

1222·2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica (DSCTV)

Direttore: Ch.mo Prof. Federico Rea

TESI DI LAUREA

AMILOIDOSI CARDIACA: VALUTAZIONE PROGNOSTICA CLINICO-BIOUMORALE CON TROPONINA I AD ALTA SENSIBILITA'

RELATORE: Ch.mo Prof. Domenico Corrado

CORRELATORE: Dott. Alberto Cipriani

Dott.ssa Laura De Michieli

LAUREANDO: Alessandro Lupi

Mat. N° 1139512

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Riassunto.....	1
Abstract	3
Capitolo 1: Introduzione	5
1.1 Breve storia dell'Amiloidosi.....	5
1.2 Plasticità proteica e biochimica strutturale dell'amiloide	9
1.3 Classificazione.....	11
1.4 Deposizione dell'Amiloide	14
1.5 Epidemiologia dell'Amiloidosi	16
1.6 Manifestazioni cliniche dell'amiloidosi sistemica	19
1.7 Amiloidosi cardiaca	21
1.8 Meccanismi di disfunzione cardiaca.....	23
1.9 Diagnosi di amiloidosi cardiaca.....	26
1.9.1 Diagnostica di laboratorio di base	26
1.9.1.2 Troponina I ad alta sensibilità	28
1.9.2 Elettrocardiografia	29
1.9.3 Ecocardiografia.....	31
1.9.4 Risonanza magnetica cardiaca (RMC)	33
1.9.5 Scintigrafia ossea con radionuclidi	37
1.9.6 Tomografia a emissione di positroni (PET).....	40
1.10 Percorso diagnostico	42
1.11 Prognosi dell'Amiloidosi Cardiaca	47
1.12 Terapia dell'amiloidosi cardiaca.....	49
1.12.1 Terapie di supporto e delle complicazioni	49
1.12.2 Terapie specifiche per amiloidosi cardiaca da transtiretina	56
1.12.3 Terapie specifiche per amiloidosi cardiaca da catene leggere	65
1.12.3.6 <i>Agenti diretti contro le fibrille di amiloide AL</i>	73
Capitolo 2: Scopo dello studio	77
Capitolo 3: Materiali e metodi	78
3.1 Popolazione dello studio	78
3.2 Raccolta dati.....	79
3.3 Analisi statistica	87
Capitolo 4: Risultati	89
4.1 Caratteristiche della popolazione	89

4.1.1 Caratteristiche demografiche della popolazione	89
.....	91
4.1.2 Caratteristiche relative alla modalità di diagnosi	92
4.1.3 Caratteristiche relative alle comorbidità	93
4.1.4 Caratteristiche relative agli indici antropometrici	96
4.2 Caratteristiche elettrocardiografiche	97
4.3 Caratteristiche ecocardiografiche	99
4.4 Caratteristiche laboratoristiche	102
4.5 Follow up ed outcomes	104
4.6 Caratteristiche associate a maggiore frequenza di decesso.....	105
4.6.1 Caratteristiche associate a maggiore frequenza di decesso (AL-AC)	105
4.6.2 Caratteristiche associate a maggiore frequenza di decesso (ATTR-AC).....	108
4.7 hs-cTnI nella stratificazione del rischio dell'AL-AC	110
4.8 hs-cTnI nella stratificazione del rischio dell'ATTR-AC	116
Capitolo 5: Discussione	121
5.1.1 Caratteristiche demografiche della popolazione.....	121
5.1.2 Modalità di diagnosi della popolazione	123
5.1.3 Comorbidità della popolazione	124
5.2 Caratteristiche elettrocardiografiche	125
5.3 Caratteristiche ecocardiografiche	127
5.4 Caratteristiche laboratoristiche	129
5.5 Follow up ed outcomes	131
5.6 Caratteristiche cliniche associate a maggior rischio di decesso	131
5.7 Ruolo della Troponina I nella stratificazione del rischio per l'Amiloidosi Cardiaca	133
5.8 Limiti dello studio	137
Capitolo 6: Conclusione	138
Bibliografia	139

Riassunto

Introduzione. L'amiloidosi cardiaca (AC) è una malattia infiltrativa correlata al deposito di fibrille amiloidi nella matrice extracellulare. Le due principali forme di AC sono l'amiloidosi cardiaca da catene leggere (AL) e l'amiloidosi da transtiretina (ATTR), nella forma ereditaria (ATTRv) o wild-type (ATTRwt). La prognosi della patologia è correlata alla gravità del coinvolgimento cardiaco e troponina cardiaca (cTn) e peptidi natriuretici si sono rivelati potenti biomarcatori prognostici. I sistemi di stadiazione prognostica sono basati ed altresì validati con riferimento a cutoff della troponina cardiaca T ad alta sensibilità (hs-cTn T). Non esistono cutoff convalidati per troponina cardiaca I ad alta sensibilità (hs-cTn I).

Scopo dello studio. L'obiettivo di questo studio è stato di analizzare il significato clinico di hs-cTnI alla diagnosi di AC come possibile marcatore prognostico per outcome di mortalità. Si è voluto inoltre indagare le caratteristiche della popolazione studiata e se esistono ulteriori predittori efficaci di outcome sfavorevole.

