F, Ciliberti P, Longhi S, Biagini E. *Familial amyloidoses and the heart. Clinical cardiovascular genetics: principles and practice*. Blackwell publisher 2008. Chapter 30. In press.