



# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO di MEDICINA - DIMED**

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN "TECNICHE DI RADIOLOGIA  
MEDICA,  
PER IMMAGINI E RADIOTERAPIA"**

**Sede di ROVIGO**

**Presidente: Prof. Roberto Stramare**

**Tesi di Laurea:**

**ASPETTI TECNICO-DIAGNOSTICI MEDICO-NUCLEARI  
NELLA DIAGNOSI DI AMILOIDOSI CARDIACA**

**Relatore:**

Dott.ssa Rampin Lucia

**Correlatore:**

Dott.ssa Ferretti Alice

**Guida Tecnico-Pratica:**

TSRM Tommasi Enrico

**Laureando:**

Onofri Francesco

**Anno Accademico 2021/2022**

# INDICE

1	INTRODUZIONE.....	1
2	SCOPO DELLA TESI.....	3
3	ASPETTI GENERALI DELL'AMILOIDOSI.....	4
3.1	CLASSIFICAZIONE DELL'AMILOIDOSI.....	5
3.2	AMILOIDOSI DA CATENE LEGGERE (AL).....	5
3.3	AMILOIDOSI DA TRANSTIRETINA, FORME FAMILIARI E WILD TYPE 6	
4	GENERALITÀ SULLA MEDICINA NUCLEARE.....	8
4.1	GAMMA CAMERA.....	8
4.1.1	CRISTALLO SCINTILLATORE.....	9
4.1.2	FOTOMOLTIPLICATORE.....	9
4.1.3	COLLIMATORE.....	10
4.1.4	PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO.....	11
4.1.5	MODALITÀ DI ACQUISIZIONE.....	11
4.2	SISTEMI IBRIDI SPECT-CT.....	12
5	GENERALITÀ DEI RADIOFARMACI.....	13
5.1	CARATTERISTICHE DEL TECNEZIO.....	13
5.2	RADIOFARMACI OSTEOTROPI: CARATTERISTICHE E LORO MECCANISMI DI CAPTAZIONE.....	14
5.3	RADIOFARMACO NELLA RICERCA DELL'AMILOIDOSI.....	15
5.4	MARCATURA <sup>99m</sup> Tc-HDP.....	17
5.5	CONTROLLI DI QUALITÀ.....	17
5.6	PROTOCOLLO DI ACQUISIZIONE GENERALE DELLA SCINTIGRAFIA OSSEA.....	18
5.7	ANALISI GENERICA DELLE IMMAGINI.....	20
6	MATERIALI E METODI.....	23
6.1	PREPARAZIONE DEL PAZIENTE.....	23
6.2	ATTIVITÀ SOMMINISTRATA.....	23
6.3	STRUMENTAZIONE.....	24
6.4	PROTOCOLLO PER RICERCA AMILOIDOSI.....	25
6.6	PROCEDURA OPERATIVA.....	25
6.7	ELABORAZIONE.....	26
6.8	ANALISI DELLE IMMAGINI E RISULTATI.....	26

6.8.1	<i>CONFRONTO H/CL IN IMMAGINI PLANARI STATICHE vs PERUGINI SCORE</i>	39
6.8.2	<i>CONFRONTO H/CL IN IMMAGINI TOTAL BODY vs PERUGINI SCORE</i>	40
6.8.3	<i>CONFRONTO H/CL IN IMMAGINI SPECT/TC vs PERUGINI SCORE</i>	41
7	DISCUSSIONE.....	43
8	CONCLUSIONI.....	49
9	BIBLIOGRAFIA.....	50

# 1 INTRODUZIONE

L'Amiloidosi è una rara e grave patologia sistemica, ereditaria o non ereditaria, caratterizzata da accumulo di proteine insolubili in diversi organi, tra cui il cuore, che determina la comparsa di gravi sintomi legati all'alterazione della funzione dell'organo prevalentemente interessato.

L'amiloidosi ed in particolare quella con prevalente accumulo delle proteine in sede cardiaca (Amiloidosi Cardiaca) è caratterizzata da sintomi aspecifici e comuni ad altre patologie; per diagnosticare tale patologia è necessario innanzitutto ipotizzarla al fine di arrivare rapidamente alla diagnosi riducendo la *progressione della malattia* e l'esito, spesso infausto.

Una volta sospettata l'amiloidosi cardiaca in base ad esami aspecifici (elettrocardiogramma ed ecocardiogramma) si deve provvedere a convalidare la diagnosi per la quale il "Gold standard" è rappresentato dalla biopsia endomiocardica, che individua il deposito della sostanza amiloide; tuttavia, è un esame invasivo.

In alternativa, può essere utilizzata la Risonanza Cardiaca (RM-C), che rileva l'ispessimento della parete cardiaca relativa al deposito di materiale fibrillare.

Questa metodica però non permette di differenziare tra i diversi tipi di Amiloidosi cardiaca.

Questo limite si può superare utilizzando la Scintigrafia ossea con difosfonati ([<sup>99m</sup>Tc]-3,3-difosfono-1,2-propanodicarbossilico-DPD o [<sup>99m</sup>Tc]-idrossidifosfonato-HDP), che permette di identificare le forma di Amiloidosi cardiaca trans-tiretina correlata. La scintigrafia con difosfonati è utilizzata abitualmente in Medicina Nucleare per studiare l'osso ed è caratterizzata, anche nel caso della ricerca di amiloidosi cardiaca, da un'elevata sensibilità, permettendo di giungere alla diagnosi di tale patologia in fase preclinica, quando elettrocardiogramma, biomarcatori e a volte anche la RM-C sono ancora normali. Questo esame è di semplice esecuzione ed interpretazione, in quanto fisiologicamente i difosfonati non si accumulano a livello del muscolo cardiaco; tuttavia, la disponibilità di criteri interpretativi qualitativi/semiquantitativi

possono aiutare nell'interpretazione dell'esame ai fini della diagnosi di Amiloidosi Cardiaca.

Una delle modalità di interpretazione della scintigrafia ossea per la diagnosi di amiloidosi cardiaca è quella di utilizzare lo score visivo di captazione, rappresentato dallo Score di Perugini, che gradua la captazione miocardica dei difosfonati rispetto a quella ossea (costale), definendo la positività o negatività dell'esame. [1]

## **2 SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo della mia tesi è quello di mettere a punto un metodo di analisi semiquantitativa per la diagnosi di amiloidosi cardiaca utilizzando la scintigrafia ossea con  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP, identificando un valore di cut-off capace di discriminare tra pazienti positivi e pazienti negativi. Tale valore soglia è stato ricavato dall'analisi di tre diversi tipi di scansione scintigrafica: Statica Planare, Total Body e SPECT/TC. Il nostro Gold standard interpretativo è rappresentato dallo Score di Perugini, come riportato in letteratura.

### 3 ASPETTI GENERALI DELL'AMILOIDOSI

“L'amiloidosi è una condizione associata a mutazioni geniche, invecchiamento o patologie sistemiche in cui i depositi extracellulari di proteine fibrillari determinano alterazioni morfologiche e funzionali dei tessuti.”

L'amiloidosi è una malattia causata dal deposito nel tessuto, principalmente extracellulare, di proteine modificate (mal ripiegate) che si legano tra loro formando fibrille insolubili costituendo in tal modo la cosiddetta sostanza amiloide.

Tali aggregati insolubili inducono un cambiamento morfo-strutturale e morfo-funzionale dell'organo che porta alla morte cellulare secondo un meccanismo chiamato proteo-tossicità.

Le fibrille amiloidi hanno un diametro pari a 7-13 nm e sono formate da 2-8 protofilamenti, che si intrecciano l'uno con l'altro andando a formare strutture a beta foglietto antiparallelo tenute insieme da legami a idrogeno tra i gruppi carbonili e amminici della catena peptidica.

I meccanismi di formazione di tali fibrille amiloidi non sono del tutto chiari; tuttavia, possiamo identificare alcuni fattori predisponenti la formazione di tale complesso:

- Mancata rimozione delle proteine misfolded, da parte dei sistemi di controllo
- Concentrazione dei precursori amiloidogenici, che dipendono da almeno 3 fattori:
  1. Propensione intrinseca della proteina a formare depositi di amiloide
  2. Rimodellamento proteolitico della proteina
  3. Mutazione nella sequenza di amminoacidi

Il processo di amiloidogenesi si avviene in due fasi durante le quali si verificano modificazioni conformazionali nella struttura proteica dovute alle interazioni tra proteine Misfolded (mal ripiegate).

Possiamo notare come vi sia un organotropismo per i precursori amiloidogenici, ad esempio la transtiretina (TTR) mutata si deposita prevalentemente nel sistema nervoso periferico e nel cuore. L'organotropismo sembrerebbe dipendere da fattori

come la concentrazione di proteine non mutate all'interno del tessuto o variazione di pH che ne facilita il misfolding. [1]

### **3.1 CLASSIFICAZIONE DELL'AMILOIDOSI**

Le amiloidosi cardiache si possono dividere in due principali gruppi:

- ACQUISITE
  - amiloidosi AL, caratterizzata da deposito di catene leggere misfolded provenienti da anticorpi monoclonali (immunoglobuline)
  - Amiloidosi ATTR acquisita, causata dall'accumulo di fibrille amiloidi di transtiretina (TTR), in passato era nota come amiloidosi sistemica senile poiché interessa tipicamente uomini anziani. Oggi definita come wild Type (ATTRwt).
- EREDITARIE

All'amiloidosi ATTR ereditaria, sono associate a mutazioni del gene TTR.

Il processo che porta alla genesi delle fibrille richiede l'interazione tra proteine con proprietà e condizioni tissutali favorevoli. Possiamo identificare due fasi in questo lungo processo che richiede molto tempo: una prima fase di nucleazione dove abbiamo la costituzione di un primo nucleo di fibrille e una seconda fase che è la fase di accrescimento dove vediamo l'associarsi di più fibrille e il deposito di esse nel tessuto organo-tropico. [2]

### **3.2 AMILOIDOSI DA CATENE LEGGERE (AL)**

Caratterizzata da una produzione di catene leggere (ovvero frammenti di anticorpi) con formazione instabile, che portano all'aggregazione di catene misfolded formando così fibrille amiloidi.

Le fibrille possono causare un danno cellulare diretto oppure legarsi stabilmente tra loro formando fibrille stabili che si depositano sull'organo alterandone la



struttura tissutale e modificando la funzionalità; in tal modo si viene a determinare un danno d'organo dovuto all'accumulo.

Il coinvolgimento cardiaco da parte dell'amiloidosi da catene leggere provoca scompenso cardiaco con frazione di eiezione preservata, il deposito di fibrille causa un incremento dello spessore di parete (pseudoipertrofia) che causa rigidità e un incremento della pressione di riempimento. Questo tipo di amiloidosi è associata ad una maggior rapidità nel deposito di fibrille amiloidi e questo giustifica la maggior severità clinica e prognostica della malattia.

I quadri clinici conseguenti sono: scompenso diastolico e/o sistolico, associato a dispnea da sforzo accompagnati da congestione polmonare o sistemica, spesso aggravata dal concomitante impegno renale (Essendo il secondo organo bersaglio, interessato da sindrome nefrosica).

### **3.3 AMILOIDOSI DA TRANSTIRETINA: FORME FAMILIARI E WILD TYPE**

L'amiloidosi da transtiretina (TTR) è una condizione patologica sistemica caratterizzata da depositi extracellulari di fibrille amiloidi composte da transtiretina, chiamata anche pre-albumina, una proteina formata da quattro monomeri sintetizzata principalmente dal fegato. Il suo ruolo fisiologico è di trasporto dell'ormone tiroideo tiroxina. Quando i legami tra i monomeri si indeboliscono essi tendono a separarsi e a srotolarsi assumendo una struttura terziaria alterata (misfolding). I monomeri alterati si assemblano in oligomeri e successivamente in fibrille insolubili che si accumulano nella matrice extracellulare. Alla base della separazione dei monomeri e quindi del misfolding possono esserci mutazioni a carico della transtiretina; queste mutazioni concorrono la classificazione dell'ATTR in due forme principali:

- Amiloidosi ereditaria (ATTRv): causata dalla mutazione del gene della trans-tiretina, che determina l'aumentano della probabilità che la proteina transtiretina prodotta nel fegato si ripieghi erroneamente in un foglietto

beta insolubile. Si distinguono forme a prevalente fenotipo neurologico e forme a prevalente fenotipo cardiologico.

- Amiloidosi sistemica senile non ereditaria (ATTRwt): caratterizzata dalla capacità intrinseca dell'albumina wild Type di aggregarsi in fibrille amiloidi patogenetiche, il cui fenotipo è tipicamente cardiologico.

I dati indicano che la prevalenza di ATTRwt è di 8 volte superiore negli uomini rispetto alle donne, mentre studi autoptici suggeriscono ~~inoltre~~ che la prevalenza può raggiungere il 25% di soggetti in età superiore agli 85 anni.

I meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo di ATTR rimangono sconosciuti tuttavia è noto che i tetrameri di TTR sono sintetizzati nel fegato, in un organismo sano il meccanismo di controllo della qualità presente nel reticolo endoplasmatico degraderebbe queste proteine mal ripiegate ma negli organismi con mutazione questo sistema fallisce e le proteine sono secrete nel sangue.

Sia nelle forme ATTRv che ATTRwt le fibrille amiloidi possono infiltrare una o più strutture cardiovascolari; miocardio atriale e ventricolare, tessuto valvolare, coronarie e grandi vasi. Questo porta ad un aumento progressivo dello spessore di parete ventricolare sinistra, destra e del setto, con comparsa di ipertrofia.