Materiali e metodi. Studio osservazionale retrospettivo in cui sono stati inclusi pazienti con AL-AC e ATTR-AC, valutati presso l'Ambulatorio Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedale-Università di Padova a partire dal 2019. È stata anche inclusa una coorte più piccola di pazienti con AL-AC (n=19) trattati presso la Clinica Ematologica dello stesso istituto prima del 2019. Si sono raccolte caratteristiche cliniche e valori di laboratorio; tutte le variabili sono state raccolte alla diagnosi o alla visita più vicina. I livelli di hs-cTnI sono stati misurati utilizzando il test Abbott Architect Stat High Sensitive Troponina I. L'outcome principale era la mortalità per tutte le cause.

Risultati. Sono stati inclusi 169 pazienti, 70 (41%) con AL-AC e 99 (59%) con ATTR-AC; tra questi, 11 (11%) presentava ATTRv-AC. Per i pazienti con AL-AC, l'età mediana alla diagnosi era di 70 anni (IQR 60, 76), 45 (64%) erano i maschi. La diagnosi è stata ottenuta con biopsia endomiocardica in 14 (20%) pazienti, con biopsia del grasso periombelicale in 37 (53%) e/o biopsia di altri tessuti in 25 (36%). Per i pazienti con ATTR-AC, l'età mediana alla diagnosi era di 78 anni (72, 82), 92

(93%) maschi. La maggior parte dei pazienti (89, 90%) è stata sottoposta a scintigrafia ossea. I valori mediani di hs-cTnI alla diagnosi erano 87 (41, 178) ng/L per AL-AC e 71 (42, 150) ng/L per ATTR-AC ($p=0,51$). Utilizzando il modello Mayo 2012 per la stratificazione del rischio, 9 (13%) pazienti erano allo stadio 1, 16 (23%) allo stadio 2, 22 (31%) allo stadio 3 e 22 (31%) allo stadio 4. Per ATTR-AC, utilizzando il modello Mayo per la stratificazione del rischio in coloro in cui i biomarcatori disponibili alla diagnosi ($n=64$), 24 (38%) erano allo stadio 1, 14 (22%) allo stadio 2 e 26 (41%) allo stadio 3. Il follow-up mediano è stato di 21 (5, 45) mesi per AL-AC e 12 (5, 28) per ATTR-AC; 26 (37%) pazienti AL-AC e 12 (12%) pazienti ATTR-AC sono deceduti. Nella AL-AC, con l'analisi della curva ROC, il cut-off ottimale per la stratificazione del rischio è risultato 95 ng/L [area sotto la curva (AUC) 0.70, 95% intervallo di confidenza (CI) 0.57-0.83, log rank $p<0.001$ per l'analisi di sopravvivenza con metodo di Kaplan Meier (KM)]. Un valore di hs-cTnI >95 ng/L era associato a un aumentato rischio di morte (HR 5,3, IC 95% 2,1-14, $p<0,001$) e rimaneva un predittore indipendente di mortalità anche se aggiustato per età, classe NYHA alla diagnosi e LV frazione di eiezione (in modelli separati). Nella ATTR-AC, con l'analisi della curva ROC, il cut-off ottimale per la stratificazione del rischio è risultato pari a 70 ng/L (AUC 0.80, 95% CI 0.66-0.94, log rank $p=0.025$ all'analisi di KM). Quando integrato nei sistemi già validati di stadiazione AL-AC (modello Mayo 2004 e modello Mayo 2012), hs-cTnI >95 ng/L era in grado di differenziare significativamente i pazienti a rischio basso e intermedio da quelli ad alto rischio di morte durante il follow-up. Allo stesso modo, hs-cTnI >70 ng/L, integrato nel modello Mayo per ATTR-AC, era in grado di differenziare i pazienti a basso rischio di morte da quelli ad alto rischio.

Conclusioni. Nella presente coorte di pazienti affetti da AL-AC e ATTR-AC, un valore di hs-cTnI superiore a 95 ng/L e 70 ng/L, rispettivamente, si è associato ad una sopravvivenza significativamente peggiore durante il follow-up. Nei pazienti con AL-AC, quando integrato nei modelli convalidati al posto di hs-cTnT, hs-cTnI è stata in grado di differenziare i pazienti a rischio basso e intermedio da quelli ad alto rischio di esito avverso. In ATTR-AC, hs-cTnI ha permesso di differenziare i pazienti a basso rischio da quelli ad alto rischio di morte. Sono necessari studi con una dimensione del campione più ampia per studiare il ruolo di hs-cTnI nei pazienti a rischio intermedio in entrambe le forme di AC.

Abstract

Introduction. Cardiac amyloidosis (CA) is an infiltrative disease related to the deposition of amyloid fibrils in the extracellular matrix. The two main forms of CA are cardiac light chain amyloidosis (AL) and transthyretin amyloidosis (ATTR), either hereditary (ATTRv) or wild-type (ATTRwt). The prognosis of the disease correlates with the severity of cardiac involvement; cardiac troponin (cTn) and natriuretic peptides have been shown to be powerful prognostic biomarkers. Nevertheless, prognostic staging systems are based and also validated with reference to high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTn T) cutoffs. There are no validated cutoffs for high-sensitivity cardiac troponin I (hs-cTn I).