La sintomatologia conseguente è rappresentata da una cardiomiopatia ipertrofica/restrittiva, da scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata, blocchi di conduzione, fibrillazione atriale e tromboembolismo.[1] [3] [4] [5]

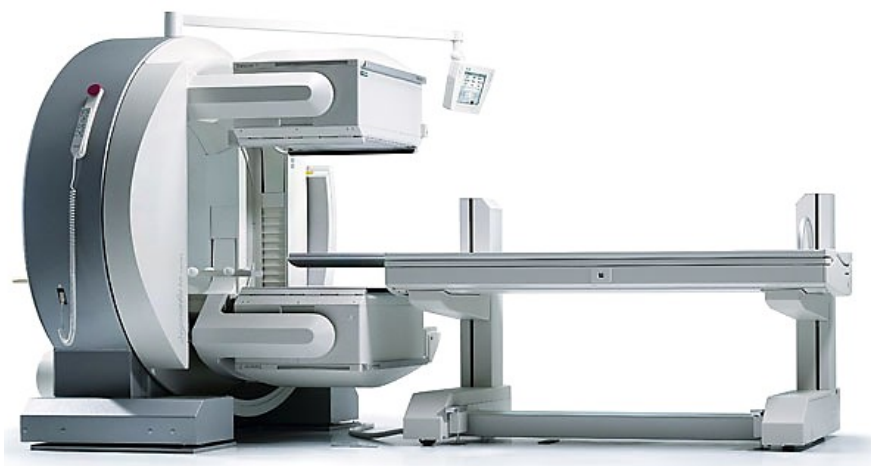
## **4 GENERALITÀ SULLA MEDICINA NUCLEARE**

La medicina nucleare è una delle branche radiologiche mediche che utilizza la somministrazione di radiofarmaci con lo scopo di ottenere informazioni metaboliche e morfo-funzionali (scopo diagnostico) o di trattare tramite terapia metabolica patologie tumorali, con effetto radicale o palliativo (scopo terapeutico).

Tale branca della medicina diagnostica utilizza un'apposita apparecchiatura rappresentata dalla Gamma Camera, attualmente sempre più associata ad una TAC, per la costituzione di apparecchiature ibride rappresentate dalla SPECT/CT. [6]

### **4.1 GAMMA CAMERA**

La gamma camera è il sistema di rivelazione impiegato nelle indagini medico nucleari per le acquisizioni di immagini statiche, dinamiche e tomografiche. Esse esprimono la distribuzione del radiofarmaco nell'organismo.



*Figura 1: Esempio di gamma-camera a due testate.*

Solitamente una gammacamera è dotata di una o due testate, ossia di due rivelatori, ciascuno costituito da:

#### **4.1.1 CRISTALLO SCINTILLATORE**

È un rivelatore a scintillazione che converte l'energia emessa dal fotone in segnale luminoso, generalmente costituito di un cristallo di ioduro di sodio (NaI) attivato con tallio (Tl).

Il cristallo di NaI acquista le proprietà scintillanti grazie alla presenza delle impurità di Tl inserite nel reticolo cristallino. Tali impurità agiscono come trappole per elettroni e formano centri di luminescenza. Nell'attraversare lo scintillatore, il fotone gamma interagisce con gli elettroni del cristallo rilasciando tutta o parte della sua energia, producendo una emissione luminosa di breve durata di fotoni di lunghezza d'onda nel visibile (fotoni di scintillazione).

#### **4.1.2 FOTOMOLTIPLICATORE**

In una gamma-camera sono presenti diversi fotomoltiplicatori posti nella parte posteriore del cristallo, come mostrato in figura 2. Sono costituiti di un fotocatodo e di una catena di dinodi, hanno la funzione di trasformare il fotone di scintillazione emesso in risposta al passaggio del raggio gamma in corrente elettrica.

Il catodo fotosensibile converte i fotoni incidenti in elettroni, che a loro volta vengono moltiplicati proporzionalmente dal sistema di dinodi e inviati all'anodo dove vengono raccolti per la registrazione del segnale finale.

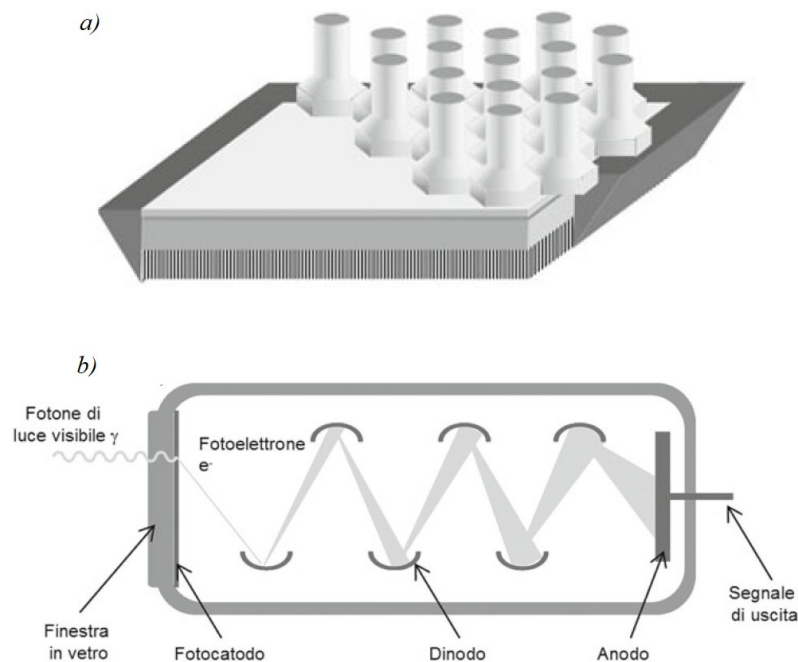


Figura 2: (a) Rappresentazione delle componenti della testata: cristallo scintillatore, collimatore e fotomoltiplicatori; (b) Schema di funzionamento di un fotomoltiplicatore [6]

### 4.1.3 COLLIMATORE

Il collimatore è posto tra la sorgente emittente e il cristallo di rivelazione. Il collimatore è formato da setti in materiale molto denso (piombo, tungsteno), a forma di griglia, che copre il cristallo scintillatore in modo tale che all'interno di ogni suo foro giungano solo le radiazioni provenienti dal frammento di campione su cui quel foro del collimatore si proietta. Questo è possibile proprio perché tutte le altre radiazioni che non colpiscono perpendicolarmente il foro colpiscono il setto, che le assorbe proprio perché è di un materiale molto denso.

Questo permette di avere una rappresentazione realistica della distribuzione di radioattività del campo di vista, e permette di avere quindi elevata risoluzione spaziale ma minor sensibilità rispetto al cristallo senza collimatore.

Possono essere classificati in base alla geometria dei setti e in base alle energie. Ad esempio, quelli per la scintigrafia ossea sono i LEHR (Low Energy, High Resolution) a setti paralleli; ovvero collimatori a bassa energia ma ad alta risoluzione spaziale, ottimali per il picco energetico del  $^{99m}\text{Tc}$  (140 KeV).

#### **4.1.4 PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO**

I raggi gamma emessi dalla sorgente (paziente) interagiscono con il cristallo scintillatore attraverso l'effetto Compton e fotoelettrico. Interagendo con le foto trappole ne eccitano gli elettroni, e dall'energia derivante dalla loro successiva diseccitazione emettono il segnale luminoso. La luce emessa viene rilevata dai fotomoltiplicatori adiacenti al cristallo che trasformano il segnale luminoso in segnale elettrico proporzionale. Il segnale uscente dai fotomoltiplicatori viene rielaborato da un sistema elettronico e trasferito a computer. I dati così registrati contengono sia l'informazione energetica, poiché l'intensità del segnale è proporzionale all'energia del fotone incidente, sia l'informazione sul punto di emissione (la localizzazione spaziale del segnale è determinata infatti calcolando il "baricentro" della distribuzione di segnale prodotto dai fotomoltiplicatori).

La gamma camera tramite la finestra energetica impostata tiene solamente i dati relativi ai raggi gamma che rientrano nell'intervallo energetico impostato, in modo da eliminare il rumore che contribuirebbe alla degradazione dell'immagine.

#### **4.1.5 MODALITA' DI ACQUISIZIONE**

Per l'acquisizione dell'esame scintigrafico bisogna impostare alcuni parametri prima dell'inizio dell'acquisizione:

- Finestra Energetica: corrisponde all'intervallo energetico tipico per il radioisotopo che è stato utilizzato nella marcatura del radiofarmaco, nel nostro caso la finestra energetica del  $^{99m}\text{Tc}$  è  $140 \text{ keV} \pm 20\%$ . In questo modo si ottiene un buon rapporto segnale-rumore.
- Matrice dell'immagine: generalmente nella scintigrafia ossea si utilizzano due matrici;  $256 \times 256$  nelle acquisizioni statiche e  $256 \times 1024$  nelle acquisizioni Total Body.
- Zoom: è il parametro che definisce le dimensioni dell'ingrandimento e quindi del campo di vista dell'acquisizione.
- Modalità di acquisizione: la gamma camera può acquisire immagini planari o tomografiche.

- ❖ **Acquisizione Planare Statica:** le testate rimangono ferme in una data posizione per tutta l'acquisizione, che è singola; la durata può essere impostata a tempo o conteggi.
- ❖ **Acquisizione Planare Dinamica:** le testate rimangono ferme in una data posizione per tutta l'acquisizione, che questa volta è caratterizzata da acquisizioni multiple di alcuni secondi dette frames. Permette di osservare come varia la distribuzione del radiofarmaco seguendo i processi fisiologici nel tempo.
- ❖ **Acquisizione Total Body:** Le testate acquisiscono con matrice asimmetrica tutto il corpo mentre il lettino porta-paziente si muove in modo continuo con una velocità di 15cm/min
- ❖ **Acquisizione SPECT:** Le testate ruotano attorno al distretto interessato con angolazioni differenti in modo tale da compiere un arco di 180°. I dati così acquisiti sono poi ricostruiti in immagini tomografiche.

## **4.2 SISTEMI IBRIDI SPECT-CT**

Il tomografo SPECT (Single Photon Emission Computer Tomography) è una gamma-camera dotata di almeno due testate di rivelazione che, ruotando attorno al paziente, permettono l'acquisizione di immagini tomografiche. In questo modo l'indagine è molto più dettagliata e permette di eliminare dubbi interpretativi derivanti dalla sovrapposizione delle strutture nelle immagini planari scintigrafiche.

Nel caso dei sistemi ibridi SPECT/TC, al tomografo SPECT è integrato un tomografo TC, con cui acquisire immagini trasmissive per la correzione per l'attenuazione delle immagini emissive SPECT e per la localizzazione anatomica dei reperti medico-nucleari.

L'utilizzo della Gamma Camera presuppone l'impiego di specifici farmaci radioattivi, rappresentati dai Radiofarmaci, la cui definizione e caratteristiche generali vengono riportate di seguito.

## **5 GENERALITA' DEI RADIOFARMACI**

Secondo quanto riportato dal D.L 178 del 29 maggio 1991, per radiofarmaco si intende "Qualsiasi medicinale che quando è pronto per l'uso include uno o più radionuclidi (topi radioattivi) incorporati a scopo sanitario".

I radiofarmaci iniettati nel sistema circolatorio, in relazione alle caratteristiche biochimiche delle molecole del farmaco di cui sono composti, entrano nei processi metabolici senza influenzarlo e, in virtù del tracciante radioattivo, possono essere rilevati dall'esterno e registrati in immagini. I dati ottenuti sono espressione della sede e dell'intensità dei processi in cui sono coinvolti, ciò consente di distinguere un processo patologico da uno fisiologico.

Nella maggior parte degli esami medico nucleari tradizionali i radiofarmaci sono marcati con  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $\gamma$  emittente.

### **5.1 CARATTERISTICHE DEL TECNEZIO**

Il  $^{99m}\text{Tc}$ , oltre ad essere economico è facilmente producibile in loco poiché ottenuto dall'eluizione di una colonna a scambio ionico di  $^{99}\text{Mo}$  contenuta nel generatore  $^{99}\text{Mo}-^{99m}\text{Tc}$ .

Il  $^{99}\text{Mo}$  decade con una emivita di 67.7 ore, a  $^{99m}\text{Tc}$  con emivita di 6 ore che a sua volta decade a  $^{99}\text{Tc}$ , cessando di essere radioattivo.

Emette solo radiazioni gamma in uno spettro di emissione ottimale per l'utilizzo di gamma camere caratterizzata da alta efficienza e sensibilità, con bassa energia pari a 140 KeV quindi ottimale anche per questioni radio-protezionistiche.

I moderni radiofarmaci possono essere marcati facilmente e rapidamente, semplicemente mescolando il farmaco contenuto nel Vial con l'eluato della colonna, ovvero con il Pertecnetato di Sodio.



Il Pertecnetato di sodio deve essere prima ridotto dal Cloruro stannoso, che elimina parzialmente o totalmente gli atomi di ossigeno e permette la formazione di nuovi legami. Inoltre, per permettere la formazione del complesso  $^{99m}\text{Tc}$ -Farmaco bisogna aggiungere un agente chelante che stabilizza la molecola.

## **5.2 RADIOFARMACI OSTEOTROPI: CARATTERISTICHE E LORO MECCANISMI DI CAPTAZIONE**

Le molecole più comunemente utilizzate per eseguire la scintigrafia ossea sono i bifosfonati: metilene-difosfonato (MDP), idrossi-metilen difosfonato (HMDP) o idrossietilen-difosfonato (HDP) e 2,3-dicarbossipropano-1,1-difosfonato (DPD). Nello studio per le patologie ossee mediante scintigrafia a Rovigo viene utilizzato HDP marcato  $^{99m}\text{Tc}$ .

La caratteristica del radiofarmaco è quella di concentrarsi nei siti d'interesse in modo proporzionale alla vascolarizzazione e all'attività osteoblastica e osteoclastica. Permette di valutare l'attività metabolica dell'osso e riconosce qualsiasi lesione che determini un'alterazione nel normale processo fisiopatologico dell'osso.

L'osso infatti è un sistema dinamico sensibile agli stimoli esterni, che attivano processi di riassorbimento o di rigenerazione, quindi il continuo rinnovamento del tessuto osseo.

In tale processo di rimaneggiamento osseo intervengono:

- Osteoblasti: producono la matrice organica che lega i cristalli di idrossiapatite
- Osteoclasti: favoriscono la disgregazione dell'osso, mediante la produzione di enzimi che digeriscono la matrice inorganica ed il collagene
- Osteociti: derivano dagli osteoblasti intrappolati nella matrice organica. Sintetizzano la matrice inorganica liberandola per esocitosi

L'Osteoblasta stimolato dall'organismo o da stimoli esterni, nel produrre nuova matrice ossea incorpora per chemio-adsorbimento i traccianti ossei presenti nel

sangue. Quindi il radiotracciante  $^{99m}\text{Tc-HDP}$  si lega alla matrice ossea (cristalli di idrossiapatite) a livello dei principali siti di rimaneggiamento.



*Figura 3: Biodistribuzione fisiologica del  $^{99m}\text{Tc-HDP}$ : normale captazione a livello dell'osso nei diversi distretti corporei; sono, inoltre, evidenziati i reni e la vescica vie di eliminazione fisiologica del tracciante dall'organismo.*

### **5.3 RADIOFARMACO NELLA RICERCA DELL'AMILOIDOSI**

È stato dimostrato come i radiofarmaci osteotropi utilizzati per la scintigrafia ossea ed in particolare  $^{99m}\text{Tc}$ -Pirofosfato,  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD (3,3-difosfono-1,2-

propandicarboxylic acid) e  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP (hydroxymethylene diphosphonate) siano in grado di fissarsi alle fibrille amiloidi permettendo di identificare il loro accumulo a livello del muscolo cardiaco. [13] [14]

Il meccanismo di captazione dei difosfonati nell'amiloidosi TTR è stato indagato negli anni '70 da alcuni autori che avevano ipotizzato come il meccanismo di captazione più plausibile fosse il legame che si veniva a creare tra le molecole di fosfato contenute nei traccianti osteotropi e molecole di calcio contenute in elevata quantità nelle fibrille amiloidi di TTR. [15]

E' stata, inoltre, dimostrata anche un'adeguata captazione di  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP (diphosphonate) nelle fibrille di amiloidosi TTR correlata e quindi il loro possibile utilizzo nella diagnosi di amiloidosi. [16]

I depositi di fibrille hanno tre componenti strutturali principali; la proteina precursore, il proteoglicano eparina solfato e un componente P calcio dipendente che lega insieme le fibrille. Lo studio di Pepi et al suggerisce che proprio questo componente P, che è comune a tutti i tipi di amiloide potrebbe legarsi alle fibrille tramite un meccanismo calcio mediato, da questo deriverebbe la capacità di captare il  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP.

Inoltre, uno studio condotto da Stats et al. ha dimostrato tramite biopsia endomiocardica dei cuori affetti da ATTR, una maggior densità di microcalcificazioni. Va segnalato che in alcuni casi anche in amiloidosi cardiaca AL erano presenti microcalcificazioni paragonabili all'amiloidosi ATTR, questo suggerisce una base fisiopatologica del processo di formazione delle fibrille amiloidi.

I radiotraccianti difosfonati per la ricerca di amiloidosi cardiaca hanno una sensibilità maggiore del 99% mentre una specificità de 68%.

La specificità è da riferirsi alla diagnosi differenziale tra AC da TTR o da AL, questo perché anche l'amiloidosi cardiaca AL in alcuni casi capta il radiofarmaco.

[4] [7] [8] [9]

## 5.4 MARCATURA $^{99m}\text{Tc}$ -HDP

Per la produzione del radiofarmaco bisogna eluire dal generatore Mo-Tc un volume compreso tra i 3 mL e i 10 mL, la cui attività massima introducibile deve essere 14000 MBq. L'eluato deve essere introdotto nel Vial contenente il farmaco in polvere, agitandolo poi per almeno 30 secondi. Questa marcatura che avviene a temperatura ambiente senza bisogno di riscaldare l'eluato si chiama a Freddo. La stabilità del radiofarmaco è garantita per 8 ore dal momento della preparazione del composto.

## 5.5 CONTROLLI DI QUALITÀ

I controlli di qualità sono una serie di verifiche che vanno a valutare l'ottimizzazione delle varie fasi di marcatura relativamente ad efficacia ed efficienza nella produzione del radiofarmaco. Lo scopo principale dei controlli è quello di garantire la conformità agli standard delle preparazioni secondo le Norme di Buona Preparazione.

I test biologici sono quelli effettuati e garantiti dal produttore mentre i test chimico-fisici sono quelli effettuati dall'utilizzatore.

La purezza radiochimica, garantita dall'utilizzatore, viene definita come la frazione di attività totale dovuta al radionuclide desiderato. Bisogna verificare che la percentuale di impurità dovuta al  $^{99m}\text{Tc}$ -idrolizzato e  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetato rientri nei limiti, nel caso del  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP il radiofarmaco deve essere:  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP > 95%.

Questo processo di verifica avviene tramite cromatografia a doppia corsa.

La cromatografia permette infatti di separare le differenti sostanze presenti nel campione, attraverso una migrazione differente dovuta alla combinazione dei fattori di ritenzione sulla fase stazionaria ed il trascinarsi sulla fase mobile.

La fase stazionaria più utilizzata è ITLC (Instant Thin Layer Chromatography), mentre le fasi mobili utilizzate nella cromatografia per  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP sono Metil-Etil-Chetone per la prima corsa e Sodio Acetato per la seconda.

La fase stazionaria viene poi posta su un supporto e letta tramite un radiocromatografo che tramite una scansione di tutto il supporto cromatografico crea un grafico dove è riportata una curva relativa ai conteggi emessi dal campione.

## 5.6 PROTOCOLLO DI ACQUISIZIONE GENERALE DELLA SCINTIGRAFIA OSSEA

Il protocollo di acquisizione prevede l'ottenimento di immagini total body, un particolare statico del torace ed eventuali immagini tomografiche Spect/TC. I parametri di acquisizione delle diverse scansioni sono riportati nelle tabelle sottostanti.

<b>Total Body</b>	
<b>Matrice</b>	1024x256
<b>Acquisizione</b>	Entrambi detettori
<b>Modalità</b>	Body contour
<b>Collimatori</b>	LEHR
<b>Velocità</b>	15 cm/min

*Tab. 1: Parametri per acquisizione Total Body.*

<b>Statica Planare</b>	
<b>Matrice</b>	256x256
<b>Zoom</b>	1
<b>Acquisizione</b>	Entrambi detettori
<b>Collimatori</b>	LEHR
<b>Tempo di scansione</b>	Conteggi

*Tab. 2: Parametri per acquisizione Statica Planare.*

<b>SPECT</b>	
<b>Matrice</b>	128x128
<b>Zoom</b>	1
<b>Acquisizione</b>	Entrambi detettori
<b>Collimatori</b>	LEHR
<b>Modalità</b>	Step & Shoot-Body contour
<b>Arco di Rotazione</b>	360 (180 x detettore)
<b>Angolo di Rotazione</b>	3°
<b>Configurazione</b>	180°
<b>N° frames</b>	120
<b>Durata frames</b>	15 sec
<b>Acquisizione TC</b>	Full

*Tab. 3: Parametri per acquisizione SPECT.*

<b>PARAMETRI TC</b>	
<b>Scansione</b>	Elicoidale
<b>KV</b>	120
<b>mA</b>	80
<b>Pitch</b>	1.375
<b>Tempo di rotazione</b>	0.8 s
<b>SFOV</b>	LARGE
<b>CTDi VOL.</b>	4.34886 mGy
<b>RECON 1</b>	<b>RECON 2</b>
<b>Recon Type Standard</b>	<b>Recon Type Bone</b>
<b>Matrice 512</b>	<b>Matrice 512</b>
<b>DFOV 50</b>	<b>DFOV 50</b>
<b>Thockness 3.75</b>	<b>Thockness 1.25</b>

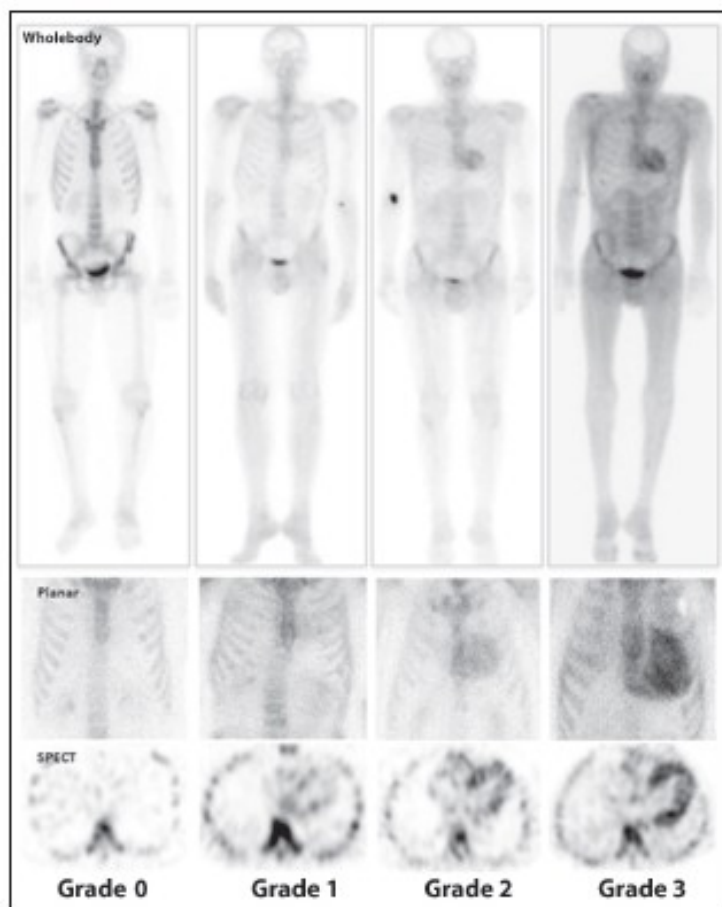
*Tab. 4: Parametri per acquisizione TC.*

## 5.7 ANALISI GENERICA DELLE IMMAGINI

Registrato lo studio scintigrafico le immagini ottenute per la diagnosi di amiloidosi miocardica possono essere analizzate con due modalità diverse. Il primo metodo utilizza il visual score di Perugini, che visivamente confronta la captazione cardiaca con la captazione delle coste controlaterali. Con questo scorre visivo possiamo individuare 4 gradi di captazione (figura 4):

- 0 quando non c'è alcuna captazione cardiaca
- 1 quando la captazione cardiaca è lieve e inferiore rispetto alle coste
- 2 quando la captazione cardiaca è moderata ovvero maggiore o uguale a quella delle coste
- 3 quando la captazione cardiaca è nettamente superiore a quella delle coste

[11]



*Figura 4: Rappresentazione dei gradi del Perugini Score visual rispettivamente sulle immagini total body, sulle immagini statiche planari e sulle immagini tomografiche assiali.*

Una seconda tipologia di analisi è quella semi-quantitativa, che prevede la generazione di ROI (Region Of Interest) posizionate rispettivamente sul cuore e su regioni di confronto (aree non target) scelte in modo arbitrario in base ai diversi studi presenti in letteratura (total body, pelvi, cranio, coste). Posizionate le ROI vengono registrati i valori di conteggi ottenuti (totali, medi, ect) ed utilizzando i conteggi medi calcolati i rapporti tra cuore e regioni di confronto per ottenere il relativo punteggio (*score*) semi-quantitativo.