Purpose of the study. The aim of this study was to analyse the clinical significance of hs-cTnI at the diagnosis of CA as a possible prognostic marker for mortality. Second, it aimed to investigate the characteristics of the study population and whether there are additional effective determinants of adverse outcome.

Material and Methods. Retrospective observational study in which patients with CA, both AL-CA and ATTR-CA, evaluated in the Cardiac Amyloidosis Outpatient Clinic of Padua University Hospital from 2019 to the present were included. A smaller cohort of patients with AL-CA (n=19) treated in the Hematology Clinic of the same institutio before 2019 was also included. Clinical characteristics and laboratory values were collected; all variables were collected at diagnosis or at the nearest visit. Levels of hs-cTnI were measured using the Abbott Architect Stat High Sensitive Troponin I test. Principal outcome was all-cause mortality.

Results. A total of 169 patients were included in the analysis, 70 (41%) with AL-CA and 99 (59%) with ATTR-CA; among the latter, 11 (11%) had ATTRv-CA. For patients with AL-CA, the median age at diagnosis was 70 years (IQR 60, 76), 45 (64%) were males. Diagnosis was obtained by endomyocardial biopsy in 14 (20%) patients, periumbilical fat biopsy in 37 (53%) and/or biopsy of other tissues in 25 (36%). For patients with ATTR-CA, the median age at diagnosis was 78 years (72, 82), 92 (93%) were males. Most patients (89, 90%) underwent bone scintigraphy. The median

hs-cTnI values at diagnosis were 87 (41, 178) ng/L for AL-CA and 71 (42, 150) ng/L for ATTR-CA ($p=0.51$). Using the 2012 Mayo model for risk stratification, 9 (13%) patients were stage 1, 16 (23%) stage 2, 22 (31%) stage 3 and 22 (31%) stage 4. For ATTR-CA, using the Mayo model for risk stratification in those in whom biomarkers were available at diagnosis ($n=64$), 24 (38%) were at stage 1, 14 (22%) at stage 2 and 26 (41%) at stage 3. The median follow-up was 21 (5, 45) months for AL-CA and 12 (5, 28) for ATTR-CA; 26 (37%) AL-CA patients and 12 (12%) ATTR-CA patients died. In AL-CA, with ROC curve analysis, the optimal cut-off for risk stratification was 95 ng/L [area under the curve (AUC) 0.70, 95% confidence interval (CI) 0.57-0.83, log rank $p<0.001$ for Kaplan Meier (KM) analysis cut-off for survival]. An hs-cTnI value >95 ng/L was associated with an increased risk of death (HR 5.3, 95% CI 2.1-14, $p<0.001$) and remained an independent predictor of mortality even when adjusted for age, NYHA class at diagnosis, and LV ejection fraction (in separate models). In ATTR-CA, with ROC curve analysis, the optimal cut-off for risk stratification was 70 ng/L (AUC for curve 0.80, 95% CI 0.66-0.94, log rank $p=0.025$ for cut-off at KM analysis). When integrated into the validated AL-CA staging system (Mayo 2004 model and Mayo 2012 model), hs-cTnI with a cut-off of 95 ng/L was able to significantly differentiate patients at low and intermediate risk from those at high risk of death during follow-up. Similarly, hs-cTnI with a cut-off of 70 ng/L integrated into the Mayo model for ATTR-CA was able to differentiate patients at low risk of death from those at high risk.

Conclusions. In the cohort of AL-CA and ATTR-CA patients analyzed, a hs-cTnI value above 95 ng/L and 70 ng/L, respectively, was associated with significantly worse survival. In patients with AL-CA, when integrated into the alternatively validated models of hs-cTnI, hs-cTnI was able to differentiate patients at low and intermediate risk from those at high risk of adverse outcome. In ATTR-CA, hs-cTnI was able to differentiate patients at low risk from those at high risk of death. Studies with a larger sample size are needed to properly investigate the role of hs-cTnI in the intermediate-risk group in both forms of AC.

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Breve storia dell'Amiloidosi

Le amiloidosi sistemiche sono un eterogeneo gruppo di condizioni patologiche aventi come minimo comun denominatore l'accumulo in sede extracellulare di proteine scorrettamente ripiegate, le quali tendono a formare fibrille amiloidi ricche in foglietti β a livello di diversi tessuti. Tra gli organi maggiormente colpiti da questo gruppo di patologie si enumerano il fegato, il rene, l'encefalo ed il cuore.

Per più di 100 anni il lemma "amiloide" è stata utilizzato nella Medicina (umana e non umana) con scarsissime conoscenze meccanicistiche ed eziopatogenetiche. L'unica nozione da tempo nota riguarda il fatto che l'amiloide rappresenta una sostanza extracellulare con caratteristiche variegata, sia per ciò che concerne la sua distribuzione, le sue proprietà e le sue manifestazioni cliniche.