In letteratura autori diversi hanno proposto diverse tipologie di analisi semi-quantitativa, con le più svariate modalità di contornamento delle ROI e di calcolo dello score. Alcuni esempi di analisi sono descritti di seguito e mostrati in figura 5. [10]:

- A. Heart/Whole Body Rectangular ROI ratio (H/WB-r): nell'immagine TB si disegna una grande ROI rettangolare che comprenda tutto il profilo corporeo, una ROI circolare sul cuore, due ROI sui reni e una sulla vescica. Il parametro semi-quantitativo proposto è dato da:

$$H/WBr = ROI \text{ cuore} / [ROI \text{ TB} - (ROI \text{ reni} + ROI \text{ vescica})]$$

- B. Heart/Whole body profile ROI ratio (H/WB-P): analogo all'indice precedente, con l'eccezione che la ROI comprendente tutto il corpo è disegnata lungo il profilo anatomico

- C. Heart/Pelvis ratio (H/P): Vengono disegnate due ROI, una sul cuore nell'immagine anteriore, mentre nell'immagine posteriore una ROI che comprenda pelvi e sacro. Il parametro semi-quantitativo proposto è dato da:

$$H/P = ROI \text{ cuore} / ROI \text{ pelvi}$$

- D. Heart/Skull ratio (H/S): si tracciano due ROI sul cuore, una sull'immagine anteriore e l'altra sulla posteriore, e due ROI rettangolari semplificate attorno al cranio (proiezione anteriore e posteriore). L'indice semiquantitativo è:



$$H/S = \text{ROI heart} / \text{ROI skull}$$

- E. Heart/Pelvis ratio con correzione del fondo (H/PF): analogo al rapporto H/P, tiene conto nell'immagine anteriore della correzione di fondo tramite ROI controlaterale al cuore e nella proiezione posteriore la correzione è data da ROI sulle creste iliache.
- F. Heart/Controlateral Lung ratio (H/CL): una ROI disegnata sul cuore e una sull'emi-costato controlaterale. Il parametro semi-quantitativo è dato da:

$$H/CL = \text{ROI cuore} / \text{ROI controlaterale. [10]}$$

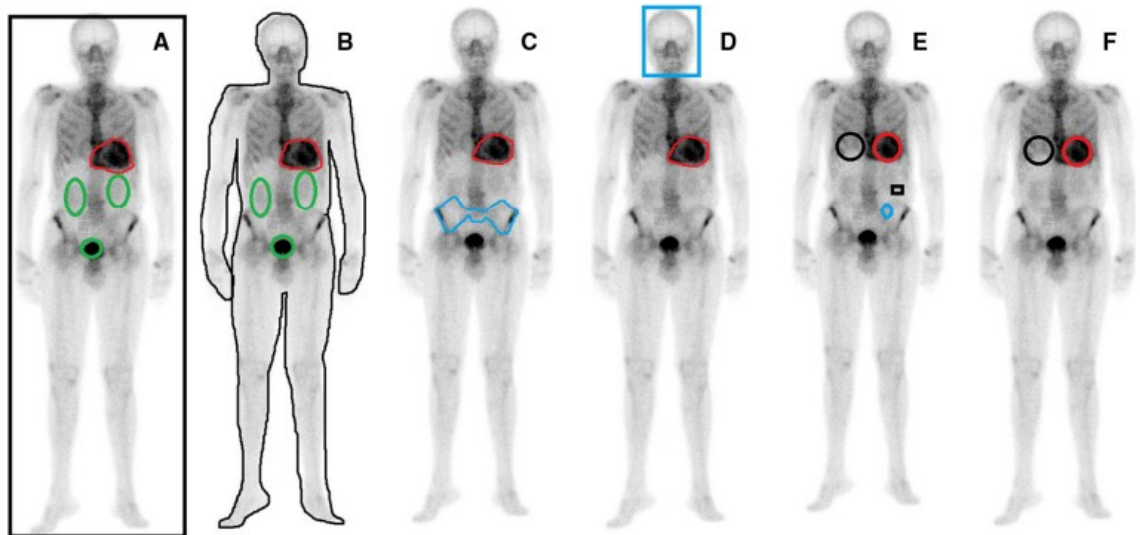


Figura 5: Rappresentazione delle varie ROI

Nel nostro studio abbiamo scelto di utilizzare l'ultimo metodo riportato sopra (vedi punto 7), che disegna la Roi "CL" di confronto sul costato controlaterale alla sede cardiaca (sul quale viene disegnata la Roi "H"); tale scelta è stata dettata dalla semplicità e riproducibilità nel disegnare le ROI proposte e la concordanza dei risultati ottenuti con il metodo qualitativo di Perugini.

Nel nostro studio per poter meglio valutare visivamente la captazione cardiaca rispetto alla captazione costale abbiamo deciso di acquisire oltre alle immagini Total Body anche immagini statiche planari della regione toracica ed immagini tomografiche SPECT/TC, utilizzate successivamente anche per il calcolo dei indici semiquantitativi.

L'altra questione riguarda la soglia del valore di H/CL che permette di distinguere tra esame negativo e positivo. Il valore soglia riportato nei lavori sperimentali pubblicati varia da 1.28 per Galat et al e Abulizi et al, a 1.46 per Gallini et al, e 1.5 per Bokhari et al. [12]

## **6 MATERIALI E METODI**

I pazienti arruolati per questa tesi sono stati 20, 15 di sesso maschile e 5 di sesso femminile, di età compresa tra 34 e 88 con una media di 74 anni. Le indagini scintigrafiche per sospetta amiloidosi cardiaca sono state eseguite da febbraio 2021 ad agosto 2022. Tutti i pazienti avevano eseguito la scansione Total Body (20/20), 13 dei 20 pazienti avevano eseguito anche immagini Statiche Planari e 15 di 20 avevano eseguito anche l'acquisizione SPECT/TC.

Tutti i pazienti analizzati venivano inviati ad eseguire la scintigrafia ossea in quanto era presente il sospetto di amiloidosi miocardica per la presenza di reperti cardiaci inspiegabili, quali ipertrofia cardiaca, insufficienza cardiaca con frazione di eiezione ridotta, associata a fibrillazione atriale, associata a disfunzione diastolica e/o storia familiare di amiloidosi miocardica.

Di seguito sono esposte le modalità operative e il protocollo utilizzato per questo studio.

### **6.1 PREPARAZIONE DEL PAZIENTE**

L'esecuzione di tale esame non richiede preparazione specifica e non è neppure richiesto il digiuno.

### **6.2 ATTIVITÀ SOMMINISTRATA**

Il radiofarmaco deve essere somministrato per via endovenosa dal medico nucleare che ne prescrive la dose. L'attività del radiofarmaco deve essere ottimizzata, ossia determinata tenendo conto della qualità d'immagine necessaria per ottenere l'informazione diagnostica, nonché della radioprotezione del paziente

secondo il decreto legislativo 101/2020 che garantisce la protezione della salute degli individui rispetto alle radiazioni dovute all'esposizione medica.

In questa scelta il medico nucleare tiene anche conto dei livelli diagnostici di riferimento (LDR, Livelli di attività per gruppi di pazienti di dimensioni standard) dei radiofarmaci.

La classe di dose per la scintigrafia ossea è la II, secondo la classificazione prevista dal D.Lgs 101/2020, ossia l'esposizione del paziente ad una dose efficace media tra 1 e 5 mSv.

Per la scintigrafia ossea nell'adulto l'attività media da somministrare in singola iniezione dovrebbe essere compresa tra 300-740 MBq, indicativamente 8-10 MBq/Kg.

L'attività somministrabile al bambino è una frazione di quello somministrato all'adulto in correlazione al peso corporeo, l'attività minima somministrabile è di 40 MBq. [18]

From: [The EANM practice guidelines for bone scintigraphy](#)

	Children						Adults
	3.5 kg	10 kg	20 kg	30 kg	40 kg	50 kg	
Activity (MBq)	40	95	170	240	310	375	300-740
Effective dose (mSv)	2.0	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9-4.0

Tab 5: Linee guida EANM, attività somministrabile.

Nel campione di 20 pazienti analizzato, l'attività somministrata è stata in media di 740 MBq.

### 6.3 STRUMENTAZIONE

Secondo le linee guida EANM sulla scintigrafia con difosfonati per l'amiloidosi cardiaca, la gamma camera deve avere testata doppia con collimatori a fori paralleli a bassa energia e alta risoluzione (LEHR), la finestra energetica deve essere centrata sul picco del  $^{99m}\text{Tc}$  (140 KeV) con range energetico  $\pm 15/20$  %.

L'apparecchiatura attualmente in uso nel reparto di Medicina Nucleare dell'Ospedale Civile di Rovigo è una SPECT/CT General Electrics Discovery NM/CT 670.

## **6.4 PROTOCOLLO PER RICERCA AMILOIDOSI**

Nel caso specifico dell'indagine nucleare per amiloidosi cardiaca il protocollo adottato dall'ULSS 5 prevede:

- la somministrazione del radiofarmaco,
- l'attesa di due ore per garantire un'adeguata captazione, durante le quali il paziente beve circa 500 ml di acqua e svuota frequentemente la vescica,
- la successiva registrazione di immagini Total body, sia statiche in proiezione anteriore del distretto toracico che immagini SPECT-CT sempre del distretto toracico.

## **6.6 PROCEDURA OPERATIVA**

Prima di iniziare l'esame il paziente esegue il colloquio con il medico nucleare che valuterà se l'indicazione posta dal clinico è corretta, valuterà la documentazione portata dal paziente ed eseguirà l'anamnesi; lo informerà sulla modalità di esecuzione dell'esame e sull'impiego di farmaci radioattivi, fornendo tutte le disposizioni comportamentali che il paziente dovrà seguire alla dimissione (fornite anche per scritto) e raccogliendo il consenso informato scritto.

Tramite il sistema di tracciabilità il medico nucleare richiederà la dose del radiofarmaco, che verrà preparata dal TSRM nella cella calda apposita e quindi verrà eseguita la somministrazione e.v.

A questo punto il paziente viene fatto accomodare nella sala di attesa della zona "calda" ed invitato ad idratarsi e svuotare spesso la vescica nell'attesa della captazione del radiofarmaco, al fine di ridurre l'irradiazione e migliorare il rapporto bersaglio (osso)/fondo.

Trascorse le due ore necessarie per garantire l'adeguata captazione del tracciante, il paziente viene invitato a svuotare la vescica un'ultima volta prima di iniziare la registrazione delle immagini.

Il paziente viene quindi fatto sdraiare sul lettino con braccia distese lungo i fianchi e piedi intra ruotati (per svolgere il collo femorale), dopo aver predisposto la Gamma Camera ed agganciato all'anagrafica corretta identificativa del paziente l'idoneo protocollo di acquisizione. Si procede quindi all'acquisizione dell'esame iniziando con l'acquisizione Total Body, seguita dall'acquisizione Statica Planare ed eventualmente della SPECT/TC. Prima di far partire l'acquisizione istruire il paziente sul mantenimento dell'immobilità per tutto il tempo dell'acquisizione.

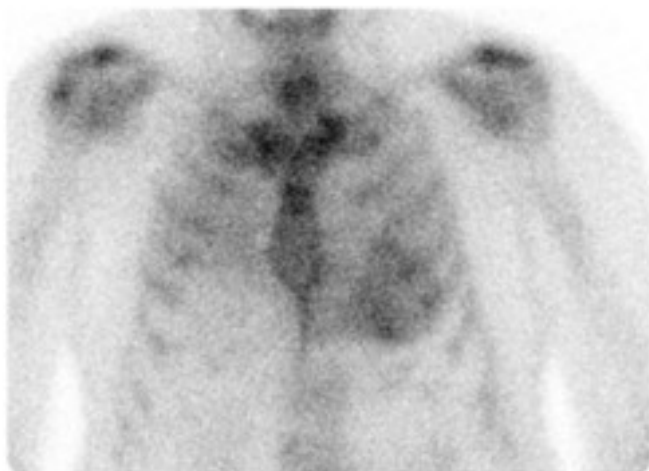
## **6.7 ELABORAZIONE**

L'elaborazione prevede la creazione di report "visivi" con le immagini Total Body e statiche mettendo a video le immagini acquisite e provvedendo a ottimizzare l'intensità di scala dei grigi.

La ricostruzione delle immagini SPECT/TC con identificazione delle immagini transassiali, dove è evidente la maggior captazione a livello cardiaco, avviene con metodo iterativo (iterazioni 2, subset 10) attraverso algoritmo OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization) e corrette con filtro Butterworth, correzione scatter e attenuazione.

## **6.8 ANALISI DELLE IMMAGINI E RISULTATI**

Ottenuti i report abbiamo eseguito l'analisi visiva per la determinazione degli score di Perugini dapprima sulle immagini Total Body, che sono state eseguite in tutti i pazienti considerati nel nostro studio e successivamente nelle immagini statiche del torace eseguite in 13 dei 20 pazienti considerati, riportando gli score visivi su apposita tabella (Tab. 9).



*Figura 6: Statica anteriore Paz. 20, **Score di Perugini** = 3, paziente positivo.*



*Figura 7: Statica anteriore Paz. 8, **Score di Perugini** = 0, paziente negativo.*

Dall'analisi visiva eseguita sulle immagini Total Body sui 20 pazienti analizzati emerge che 10 (pazienti dal n° 1 al n° 10 = gruppo 1) avevano uno score di Perugini tra 0 ed 1, mentre gli altri 10 avevano uno score di 2-3 (pazienti dal n° 10 al n° 20 = gruppo 2).

Visivamente non si evidenziava una differenza di score di Perugini tra immagini Total Body ed immagini planari nei 13 pazienti su 20 che avevano entrambe le acquisizioni.

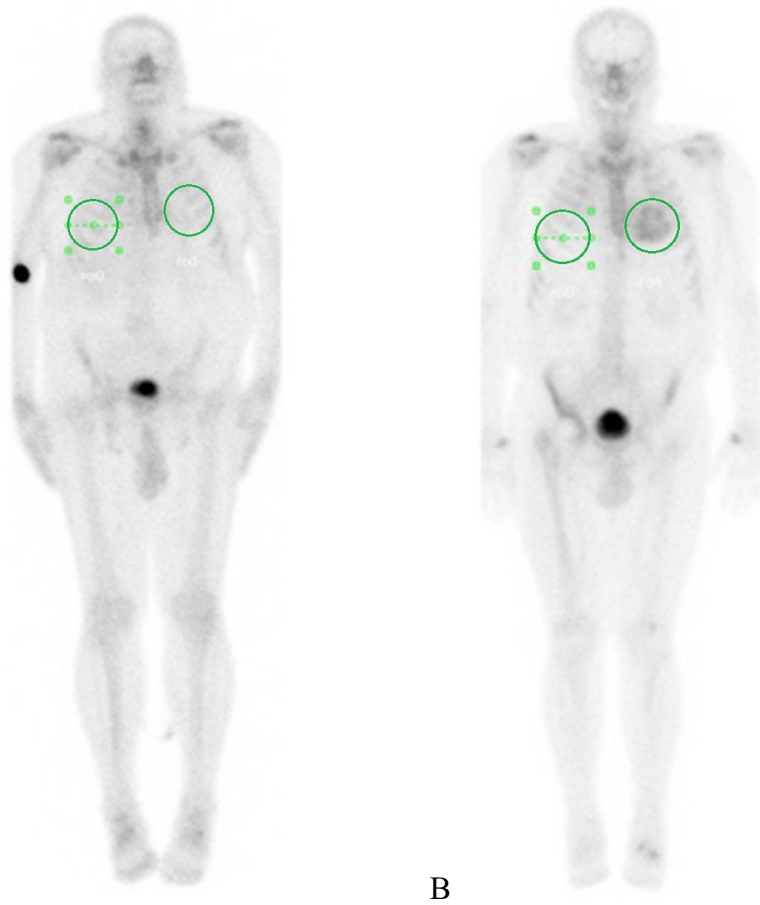
Successivamente abbiamo eseguito la valutazione semiquantitativa.