Il termine "amiloide" (derivante dal latino *amilum* e dal greco $\alpha\mu\lambda\omicron\nu$, composto di α privativo e $\mu\lambda\omicron\nu$, mulino, "sostanza bianca estratta dal frumento mediante la macerazione"), è stato per la prima volta introdotto nell'ambito scientifico nel 1838 dal botanico tedesco Matthias Schleiden(1), ma fu Rudolf Virchow (1821-1902), medico e fisiologo tedesco, ad impiegare per primo nel 1854 il termine "amiloide" nell'ambito della fisiopatologia umana. Egli descrisse la sussistenza di strutture dette *corpora amylacea* nel sistema nervosa centrale, che manifestavano caratteristiche simili a quelle dell'amido, quali il peculiare viraggio di colore dal marrone al blu a seguito di reazione con ioduro e acido solforico. Fu Virchow a suggerire che i *corpora amylacea* del sistema nervosa centrale fossero effettivamente carboidrati, e ipotizzò una loro relazione con l'amido. (2)

I rappresentanti della Scuola Francese ed Inglese identificavano invece una maggior similarità dell'amiloide alla cellulosa. Due furono i termini per descrivere le caratteristiche dell'amiloide: "lardaceo" e "ceroso", rispettivamente impiegati dalla Scuola Francese e quella Inglese. In 1859 Schmidt (3) rinnegò questa opzione, descrivendo una considerevole porzione di azoto nei tessuti infiltrati dall'amiloide. Simili risultati furono ottenuti dal chimico tedesco Auguste Kekulé (1829-1896) che nel 1859 ad individuare una significativa proporzione di azoto nei tessuti

umani colpiti da amiloide, rigettando dunque l'ipotesi di una possibile natura glucidica dell'amiloide (4). Egli pertanto postulò che la sostanza amiloide fosse di natura "albuminoide": Virchow contestò queste affermazioni, e continuò a sostenere che risultati attendibili riguardo la reale caratterizzazione biochimica dell'amiloide si avrebbe potuta avere solo una volta avendo sviluppato metodi efficaci per la purificazione di quest'ultima dai tessuti.

Fu quindi nella seconda metà del XIX secolo che si mossero i primi passi per la caratterizzazione di questa sostanza, l'amiloide, che era stata effettivamente osservata in differenti tessuti già dal XVII secolo. Difatti, nel 1639 Nicolaus Fontanus descrisse l'autopsia di un giovane con ascite, ittero ed epistassi, con un voluminoso ascesso al fegato e una milza aumentata in dimensioni, ricca in formazioni biancastre. Questa potrebbe essere stata la prima descrizione dell'amiloidosi splenica.

Nel 1789 Antoine Portal fu il primo a descrivere l'amiloidosi epatica(2).

Il primo vero caso di amiloidosi primaria fu probabilmente riportato nel 1856 da S. Wilks che descrisse un uomo di 52 anni con visceri lardacei non correlati a sifilide, osteomielite, altre malattie ossee o tubercolosi. Il paziente presentava idropisia ed albuminuria; all'autopsia venne ritrovato un cuore ipertrofico, milza di consistenza dura e reni lardacei. Queste osservazioni sono state confermate da Wilkins in altre serie di pazienti. Più tardi Johann Meckel notò che il test dell'acido solforico sodio e iodio produceva un colore rosso o viola in molti organi considerati affetti da degenerazione lardacea: non solo il fegato ma anche l'aorta, le arterie e la parete intestinale. Shwartz in seguito paragonò Virchow ad un Cristoforo Colombo che, cercando l'India, trovò infine l'America(2).

Un punto fondamentale di svolta nella caratterizzazione istologica delle fibrille di amiloide fu l'impiego del Rosso Congo. Questa metodica di colorazione, sviluppata da Paul Böttiger nel 1884 costituisce ancora oggi uno dei fondamenti nella diagnosi istopatologica di amiloidosi: infatti la reattività con il colorante Rosso Congo, detta congofilia, e la conseguente birifrangenza verde mela alla luce polarizzata è stato il primo criterio per l'amiloide introdotto dal medico belga Paul Divry nel 1927(5)(6)(7)(8)(9).

Solo nel 1922 H. Bennhold scoprì la capacità del rosso Congo di legarsi all'amiloide e più tardi, nel 1962, Puchtler descrisse il metodo per l'uso del rosso Congo nelle preparazioni istologiche: i campioni istologici vengono inizialmente fissati in formalina e successivamente inclusi in paraffina(10). Sono poi sezionati in fette spesse 5-8 μm , colorati con rosso Congo e osservati al microscopio ottico in luce polarizzata: come già accennato, qui l'amiloide può essere apprezzata grazie alla spiccata birifrangenza che passa dalle tonalità del rosso ad un caratteristico verde mela. Il legame del rosso Congo all'amiloide induce una modifica caratteristica nell'assorbimento ottico massimo della molecola, passando da 490 nm a 540 nm, tuttavia ad oggi non risulta essere perfettamente compreso il meccanismo mediante il quale ciò avvenga, anche se verosimilmente dipende dalla conformazione secondaria a β foglietto della fibrilla di amiloide, ed altresì dalle interazioni idrofobiche dei centri benzidinici del colorante e dei gruppi amminoacidici terminali della fibrilla, carichi elettrostaticamente (11)(12).