A tale proposito tra i metodi semiquantitativi descritti sopra abbiamo scelto di utilizzare il metodo H/CL, che prevede di generare, oltre alla ROI "H" sull'area cardiaca, la ROI "CL" di confronto sul costato controlaterale; tale scelta è stata dettata dalla semplicità e riproducibilità nel disegnare le ROI proposte e la concordanza dei risultati ottenuti con il metodo qualitativo di Perugini.

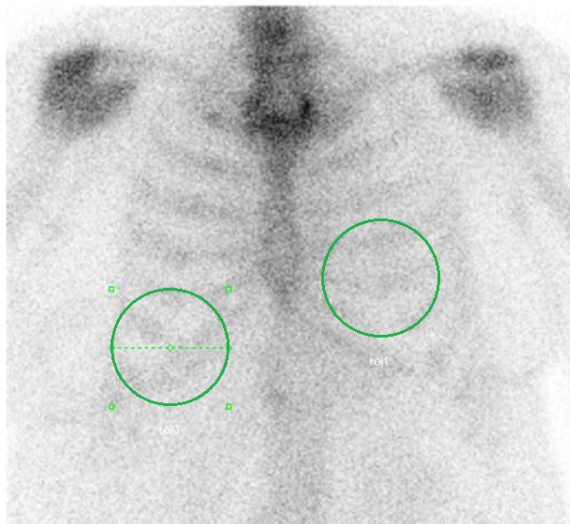
L'operazione di contorno delle ROI è stata eseguita nella stazione di elaborazione GE Xeleris, attraverso lo strumento ROI circolare, tracciando aree di circa 1500 pixel, come mostrato in figura 8, 9 e 10. È stata in primis posizionata la ROI sul ventricolo sinistro (ROI H) e poi copiata ed incollata sul costato controlaterale (ROI CL), in modo da ottenere un valore di indice di captazione quanto più veritiero possibile grazie all'utilizzo di regioni di interesse (misurate in pixel) uguali.

Tale operazione è stata dapprima disegnata sulle immagini Total Body (tutti i 20 pazienti) e poi anche nelle immagini statiche del torace (in 13 dei 20 pazienti analizzati).

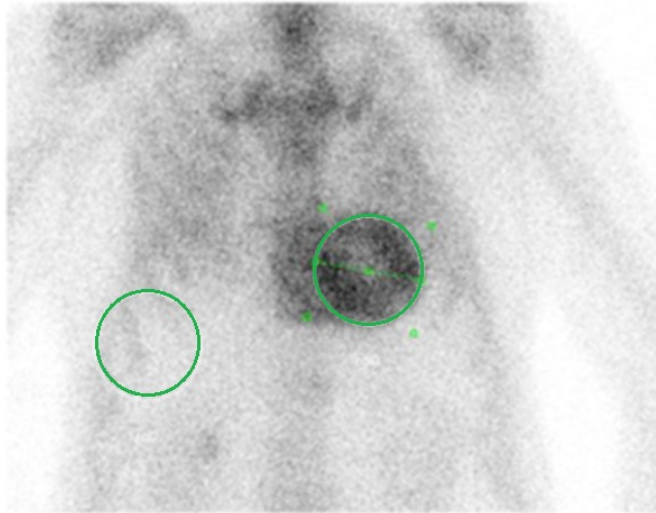




*Figura 8: Total Body: A. paziente negativo, B. paziente positivo*



*Figura 9: Statica Torace Paz. 5 con ROI circolari disegnate rispettivamente sulla regione cardiaca (H) e sulla regione costale controlaterale in paziente negativo (Score di Perugini = 0).*



*Figura 10: Statica Torace Paz. 17, con ROI circolari disegnate rispettivamente sulla regione cardiaca (H) e sulla regione costale controlaterale in paziente positivo (Score di Perugini = 3).*

Dalle ROI posizionate sulle immagini statiche del torace e sulle immagini Total Body sono stati tabulati i seguenti dati (Tab.5):

- Conteggi Totali
- Minimo Conteggio
- Massimo Conteggi
- Media Conteggi
- Deviazione Standard
- Area (pixels)

Completata l'elaborazione semiquantitativa sulle immagini planari (Statiche Planari del torace e Total Body) siamo passati all'analisi semiquantitativa delle immagini SPECT/TC. Anzitutto abbiamo individuato la slice dove l'indice di captazione visivo era più alto, dopodiché sempre in questa slice abbiamo individuato l'area con numero di conteggi più alto ed in tale punto abbiamo disegnato una ROI.

L'operazione di contorno delle ROI è stata eseguita nella stazione di elaborazione GE Xeleris, attraverso lo strumento ROI circolare, tracciando aree di circa 45 pixel, come mostrato in figura 11 e 12.

In caso di pazienti positivi (con captazione miocardica evidente) la ROI veniva generalmente posizionata a livello del setto interventricolare (Fig 11).

Se le immagini non mostravano captazione a livello miocardico (paziente negativo) la ROI del cuore veniva disegnata sulla parete laterale del ventricolo sinistro, dove poteva essere posizionata correttamente sul miocardio ventricolare evitando di comprendere captazioni extracardiache. (Fig. 12). In seguito, la ROI disegnata veniva copiata e la si posizionava su una costa dell'emittoce controlaterale (a Dx) avente una captazione di intensità media. Le ROI disegnate sulle immagini SPECT/TC erano, per motivi anatomici, di dimensioni inferiori a quelle disegnate sulle immagini planari e questo permetteva di escludere dalla ROI captazioni non cardiache.

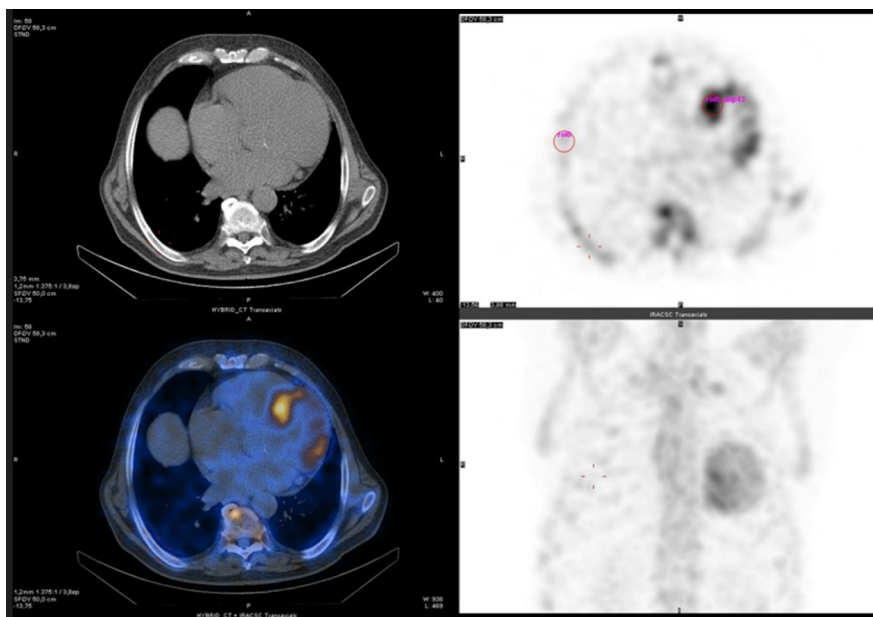


Figura 11: SPECT/TC Paz. 16, paziente positivo (Score di Perugia = 2).

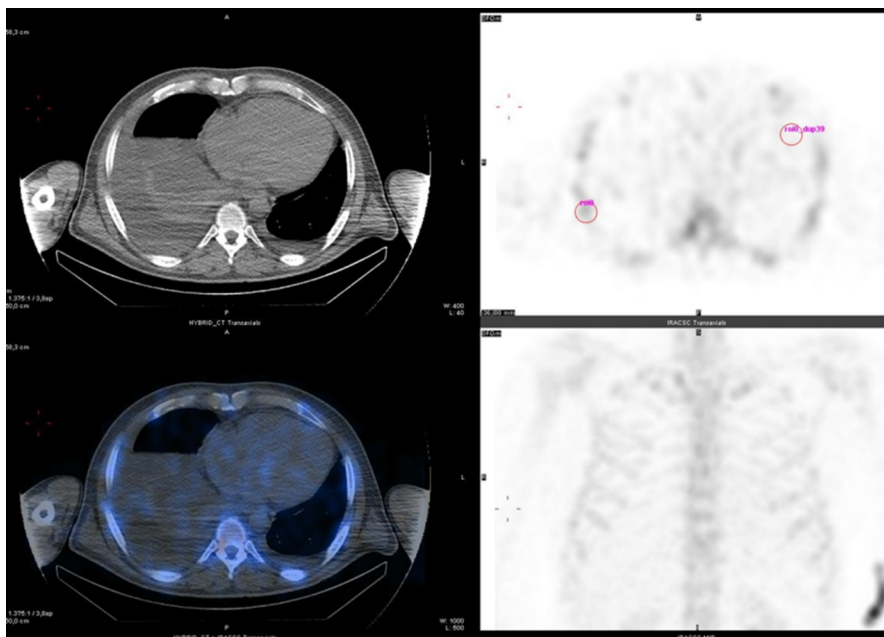


Figura 12: SPECT/TC Paz.7, paziente negativo (Score di Perugini = 0).

Anche per le ROI disegnate sulle immagini SPECT venivano raccolti i seguenti dati poi riportati in Tab.6:

- Conteggi Totali
- Minimo Conteggio
- Massimo Conteggi
- Media Conteggi
- Area (pixels)

Un esempio di dati raccolti per alcuni pazienti sono riportati nelle tabelle sottostanti (Tab.6, Tab.7 e Tab.8).

PAZIENTE 3						
	STATICA		TOMO		TOTAL BODY	
	CUORE	COSTE	CUORE	COSTE	CUORE	COSTE
Total Count	34936	35553	1910	1776	46640	46714
Min. Count	7	8	16	15	12	9
Max. Count	47	49	63	82	57	64
Avg. Count	23.353	23.749	42,444	39,467	31,471	31,542
Std. Dev.	6.263	6.097	X	X	7,811	7,819
Area (Px)	1496	1497	45	45	1482	1481

Tab. 6: esempio di raccolta dati Paz. 3 (negativo), in questo caso sono presenti tutti i tipi di scansione.

PAZ. 15						
	STATICA		TOMO		Total BODY	
	CUORE	COSTE	CUORE	COSTE	CUORE	COSTE
Total Count			10682	1515	137553	72319
Min. Count			107	3	33	14
Max. Count			374	63	155	93
Avg. Count			237,378	33,667	92,628	48,831
Std. Dev.					21,464	12,853
Area (Px)			45	45	1485	1481

Tab. 7: esempio di raccolta dati paziente 15 (positivo), in questo caso il paziente aveva eseguito la scansione Total Body e l'acquisizione Tomografica (SPECT/TC); non eseguiva le immagini planari statiche.

PAZ. 17						
	STATICA		TOMO		Total BODY	
	CUORE	COSTE	CUORE	COSTE	CUORE	COSTE
Total Count	70818	18374			140882	41467
Min. Count	21	2			19	8
Max. Count	78	30			154	64
Avg. Count	46.962	12.315			95,062	27,886
Std. Dev.	9.812	4.326			25,443	8,86
Area (Px)	1508	1492			1482	1487

Tab. 8: esempio di raccolta dati paziente 17 (positivo), erano acquisite immagini planari Total Body e Statiche Planari del torace; non erano presenti le immagini SPECT/TC.

Per tutti i pazienti una volta raccolti i conteggi all'interno delle ROI disegnate sul cuore e sulle coste abbiamo calcolato gli indici H/CL relativi alle immagini statiche e Total Body utilizzando i conteggi totali e gli indici H/CL relativi alle immagini tomografiche utilizzando i conteggi medi.

L'indice semi-quantitativo H/CL è stato calcolato con la seguente formula:

**H/CL (Heart/Controlateral Lung ratio) = ROI cuore (H)/ROI controlaterale (CL).**

Tutti i dati ottenuti sono stati poi riportati in tabella (Tab.5) dove si evidenziano gli score di Perugini, i conteggi ricavati dalle ROI posizionate sulle regioni cardiaca e di riferimento (coste controlaterali), gli indici H/CL calcolati sulle immagini Total Body, Statiche Planari del torace e SPECT/CT (colonne evidenziate in giallo).

	Visual score (Perugini)	TOTAL BODY			PLANARE			SPECT/TC		
		conteggi totali cuore (H)	conteggi totali cuore controlat	H/CL Total Body	conteggi totali cuore (H)	conteggi totali coste	H/CL planare	conteggi max cuore (H)	conteggi max coste controlat	H/CL SPECT/TC
Paz. 1	0-1	38762	29023	1,34			30	41	0,73	
Paz. 2	0-1	54653	48636	1,12	25738	24296				
Paz. 3	0-1	46640	46714	1,00	34936	35553	63	82	0,77	
Paz. 4	0-1	119228	105622	1,13			85	107	0,79	
Paz. 5	0-1	35202	30294	1,16	31614	27094				
Paz. 6	0-1	42960	42386	1,01	25264	25278	28	44	0,64	
Paz. 7	0-1	59423	53018	1,12	110616	100881	28	85	0,33	
Paz. 8	0-1	39919	40618	0,98	20755	22218	42	128	0,33	
Paz. 9	0-1	64043	62823	1,02	29910	29861				
Paz. 10	0-1	38517	38008	1,01	32173	35288	849	898	0,95	
Paz. 11	2-3	85537	30752	2,78			231	98	2,36	
Paz. 12	2-3	101182	61872	1,64			153	67	2,28	
Paz. 13	2-3	50335	24430	2,06	75820	38718				
Paz. 14	2-3	98765	71689	1,38			214	100	2,14	
Paz. 15	2-3	137553	72319	1,90			374	63	5,94	
Paz. 16	2-3	101018	40275	2,51			233	55	4,24	
Paz. 17	2-3	140882	41467	3,40	70818	18374				
Paz. 18	2-3	92789	36409	2,55	75289	28367	169	37	4,57	
Paz. 19	2-3	90346	45130	2,00	72460	29960	5553	1587	3,50	
Paz. 20	2-3	85137	48844	1,74	93421	56545	6641	1476	4,50	

Tab. 9: Tabella riassuntiva di tutti i dati sperimentali analizzati.

Abbiamo successivamente eseguito l'analisi statistica dei dati ottenuti.

In primo luogo, abbiamo valutato l'accordo degli indici calcolati tra le seguenti coppie di immagini: Planari vs Total Body, Planari vs SPECT/TC e Total Body vs SPECT/CT al fine di evidenziare la concordanza dei valori e confermare la possibilità di calcolare gli indici utilizzando indifferentemente le diverse immagini. Per eseguire tale valutazione abbiamo riportato i valori degli indici calcolati su un apposito grafico, calcolato la retta di regressione e l'indice di correlazione ( $R^2$ ) per le diverse coppie di immagini.

Si considera una "BUONA" correlazione tra i due indici (parametri) nel caso di  $R^2 > 0.5$ , ed una correlazione "OTTIMA" se  $R^2 > 0.8$ .

In 13/20 pazienti il rapporto H/CL Planare confrontato con il rapporto H/CL Total Body, evidenzia una ottima correlazione (Indice di correlazione  $R^2 = 0.9796$ ). Fig. 13.

In 8/20 pazienti il rapporto H/CL Planare confrontato con il rapporto H/CL SPECT/TC, evidenzia una buona correlazione (Indice di correlazione  $R^2 = 0.7691$ ). Fig. 14.

In 15/20 pazienti il rapporto H/CL TB confrontato con il rapporto H/CL SPECT/TC, evidenzia una discreta correlazione (Indice di correlazione  $R^2 = 0.5472$ ). Fig. 15.



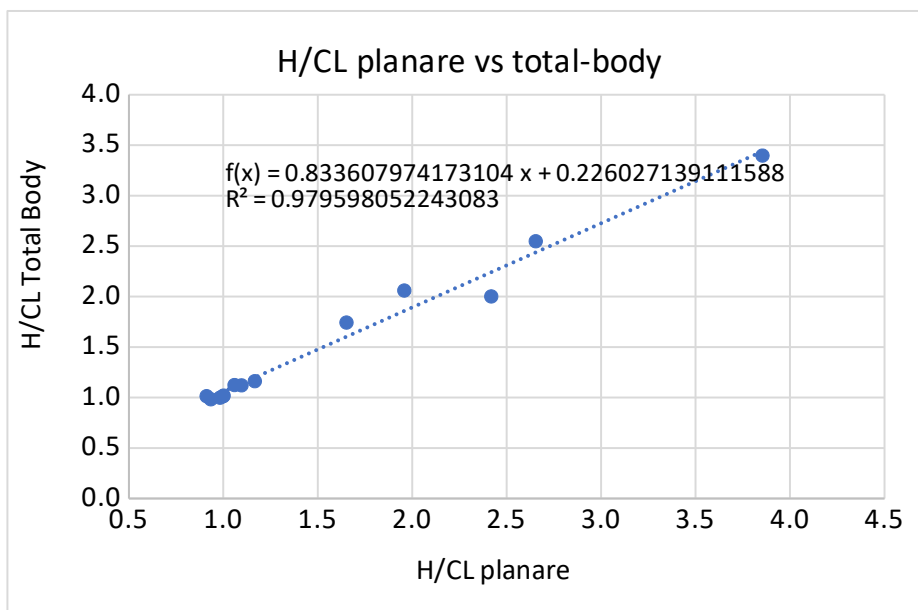


Figura 13: Il seguente grafico mette in relazione il rapporto H/CL Planare con il rapporto H/CL Total Body, che evidenzia una ottima correlazione (Indice di correlazione  $R^2 = 0.9796$ ).

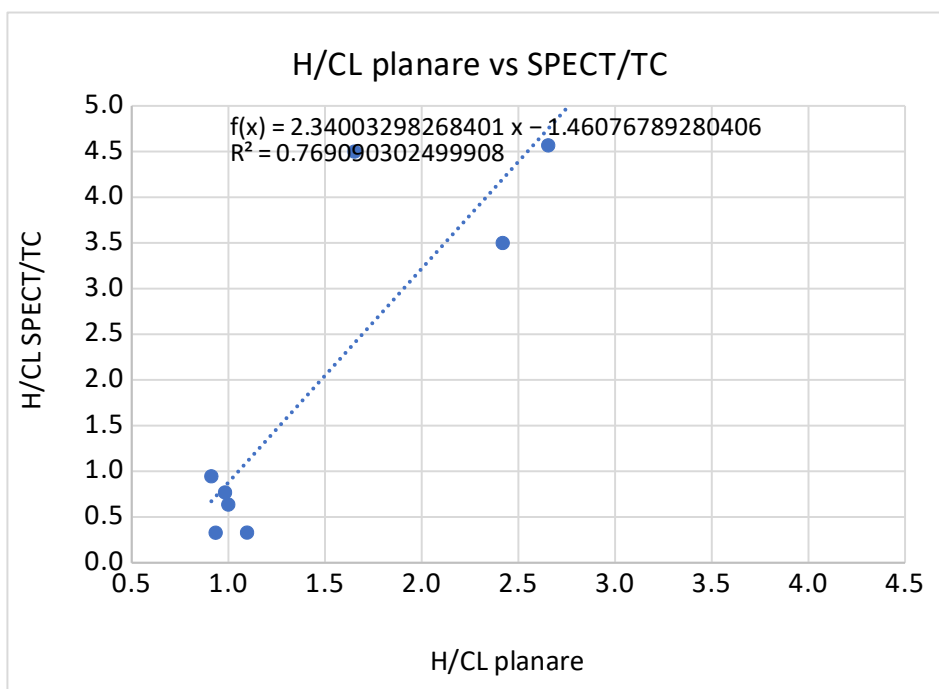


Figura 14: Il seguente grafico mette in relazione il rapporto H/CL Planare con il rapporto H/CL SPECT/TC, che evidenzia una buona correlazione (Indice di correlazione  $R^2 = 0.7691$ ).

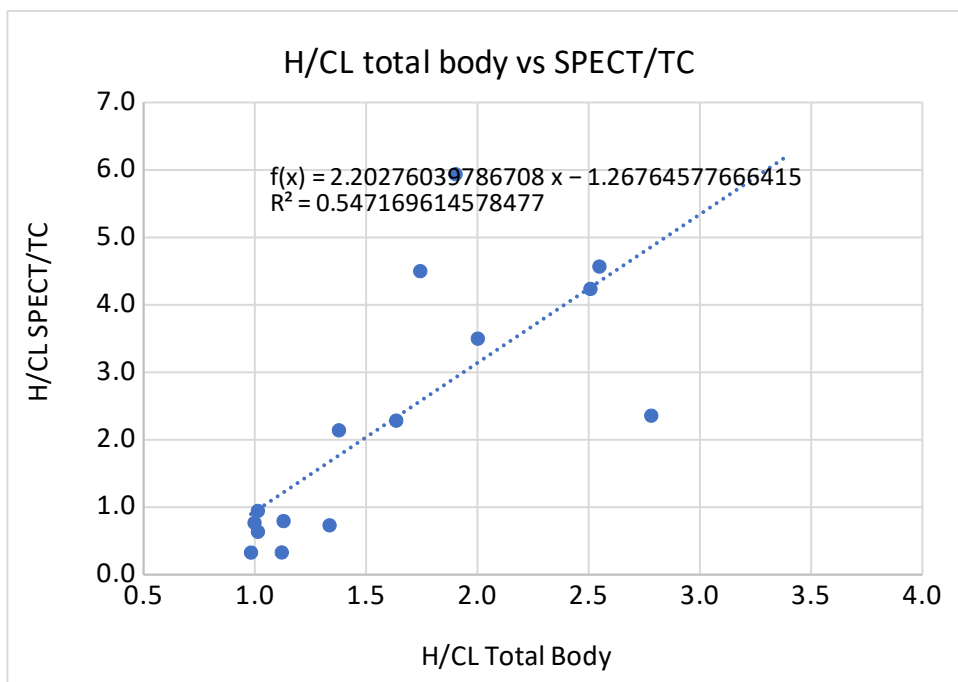


Figura 15: Il seguente grafico mette in relazione il rapporto H/CL TB con il rapporto H/CL SPECT/TC, che evidenzia una discreta correlazione (Indice di correlazione  $R^2 = 0.5472$ ).

Nei pazienti che avevano sia l’acquisizione Total Body sia quella planare statica (13/20 pazienti), abbiamo inoltre calcolato la differenza percentuale tra gli indici  $H/CL_{TB}$  e  $H/CL_{Planare}$  utilizzando la seguente formula:

$$(H/CL_{TB} - H/CL_{Planare}) / H/CL_{Planare}$$

ottenendo una differenza percentuale dell’indice H/CL Total Body vs Statica Planare variabile da -12% a +5%.

Abbiamo poi valutato il livello di significatività dei dati applicando il T-test per campioni indipendenti calcolando il p-Value con il software MedCalc ed eseguito un’ulteriore analoga analisi utilizzando il Box-Plot.

In relazione a tali test si precisa che in Statistica un elemento fondamentale per l’analisi dei dati raccolti è verificare il livello di significatività tramite l’analisi del p-Value.

Per l'analisi statistica dei dati raccolti è stato utilizzato il software MedCalc, applicando il T-test per campioni indipendenti.

Il p-Value ci permette di capire se la differenza tra il risultato ottenuto e quello ipotizzato sia frutto di una casualità oppure sia dovuto a una differenza statisticamente significativa.

Per convenzione il livello di significatività statistica è posto a  $p=0,05$ .

Se:

- $p > 0,05$  statisticamente non significativo
- $p < 0,05$  statisticamente significativo

Un'ulteriore analisi dei dati è stata fatta tramite la creazione di opportuni grafici a Box-Plot.

Il Box-Plot o diagramma a scatola a baffi è una rappresentazione grafica utilizzata per descrivere la distribuzione di un campione di dati. Consente inoltre di visualizzare alcuni indicatori utili per un'analisi statistica:

- La linea centrale nella scatola rappresenta la mediana dei dati, una metà dei dati si troverà sopra mentre l'altra metà si troverà sotto.
- Il lato inferiore e quello superiore del box mostrano rispettivamente il 25° e il 75° percentile.
- Le linee che si estendono dalla scatola indicano il valore massimo e minimo della raccolta dati.

I risultati della nostra ulteriore analisi vengono dettagliati nei capitoli riportati di seguito.

### **6.8.1 CONFRONTO H/CL IN IMMAGINI PLANARI STATICHE vs PERUGINI SCORE**

In figura 16 è mostrato il Box-Plot relativo ai dati delle immagini Statiche Planari dividendoli in negativi (Perugini Score 0-1) e positivi (Perugini Score 2-3). I due gruppi di pazienti presentano valori di H/CL ben differenziati (Tab 10). Il valore medio di H/CL nel primo gruppo risulta 1.02 contro 2.51 del secondo.

Anche il p-value < 0.001, conferma una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi. Ciò significa che il parametro semi-quantitativo fornisce la stessa suddivisione tra negativi e positivi fornita dal punteggio visivo di Perugini.

<b>Confronto H/CL in immagini planari statiche vs Perugini score</b>		
	<b>campione 1 (Perugini score 0 e 1)</b>	<b>campione 2 (Perugini score 2 e 3)</b>
<b>N° esami confrontati</b>	8	5
<b>Media</b>	1.02	2.51
<b>Standard deviation</b>	0.08	0,85
<b>Intervallo di confidenza al 95% per la media</b>	0.95 - 1.09	1.45 - 3.56
<b>Esito T-test</b>	<b>p &lt; 0.001</b>	

Tab. 10: Analisi statistica Statiche Planari vs Perugini score.

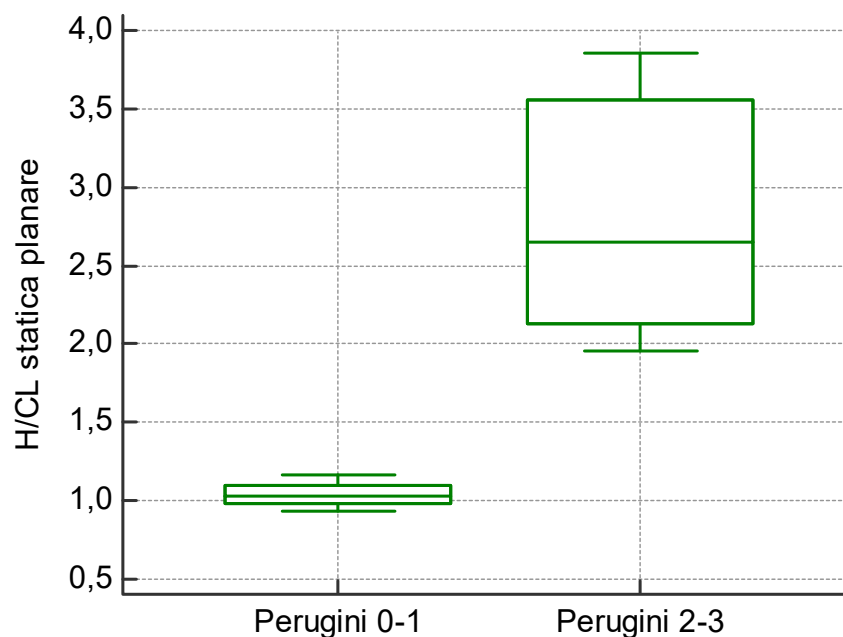


Figura 16: Box-Plot relativo ai dati delle immagini Statiche Planari, permette la visualizzazione della distribuzione dei dati dividendoli in negativi (Perugini Score 0-1) e positivi (Perugini Score 2-3).