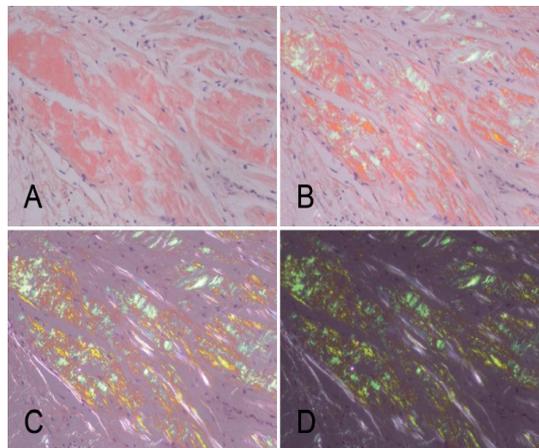


Figura 1: Fibrille di amiloide colorate con Rosso Congo; si può notare, una volta applicata la visualizzazione con microscopio a fluorescenza, il tipico colore "apple green", verde mela. Adattato da Tansken M. "Amyloid"-historical aspects

L'amiloide può essere visualizzata anche utilizzando il microscopio a fluorescenza, un microscopio ottico utilizzato per studiare le proprietà di sostanze organiche e inorganiche con l'ausilio dei fenomeni di fluorescenza e fosforescenza. Il componente di interesse nel campione è innanzitutto marcato con una molecola fluorescente chiamata "fluoroforo" (che è in questo caso tioflavina), emettente fluorescenza verde quando legato all'amiloide. Detto metodo è altamente sensibile e specifico per quanto concerne la potenza diagnostica.

Un forte impulso alla ricerca e all'indagine sull'amiloide ha avuto luogo alla fine degli anni 50 dello scorso secolo, grazie allo sviluppo di tecniche per isolare le fibrille da tessuti e organi; il primo metodo venne descritto da Cohen e Calkins, successivamente Glenner e Bladen ne proposero un ulteriore. Fu Pras a descrivere il metodo oggi più utilizzato per estrarre quasi tutti i tipi di amiloide, ad eccezione dell'amiloide A β e della proteina prionica(13)(14)(15)(16).

Le indagini strutturali sull'amiloide iniziarono negli anni '30 dello scorso secolo, grazie all'uso della diffrazione dei raggi X. Più specificamente nel 1935 Astbury e Dickinson conclusero che *"la denaturazione termica delle albumine [...] rende semplicemente la fotografia a raggi X più simile a quella di una disposizione casuale di fibre di β -cheratina"*, notando per la prima volta il caratteristico pattern di diffrazione delle fibre di raggi X successivamente chiamato "cross- β ". Utilizzando questa tecnica si è concluso che l'amiloide risulta essere composta da catene polipeptidiche estese nella cosiddetta conformazione "cross- β ". Nella struttura a cross β , i singoli protofilamenti di ciascun foglietto β decorrono perpendicolarmente all'asse della fibrilla (con una distanza di 4,7 Å) mentre i differenti foglietti β (con una distanza di ~ 10 Å) sono paralleli all'asse della fibrilla. (17)(18)(19)(20)

Nel 1959, Cohen e Calkins iniziarono studi al microscopio elettronico dei tessuti amiloidi nei reni di ratto e nei reni umani, osservando depositi di amiloide con una struttura fibrillare larga ~ 75 – 140 Å e lunga ~ 1000 – 16000 Å (21).

Nel 1997, nuove tecniche come la microscopia a forza atomica, la microscopia crioelettronica e la spettroscopia RMN hanno iniziato ad essere utilizzate per le indagini sulla morfologia dell'amiloide iniziando a chiarire la morfologia dei protofilamenti amiloidi, delle protofibrille e fibrille. (22)(23)(24)(25)

È stato dimostrato che la stessa proteina può formare fibrille amiloidi, che possono avere morfologie diverse, come motivi coiled-like e ribbon-like di β -peptide. Inoltre, le proteine amiloidogene possono formare non solo fibrille ben strutturate ma altresì aggregati amorfi (26)(27)(28).

Ergo la fibrilla è il componente alla base di tutta la struttura dell'amiloide; è costituita da protofilamenti attorcigliati: una catasta di differenti strati proteici

aventi la conformazione a foglietto β che, una volta aventi interazione tra loro, concorrono a formare una fibrilla amiloide.

Una fibrilla può essere formata da un numero variabile di protofilamenti interagenti parallelamente tramite le loro catene laterali. In alcuni casi può essere costituita da un singolo protofilamento. I protofilamenti e le fibrille amiloidi possono altresì essere generati in vitro da proteine purificate, a loro volta ottenute da depositi ex vivo ma anche da peptidi sintetici o ricombinanti (29)(30)(31)(32).

Nonostante le conoscenze riguardo questo proteiforme gruppo di condizioni patologiche siano radicalmente mutate nell'arco dei 150 intercorsi dalla prima pubblicazione di Rudolph Virchow sull'argomento, il termine "amiloide" è ancora oggi usato per definire l'accumulo di materiale aberrante la cui deposizione tissutale sottende manifestazioni cliniche estremamente differenti. Ergo, il dualismo tra una lesione anatomo patologica comune e la impressionante varietà di fenotipi clinici che ad essa fanno riferimento può essere una cruciale chiave di lettura nel percorso diagnostico di questa malattia, che ancora oggi richiede la dimostrazione di proteina amiloide nei tessuti colpiti.

1.2 Plasticità proteica e biochimica strutturale dell'amiloide

Una proteina è in grado di assumere una moltitudine di diversi stati conformazionali nel contesto di un organismo vivente, da quando viene sintetizzata sino al momento in cui viene degradata con la proteolisi, con tali stati che si interconvertono su un'ampia gamma di scale temporali.