## **6.8.2 CONFRONTO H/CL IN IMMAGINI TOTAL BODY vs PERUGINI SCORE**

Analogo confronto è stato eseguito tra il dato semi-quantitativo del Total-body e lo score visivo, con i risultati mostrati in tabella 11. Anche qui il p-value è  $< 0.001$  e i due box-plot sono ben distinti.

<b>Confronto H/CL in Total-body statiche vs Perugini score</b>		
	campione 1 (Perugini score 0 e 1)	campione 2 (Perugini score 2 e 3)
N° esami confrontati	10	10
Media	1.09	2.20
Standard deviation	0.11	0.61
Intervallo di confidenza al 95% per la media	1.01 - 1.17	1.76 - 2.63
Esito T-test	$p < 0.001$	

Tab. 11: Analisi statistica Statiche Total Body vs Perugini score.

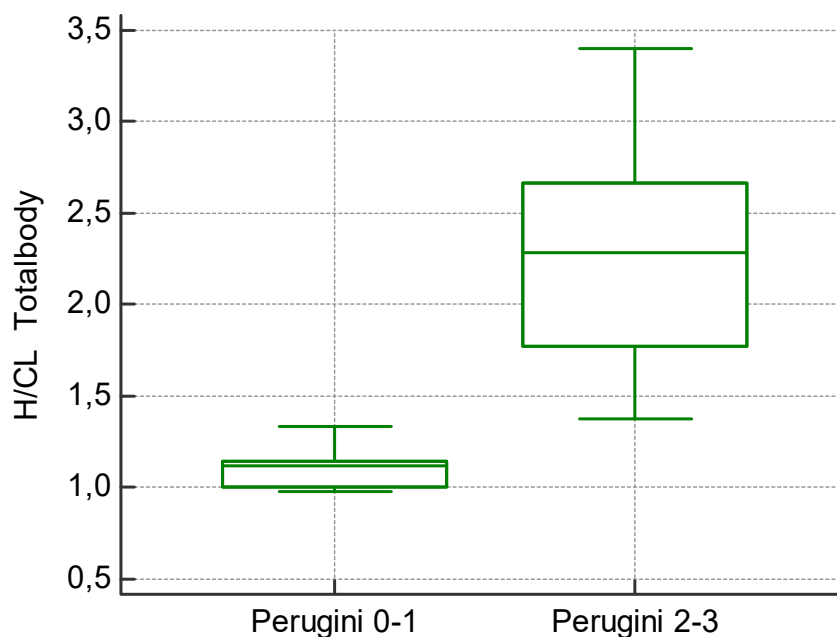


Figura 17: Box-Plot relativo ai dati delle immagini Total Body, permette la visualizzazione della distribuzione dei dati dividendoli in negativi (Perugini Score 0-1) e positivi (Perugini Score 2-3).

### 6.8.3 CONFRONTO H/CL IN IMMAGINI SPECT/TC vs PERUGINI SCORE

Anche nel confronto tra il dato semi-quantitativo dell'acquisizione tomografica SPECT/TC e lo score visivo, il p-value risulta  $< 0.001$  e i due box-plot sono ben distinti. (Tab 12, Fig. 18)

Confronto H/CL in SPECT/TC vs Perugini score		
	campione 1 (Perugini score 0 e 1)	campione 2 (Perugini score 2 e 3)
N° esami confrontati	7	8
Media	0.65	3.69
Standard deviation	0.24	1.36
Intervallo di confidenza al 95% per la media	0.43 - 0.87	2.55 - 4.83
Esito T-test	$p < 0.001$	

Tab. 12: Analisi statistica SPECT/TC vs Perugini score.

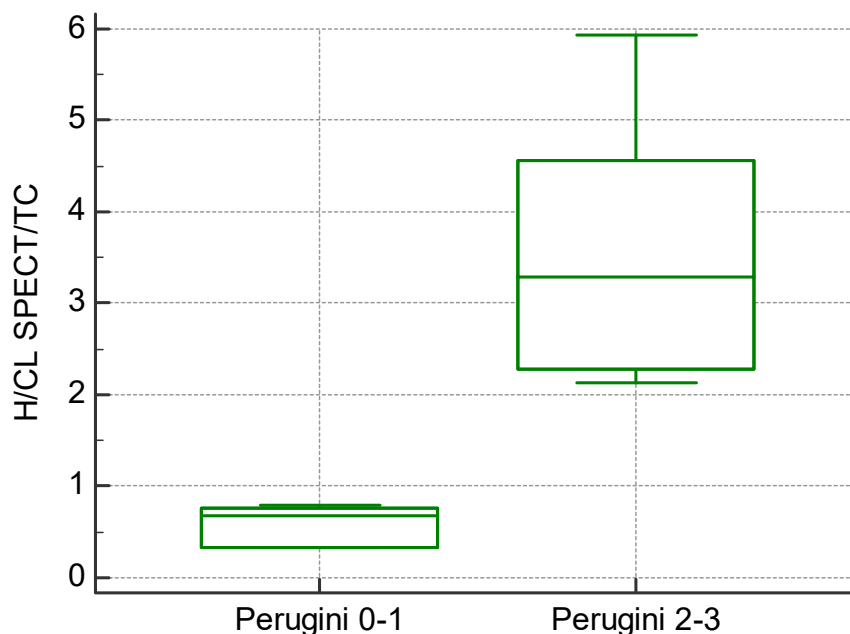


Figura 18: Box-Plot relativo ai dati delle immagini SPECT/TC, permette la visualizzazione della distribuzione dei dati dividendoli in negativi (Perugini Score 0-1) e positivi (Perugini Score 2-3).

Per quanto riguarda il valore soglia dell'indice capace di distinguere un esame negativo da uno positivo abbiamo considerato quanto riportato negli studi sperimentali pubblicati riscontrando una variabilità dell'indice da 1.28 (Galat et al , Abulizi et al), 1.46 (per Gallini et al) fino al un valore di 1.5 (Bokhari et al). [12].

Dall'analisi statistica effettuata nei nostri dati abbiamo evidenziato come il valore soglia capace di meglio discriminare pazienti positivi e pazienti negativi era pari a 1.4 per tutti i tipi di immagini utilizzati.

## 7 DISCUSSIONE

Nel nostro lavoro abbiamo rilevato come la semplice valutazione visiva e la valutazione semiquantitativa calcolata con indice H/CL in diversi tipi di immagine permettesse di distinguere adeguatamente i pazienti positivi con sospetta amiloidosi miocardica dai pazienti negativi nei quali poteva essere esclusa una condizione di amiloidosi miocardica trastiretina-correlata.

Per valutare la concordanza tra gli score di Perugini e l'indice H/CL abbiamo dapprima calcolato l'indice di correlazione ( $R^2$ ) delle diverse coppie di dati analizzati. Tale indice permette di quantificare la forza della relazione tra due variabili X e Y e di capire quanto i valori ottenuti dal campionamento dei dati si discostino dalla ipotetica retta di regressione.

Dalle nostre analisi possiamo affermare:

- per il grafico 'Planare vs Total Body' (Figura 13), esiste un'ottima correlazione poiché  $R^2=0,9796$  è superiore a 0.8. Questo significa che tra le due variabili c'è una stretta correlazione.
- Per il grafico 'Planare vs SPECT/TC' (Figura 14), esiste una buona correlazione poiché  $R^2=0,7691$  è compreso tra 0.5 e 0.8.
- Per il grafico 'Total Body vs SPECT/TC' (Figura 15), esiste una discreta correlazione poiché  $R^2=0,5472$  è compreso tra 0.5 e 0.8.

Quindi, dai nostri dati emerge come esista una significativa correlazione tra gli score visivi e gli indici semiquantitativi calcolati nelle diverse immagini; la significatività è maggiore se si confrontano i risultati ottenuti sulle immagini Statiche Planari rispetto a quelli ottenuti sulle immagini Total Body e SPECT/TC, anche se la correlazione è lievemente inferiore sulle immagini SPECT/TC ( $R^2=0,7691$  vs  $R^2=0,9796$ ).

La correlazione è leggermente peggiore se si confrontano gli indici H/CL ottenuti sulle immagini Total Body rispetto a quelli ottenuti sulle immagini SPECT/TC ( $R^2 = 0.5472$ ). Questo ci porta ad affermare come l'utilizzo delle immagini Total Body renda il metodo semiquantitativo meno preciso per discriminare i pazienti positivi da quelli negativi.



La variabilità degli indici H/CL calcolati tra immagini planari ed immagini Total Body tuttavia risulta piccola (variabilità da -12% a +5%).

La seconda valutazione statistica eseguita con il T-test (p-Value) e la rappresentazione con Box-Plot ci ha permesso di valutare come gli indici H/CL calcolati nelle diverse immagini permettessero di differenziare tra pazienti positivi e pazienti negativi ( $p < 0.001$  per tutti i gruppi considerati, con diverso valore dell'intervallo di confidenza al 95% per la media per i diversi gruppi considerati) come lo score visivo di Perugini.

La metodica semiquantitativa migliore nel separare i positivi dai negativi è risultata quella che utilizzava le immagini SPECT/TC. Infatti se si analizza il box-plot riportato in Fig. 18, osserviamo come la classe dei negativi sia rappresentata in un intervallo ristretto mentre la classe dei positivi in un intervallo ampio (Intervallo di confidenza al 95% per la media: per i negativi di 0.43 - 0.87 e nei positivi di 2.55 - 4.83).

L'intervallo che separa i due Box, che coincidono con i relativi "baffi", è particolarmente ampio e maggiore rispetto all'intervallo che separa le due classi riportate nel grafico in Fig. 16 relativo al rapporto H/CL ottenuto nella statica planare.

Infatti, già nel grafico Box-Plot di Fig. 16, che mette in relazione lo score di Perugini con i valori H/CL Statica Planare si dimostra la netta differenziazione tra positivi e negativi, poiché si evidenzia come tra i pazienti negativi (Perugini 0-1) e i pazienti positivi (Perugini 2-3) vi sia un grande intervallo che separa i "baffi" dei box che rappresentano le due popolazioni.

Nel box-plot di Fig. 16 possiamo notare come tutti i dati della classe dei negativi siano più o meno nello stesso intervallo, mentre la classe dei positivi occupi un intervallo più ampio (Intervallo di confidenza al 95% per la media: per i negativi di 0.95 - 1.09 e nei positivi di 1.45 - 3.56).

La metodica peggiore ha invece riguardato i dati che hanno utilizzato le immagini Total Body. Infatti, nel grafico Box-Plot in Fig. 17 possiamo notare come l'intervallo contenente i dati della classe negativa sia sempre ristretto mentre quello

della classe positiva sia sempre abbastanza ampio, ma in entrambi i casi piu' ristretto rispetto alle classi precedenti (Intervallo di confidenza al 95% per la media: per i negativi di 1.01 - 1.17 e nei positivi di 1.76 - 2.63); questo ci porta ad affermare che la separazione tra i due box è netta mentre la separazione tra i baffi è minima. Forse l'utilizzo di delle immagini Total Body potrebbero portare a incertezze nella diagnosi.

Dalle nostre analisi emerge quindi che la scelta della soglia dell'indice H/CL può essere critica nel differenziare tra pazienti positivi e negativi, vista l'esistenza in letteratura di una discreta variabilità di tale valore (da 1.28 a 1.5).

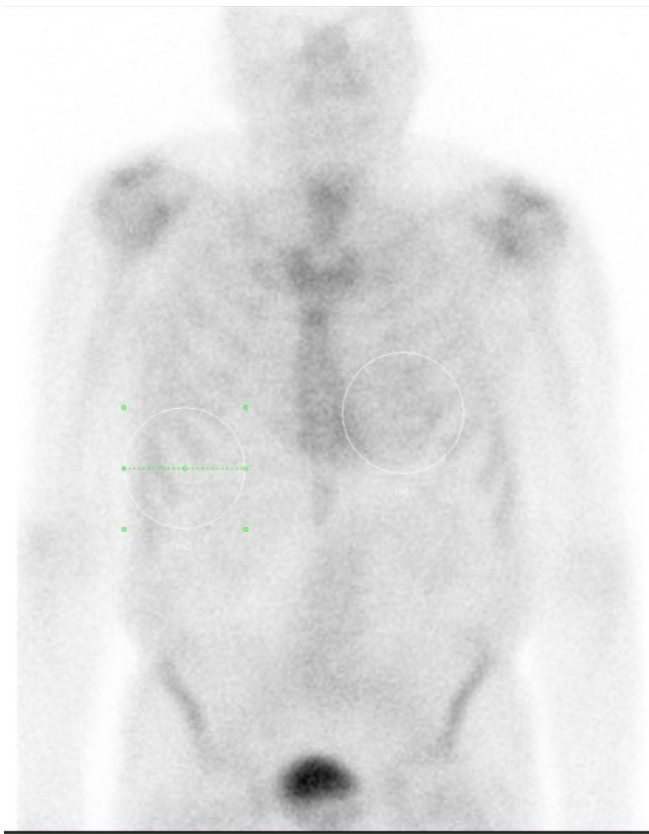
Dall'analisi statistica dei dati ottenuti in tutte le immagini abbiamo ricavato il valore soglia dell'indice H/CL pari a 1.4 come valore di cut-off capace di discriminare nella maggior parte dei casi i pazienti positivi dai negativi.

Tuttavia utilizzando tale soglia, abbiamo riscontrato un falso negativo nel campione che utilizza le immagini Total Body, poiché il paziente 14 (positivo) aveva un rapporto H/CL Total Body pari a 1.38.

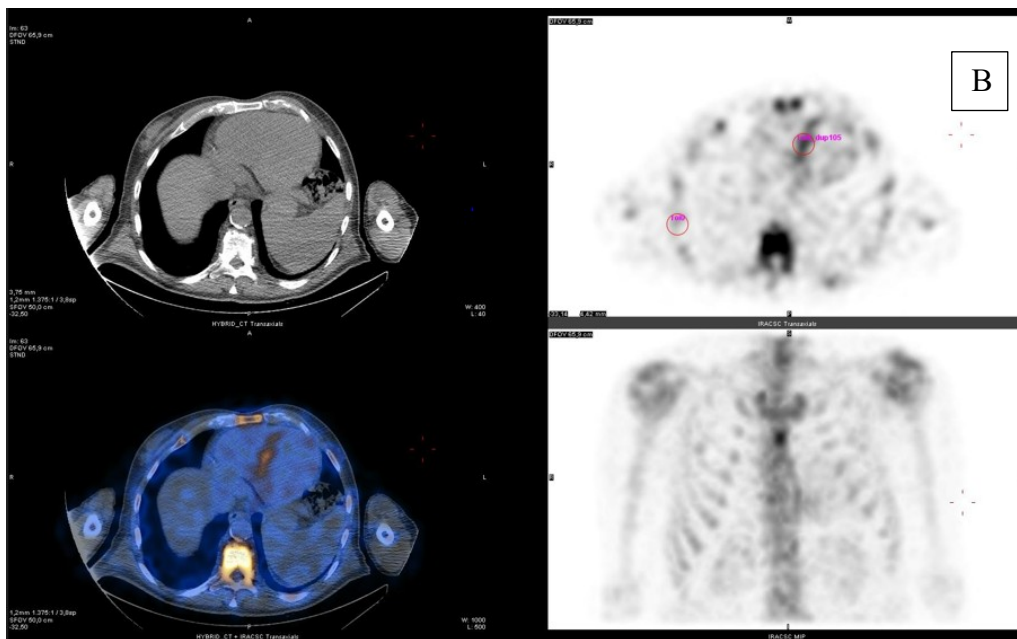
Se avessimo scelto come soglia  $H/CL = 1.37$  per tutte le tre modalità di acquisizione utilizzate (Planare Statica, Total-Body, tomografica SPECT/TC), considerando lo score visivo di Perugini come Gold-standard, l'accordo sarebbe stato totale, e sia la sensibilità che la specificità della valutazione semi-quantitativa del campione considerato risulterebbe pari al 100% (0 falsi positivi, 0 falsi negativi).

Essendo comunque la soglia un indicatore statistico, non una verità assoluta, porta con sé un'incertezza; quindi, possiamo tenere come valida la soglia a 1.4 a patto che l'esame venga sempre integrato con SPECT/TC.

Un esempio della rilevanza che l'utilizzo di SPECT/TC ha nel discriminare i pazienti positivi da quelli negativi è evidenziato nel caso 14, che alla valutazione visiva risultava dubbio e presentava un'indice di captazione H/CL ottenuto nelle immagini Total Body pari a 1.38.



*Figura 19: Immagine Total Body planare del paziente n° 14, nella quale non è chiaramente identificabile una captazione nell'area cardiaca; alla luce dell'elaborazione SPECT/TC si può intravedere come il punto captante si ponga dietro/lateralmente allo sterno.*



*Figura 20: Immagine tras-assiale del torace del paziente n° 14 : nel riquadro "B" si evidenzia la presenza di captazione a livello del setto interventricolare, non chiaramente identificabile nell'immagine Statica Planare del torace riportata sopra in Fig 19.*

Tuttavia dall'analisi delle immagini SPECT/TC abbiamo osservato come a livello del setto interventricolare vi fosse una lieve captazione, che nell'immagine Total Body era mascherata dallo sterno.

In questo paziente utilizzando il metodo semiquantitativo sulle immagini SPECT/CT abbiamo riscontrato un indice H/CL pari a 2.14 (invece del valore di 1.38 ottenuto nelle immagini planari). Il valore di cutt-off ricavato dalle immagini SPECT/TC del paziente 14 dimostrava la positività dell'esame e quindi la maggior accuratezza del metodo semiquantitativo basato su immagini SPECT/CT.

Alla luce di questo esempio, considerando lo score visivo di Perugini come Gold-standard, la scelta di un valore soglia più basso (esempio soglia H/CL = 1.37 per tutte le tre modalità di acquisizione), l'accordo sarebbe stato totale, e sia la sensibilità che la specificità della valutazione semi-quantitativa del campione considerato sarebbe risultata pari al 100% (0 falsi positivi, 0 falsi negativi).

Tuttavia va considerato che essendo la soglia un indicatore statistico, non una verità assoluta, porta con sé un'incertezza; quindi, possiamo tenere come valida la soglia a 1.4 a patto che l'esame venga sempre integrato con SPECT/TC.

## 8 CONCLUSIONI

Dallo studio condotto in questa tesi si dimostra la concordanza tra valutazione visiva eseguita con score di Perugini (gold standard) e valutazione semiquantitativa eseguita tramite la determinazione dell'indice H/CL in tipi di immagini diverse (statica planare, tb, spect/tc), nell'individuare i pazienti con amiloidosi cardiaca ATTR differenziando i pazienti positivi dai pazienti negativi.

La valutazione eseguita sulle immagini Statiche Planari, ed ancor piu' sulle immagini SPECT/TC, è quella che ha dimostrato una maggior accuratezza diagnostica. Infatti in tali immagini l'intervallo fra le due classi (positiva e negativa) è più ampio permettendo di distinguere meglio i positivi dai negativi, mentre nelle immagini Total Body la distinzione si è dimostrata meno netta esponendo potenzialmente ad una falsa diagnosi.

La soglia di cutt-off ricavata e proposta dalle nostre analisi pari a 1.4, ha permesso di distinguere i positivi dai negativi per tutte le metodiche di imaging in quasi tutti i pazienti analizzati.

Con la soglia scelta nel nostro studio il mancato utilizzo della SPECT/CT può esporre in alcuni casi alla sottodiagnosi, soprattutto quando la captazione riguarda parti del cuore che si sovrappongono alla captazione di strutture ossee come avviene nell'immaging 2D (esempio setto intervertricolare e sterno).

L'esecuzione della scansione SPECT/CT garantisce, inoltre, la corretta attribuzione di captazioni aspecifiche relative al pool sanguigno, erroneamente attribuite al miocardio nelle immagini Total Body e che potrebbero portare ad una diagnosi errata.

## 9 BIBLIOGRAFIA

- [1] Emdin, M., Vergaro, G., & Passino, C. (2020). *Amiloidosi cardiaca: Come si diagnostica, Come Si Cura*. Pisa University Press.
- [2] Costache, I. I., Buburuz, A. M., Crisu, D., Statescu, A. M., Ungureanu, C., & Aursulesei, V. (2019). The role of echocardiography and <sup>99m</sup>Tc-HDP scintigraphy in non-invasive diagnosis of cardiac amyloidosis. *Medicine*, 98(38).
- [3] Garcia-Pavia, P., Rapezzi, C., Adler, Y., Arad, M., Basso, C., Brucato, A., Burazor, I., Caforio, A. L., Damy, T., Eriksson, U., Fontana, M., Gillmore, J. D., Gonzalez-Lopez, E., Grogan, M., Heymans, S., Imazio, M., Kindermann, I., Kristen, A. V., Maurer, M. S., ... Linhart, A. (2021). Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis: A position statement of the ESC Working Group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal*, 42(16), 1554–1568.
- [4] Pilebro, B., Suhr, O. B., Näslund, U., Westermark, P., Lindqvist, P., & Sundström, T. (2016). <sup>99m</sup>Tc-DPD uptake reflects amyloid fibril composition in hereditary transthyretin amyloidosis. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 121(1), 17–24.
- [5] Perugini E;Guidalotti PL;Salvi F;Cooke RM;Pettinato C;Riva L;Leone O;Farsad M;Ciliberti P;Bacchi-Reggiani L;Fallani F;Branzi A;Rapezzi C; (n.d.). *Noninvasive etiologic diagnosis of cardiac amyloidosis using <sup>99m</sup>Tc-3,3-diphosphono-1,2-propanodicarboxylic acid scintigraphy*. Journal of the American College of Cardiology.
- [6] Volterrani, D., Mariani, G., & Erba, P. A. (2010). *Fondamenti di medicina nucleare: Tecniche e Applicazioni*. Springer-Verlag Milan.
- [7] Andrikopoulou, E., & Bhambhani, P. (2017). Nuclear imaging of cardiac amyloidosis. *Journal of Nuclear Cardiology*, 26(2), 505–508.

- [8] Dorbala, S., Ando, Y., Bokhari, S., Dispenzieri, A., Falk, R. H., Ferrari, V. A., Fontana, M., Gheysens, O., Gillmore, J. D., Glaudemans, A. W., Hanna, M. A., Hazenberg, B. P., Kristen, A. V., Kwong, R. Y., Maurer, M. S., Merlini, G., Miller, E. J., Moon, J. C., Murthy, V. L., ... Bourque, J. M. (2021). ASNC/AHA/ase/EANM/HFSA/ISA/SCMR/SNMMI expert consensus recommendations for multimodality imaging in cardiac amyloidosis: Part 1 of 2—evidence base and standardized methods of imaging. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 14(7).
- [9] Singh, V., Falk, R., Di Carli, M. F., Kijewski, M., Rapezzi, C., & Dorbala, S. (2019, February). *State-of-the-art radionuclide imaging in cardiac transthyretin amyloidosis*. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*.
- [10] Gallini C;Tutino F;Martone R;Ciaccio A;Costanzo EN;Taborchi G;Morini S;Bartolini S;Farsetti S;Di Mario C;Perfetto F;Cappelli F; (n.d.). *Semi-quantitative indices of cardiac uptake in patients with suspected cardiac amyloidosis undergoing 99mTc-HMDP scintigraphy*. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*.
- [11] American Society of Nuclear Cardiology (2019) ASNC AND EANM Cardiac Amyloidosis Practice Points - 99mTechnetium3,3-diphosphono1,2-propanodicarboxylic acid (DPD) and 99mTechnetium hydroxymethylene diphosphate (HMDP) Imaging for Transthyretin Cardiac Amyloidosis.
- [12] Mattana F, Muraglia L, Girardi F, Cerio I, Porcari A, Dore F, Bonfiglioli R, Fanti S. Applicazione clinica della scintigrafia cardiaca con traccianti ossei: controversie e insidie nell'amiloidosi cardiaca. *Nave Plus* 2022; 6:13.
- [13] Castano A, Haq M, Narotsky DL, Goldsmith J, Weinberg RL, Morgenstern R, Pozniakoff T, Ruberg FL, Miller EJ, Berk JL, Dispenzieri A, Grogan M, Johnson G, Bokhari S, Maurer MS. Multicenter Study of Planar Technetium 99m Pyrophosphate Cardiac Imaging: Predicting Survival for Patients With ATTR Cardiac Amyloidosis. *JAMA Cardiol*. 2016 Nov 1;1(8):880-889. doi: 10.1001/jamacardio.2016.2839. PMID: 27557400

- [14] Minutoli F, Di Bella G, Mazzeo A, Laudicella R, Gentile L, Russo M, Vita G, Baldari S. Serial scanning with <sup>99m</sup>Tc-3, 3-diphosphono-1, 2-propanodicarboxylic acid (<sup>99m</sup>Tc-DPD) for early detection of cardiac amyloid deposition and prediction of clinical worsening in subjects carrying a transthyretin gene mutation. *J Nucl Cardiol*. 2021 Oct;28(5):1949-1957. doi: 10.1007/s12350-019-01950-2. Epub 2019 Nov 18. PMID: 31741327.
- [15] Kula RW, Engel WK, Line BR. Scanning for soft-tissue amyloid. *Lancet*. 1977 Jan 8;1(8002):92-3. doi: 10.1016/s0140-6736(77)91102-3. PMID: 63730.
- [16] Cappelli F, Gallini C, Perfetto F. PYP or DPD and HDP for cardiac amyloidosis one for all, all for one. *J Nucl Cardiol*. 2020 Jun;27(3):1041-1042. doi: 10.1007/s12350-019-01728-6. Epub 2019 May 1. PMID: 31044407.
- [17] Tahara N, Lairez O, Endo J, Okada A, Ueda M, Ishii T, Kitano Y, Lee HE, Russo E, Kubo T. <sup>99m</sup>Tc-pyrophosphate scintigraphy: a practical guide for early diagnosis of transthyretin amyloid cardiomyopathy. *ESC Heart Fail*. 2022 Feb;9(1):251-262. doi: 10.1002/ehf2.13693. Epub 2021 Nov 29. Erratum in: *ESC Heart Fail*. 2022 Aug;9(4):2764-2765. PMID: 34841715; PMCID: PMC8788016.
- [18] Van den Wyngaert, T., Strobel, K., Kampen, W. U., Kuwert, T., van der Bruggen, W., Mohan, H. K., Gnanasegaran, G., Delgado-Bolton, R., Weber, W. A., Beheshti, M., Langsteger, W., Giammarile, F., Mottaghy, F. M., & Paycha, F. (2016). The EANM practice guidelines for Bone Scintigraphy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 43(9), 1723–1738.