Questi stati conformazionali sono coinvolti nello sviluppo di disturbi della deposizione proteica, tramite due pathways distinti: da un lato ci sono alcune proteine tra cui α -sinucleina, tau e polipeptide amiloide insulare (IAPP), le quali sono per la gran parte non strutturate, descritte come nativamente malripiegate od intrinsecamente disordinate; dall'altro proteine native correttamente ripiegate il cui prodotto di proteolisi è intrinsecamente disordinato, ed esempi di questo pathway sono il peptide amiloide- β ($A\beta$) ed il frammento amiloidogenico della gelsolina. (33)(34)

La maggior parte delle catene polipeptidiche di nuova sintesi si ripiega correttamente attraverso la formazione di uno o più stati parzialmente ripiegati: a questa categoria appartengono lisozima, transtiretina e β 2-microglobulina.

Nella definizione dei diversi stati conformazionali adottati dalle proteine partecipano differenti elementi: a partire dalla sequenza amminoacidica intrinseca, ruolo cruciale viene altresì svolto dall'interazione con gli chaperoni molecolari e dai sofisticatissimi meccanismi di controllo di qualità della proteina, oltre che i complessi processi di degradazione. (35)

Sebbene tutti questi componenti si siano evoluti per consentire un corretto funzionamento, in alcune circostanze sequenze polipeptidiche possono trasformarsi in aggregati proteici non funzionali e potenzialmente detrimentalmente, che la cellula non è in grado di rimuovere; sia le proteine intrinsecamente disordinate che le proteine inizialmente ripiegate in modo corretto possono essere coinvolte in tale processo.

Le specie proteiche che si formano inizialmente durante l'aggregazione sono ammassi di piccolo numero di molecole che tuttavia nel tempo danno origine a oligomeri disordinati, parzialmente ripiegati, o native-like, a seconda del tipo di monomeri da cui derivano.

Questi aggregati precoci sono generalmente instabili a causa della debolezza dell'interazione intermolecolare attraverso la dissociazione e la rigenerazione delle specie solubili; tuttavia, in alcuni casi l'esposizione di residui idrofobici normalmente latenti è oggetto dell'attività di endopeptidasi ubiquitarie, per cui anche un clivaggio di significato minore può cagionare il malripiegamento e altresì compromettere il ripristino della struttura nativa.

Quando l'aggregazione delle proteine denaturate procede, tali aggregati possono subire una riorganizzazione interna formando cluster ben strutturati in foglietti β , caratterizzati da una maggiore compattezza ed una maggiore dimensione (36)(37)(38)(39)(40)(41).

Un passaggio necessario nell'amiloidogenesi risulta essere quindi la progressiva perdita del corretto ripiegamento di una struttura proteica nativa, che viene quindi ad assumere stati sempre meno termodinamicamente stabili. (42)

L'aumento dimensionale degli oligomeri così formati si può avere per un fenomeno di autoassociazione o alternativamente per l'aggiunta di monomeri, con una conseguente riorganizzazione strutturale e formazione di fibrille presentanti aspetto cross- β .

Alternativamente, l'accrescimento dimensionale non porta alla definizione di alcun pattern ben organizzato, ma piuttosto alla formazione di depositi amorfi o assemblaggi che non sono altro che accumuli degli oligomeri iniziali.

Naturalmente una proteina mal ripiegata deve raggiungere una concentrazione locale critica per innescare la formazione di fibrille, e a tale formazione vengono a partecipare altri fattori locali come endopeptidasi, glicosamminoglicani e ioni metallici che modulano l'aggregazione e la formazione di oligomeri (43)(44)(45).

Nonostante le diverse origini, i depositi di amiloide condividono diverse proprietà strutturali. Visti al microscopio elettronico sono composti da fibrille rigide, non ramificate, con un diametro medio di 7,5-10 nm ed una struttura secondaria a cross- β . I monomeri proteici risultano inoltre essere stabilizzati dal legame idrogeno intermolecolare tra gruppo ammidico e gruppo carbonile.

Le proteine amiloidogeniche, declinate in assemblaggi amorfi, native-like, od organizzate in complesse strutture cross- β rappresentano l'elemento patogenetico comune a molte condizioni morbose, nelle quali tendono ad accumularsi in contesti spazio temporali ben definiti.

1.3 Classificazione

Le fibrille conformate a foglietto β sono in natura adattate a molti scopi: vi sono taluni ormoni polipeptidici che, ad esempio, risultano essere immagazzinati in una conformazione a foglietto β .

La proteina melanina è legata ad un particolare carrier fibrillare con struttura a foglietto β chiamato p-mel, collocato nei melanosomi.

Molti animali inferiori usano le intrinseche proprietà di resistenza e tenuta del foglietto β per produrre strutture extracorporee: un esempio di ciò è la seta. Persino gli stessi batteri generano particolari strutture come il biofilm grazie alla presenza di composizioni fibrillari a foglietto β .

Tutti questi sono ottimi esempi di ciò che può, in tal misura, essere definito come *amiloide funzionale*.

Ergo, è cruciale poter distinguere in maniera chiara i lemmi “amiloide” ed “amiloidosi”: la prima denota una specifica struttura peptidica, la seconda identifica il processo morboso che consegue alla deposizione di aggregati amiloidi aberranti.

Le prime osservazioni in questo campo presumevano che le fibrille amiloidi avessero un aspetto simile nonostante la diversa origine proteica. Tuttavia è fondamentale poter effettuare una classificazione dell’ “amiloide” distinguendo le principali classi di fibrille (si sa difatti che le fibrille formate in vitro dalla proteina ricombinante possono differire dalle fibrille in vivo formate dallo stesso precursore):

1. Fibrille correlate a malattia, in vivo ed ex vivo;
2. Fibrille funzionali, in vivo ed ex vivo;
3. Fibrille ricombinanti, sia di proteine associate a malattia che di proteine amiloidi funzionali;
4. Fibrille di peptidi sintetici, o comunque non correlati alla malattia
5. Fibrille ottenute da condensati o da idrogel presentanti il tipico pattern di diffrazione cross- β

Altra peculiare caratteristica dei depositi di amiloide riguarda la presenza di proteine aggiuntive tra cui componenti della matrice extracellulare, come laminina, entactina e collagene.

La componente P dell'amiloide sierica (SAP o AP), una glicoproteina della famiglia delle pentrassine, è legata con un'interazione calcio- dipendente alle fibrille amiloidi, questo indipendentemente dalla proteina di origine.

SAP risulta essere altamente protetta nei confronti della proteolisi, rendendo le fibrille amiloidi altamente rigide e resistenti, sia alla denaturazione che alla degradazione termica e chimica. (46)(47).

Anche i proteoglicani come l'eparansolfato ed i glicosaminoglicani sono comuni nei depositi di amiloide e contribuiscono alla composizione glucidica dell'amiloide influenzando la conformazione della fibrilla. Nonostante il loro ruolo sia ancora sconosciuto nel contesto di un deposito amiloidotico, sembra che essi possano contribuire sia alla genesi che alla stabilizzazione strutturale delle fibrille amiloidi. Inoltre è stato proposto che i proteoglicani possano formare l'impalcatura strutturale iniziale che facilita l'adesione e l'orientamento dei primi nuclei di amiloide aggregata; la loro eterogeneità sembrerebbe in qualche modo influenzare la localizzazione dei depositi di amiloide.

Con l'impiego della spettrometria di massa è stato dimostrato che talune proteine sono spesso presenti a livello dei depositi di amiloide in concentrazioni più elevate rispetto ad altri tessuti, come apo-AI, apo-AIV, apo-E e molte altre. Il loro ruolo nella fisiopatologia dell'accumulo di proteine scorrettamente ripiegate è ad oggi sconosciuto, ma il riscontro di questi elementi proteici a livello del campione tissutale oggetto di studio può orientare verso un sospetto di amiloidosi, tanto che spesso ci si riferisce a queste come *"amyloid signature proteins"*, ovvero proteine "firma" dell'amiloide.

Tutte le proteine amiloide hanno una denominazione particolare: si impiega la lettera A a cui segue il nome identificativo della proteina, come un suffisso: un esempio può essere AL, dove L sta per catena leggera delle immunoglobuline; ancora, ATTR, dove TTR sta per transtiretina.

Ulteriori specifiche possono essere fornite dopo il nome della proteina, ad es. ATTRwt (wild type) e ATTRv (variante, che può essere sostituita dalla mutazione specifica come ATTRV122I) dette anche ATTRh (ereditaria).

Il Nomenclature Committee raccomanda in quest'ultimo caso l'impiego della proteina matura nella numerazione dei residui amminoacidici, senza l'uso di sequenze leader.

La numerazione del precursore completo può essere inclusa, però solo successivamente ed in una dicitura tra parentesi, ad es. ATTRV30M (precursore TTRV50M).

Un altro concetto importante da sottolineare è che le abbreviazioni sono pensate per riferirsi alla proteina non per riferirsi alla malattie; queste ultime dovrebbero quindi essere definite con il nome della proteina seguito dal termine "amiloidosi". (5). Le strutture proteiche associate ad amiloidosi sono differenti, circa 18 proteine sono ad oggi associate ad amiloidosi sistemica e 22 sono associate a forme localizzate (in alcuni casi si possono trovare sovrapposizioni). Ci sono inoltre alcuni elementi proteici per i quali la verifica della capacità amiloidogenica è ancora in fase di studio. Sono state poi in letteratura segnalate alcune inclusioni intracellulari che hanno manifestato almeno una delle tipiche proprietà di una fibrilla amiloide.

1.4 Deposizione dell'Amiloide

La deposizione di amiloide negli organi bersaglio avviene mediante un complesso processo di aggregazione. La cinetica della formazione delle fibrille ha una curva di crescita che ricorda la forma di una S italiana, con una fase di *lag* ben distinguibile. La durata di ciascuna fase di deposizione dell'amiloide è specifica per il tipo di proteina considerato, e permette di definire la velocità con cui si verifica l'intero processo (48).

In primo luogo, la nucleazione primaria si verifica quando gli oligomeri solubili si formano a partire dai monomeri: il processo di nucleazione iniziale è guidato da specifiche parti adesive delle proteine amiloidi. Le cellule degli organi bersaglio possono essere transitoriamente coinvolte nel processo di deposizione dell'amiloide.

Nel caso dell'ATTR i segmenti adesivi che formano i protofilamenti- β F ed H nella struttura nativa della transtiretina sono i principali motori dell'aggregazione proteica. Dopo la dissociazione in monomeri, questi filamenti vengono esposti e sono in grado di formare catoste di elementi proteici complessi, che portano alla formazione delle fibrille amiloidi. Una volta formata, la fibrilla esistente diventa la base su cui si aggiungono i monomeri circolanti. Questo è il fenomeno di nucleazione primaria. La cosiddetta nucleazione secondaria avviene quando la superficie di questo aggregato inizia a catalizzare la formazione di nuovi aggregati

solubili. Infine si verifica la frammentazione delle fibrille esistenti, aumentando così il numero totale di fibrille (49).

Il processo di deposizione di amiloide può essere accelerato dalla presenza di fibrille preformate, le quali possono intrappolare proteine native a funzione precursoriale e catalizzarne la conversione, anche a basse concentrazioni, in strutture mal ripiegate, tossiche e soggette ad aggregazione (50).

Diversi fattori concorrono a determinare la deposizione di amiloide in tessuti o organi specifici quali le concentrazioni proteiche locali, la riduzione del pH, presenza di fibrille preformate e interazioni specifiche con glicosaminoglicani tissutali o recettori della superficie cellulare. (51)

Nell'amiloidosi AL è stato ipotizzato che il tropismo d'organo possa essere una funzione dei polimorfismi genici della regione variabile, i quali regolano l'interazione tra catene leggere e costituenti extracellulari(52): un esempio di ciò è che le cellule della linea germinale LV1-44 determinano una deposizione cardiaca più favorevole di catene leggere.

Altra dimostrazione di questo è la diversa propensione dei diversi tipi di ATTR a depositare nel sistema nervoso periferico o nel tessuto cardiaco a seconda del sito specifico di sostituzione dell'amminoacido.

Inoltre, la scissione del monomero TTR in fibrille frammentate sembrerebbe svolgere un ruolo sia nel determinare il sito di deposizione delle fibrille che nella penetranza della malattia: le fibrille TTR "full-length" (a lunghezza intera) sono comunemente osservate nella variante ATTR Val30Met, con malattia precoce e manifestazioni neurologiche predominanti, mentre quelli con malattia ad esordio tardivo hanno spesso fibrille composte una combinazione di TTR tronca e TTR full-length, con un coinvolgimento cardiaco più importante alla presentazione (53)(54).

Allo stesso modo nella ATTRwt i depositi di amiloide includono sempre fibrille TTR con elementi proteici tronchi ed elementi proteici interi. Esistono dunque, verosimilmente, fattori ambientali e polimorfismi genetici che giocano un ruolo cruciale nella fisiopatologia della ATTRwt, favorendo sia il deposito di proteine full-length che di elementi proteici tronchi (55).

1.5 Epidemiologia dell'Amiloidosi

I dati epidemiologici dell'amiloidosi sono effettivamente molto limitati. A fronte dell'intrinseca rarità di questa condizione patologica, è indubbio che la scarsa tendenza diagnostica abbia negli anni giocato un ruolo importante nel condizionare il profilo epidemiologico di questo gruppo di condizioni morbose. Ciò si deve anche al fatto che in passato, non essendovi trattamento disponibile per la patologia, ogni tentativo diagnostico risultava in un nichilismo terapeutico. Da qui la verosimile sottostima della diffusione della patologia, influenzata dalla tendenza alla sotto-diagnosi.

Il primo studio circa la prevalenza della forma AL, pubblicato nel 1992, venne condotto nella contea di Olmsted, MN, USA e ha riportato una prevalenza da tre a cinque casi per milione di popolazione (56). In uno studio pubblicato nel 2014, i certificati di morte del Regno Unito indicano che l'amiloidosi ha un'incidenza di circa 1 ogni 100.000 abitanti ed è causa di morte in 0,58 ogni 100.000 individui (57). Uno studio successivo sulle dimissioni ospedaliere svedesi e sui registri ambulatoriali ha mostrato un'incidenza di 8,29 per milione di anni-persona per l'amiloidosi AL (58).

La complessità nello studio epidemiologico dell'amiloidosi sistemica è ulteriormente aggravata dalla pleora di differenti proteine amiloidi, oltre che dalle continue acquisizioni scientifiche circa questa condizione; difatti i dati del National Amiloidosis Center (NAC) raccolti nel Regno Unito dal 1987 al 2012 hanno mostrato una sostanziale modifica nella distribuzione dei diversi tipi di amiloidosi tra i pazienti affetti. Da un lato la frequenza dell'amiloidosi AL in proporzione al totale dei casi totali annuali è rimasta stabile nel corso dei decenni (quasi il 66% di tutti i casi); la prevalenza di quest'ultima è ovviamente in aumento a causa di terapie efficaci ed è stato riportato l'incidenza ad oggi è di 40-58 individui affetti per milione di anni-paziente (59).

Inoltre la gammapatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) è un precursore e quindi un fattore di rischio per l'amiloidosi AL; il follow-up a lungo termine dei soggetti con MGUS ha rivelato un rischio relativo di 8,8 di sviluppare di amiloidosi AL rispetto ai soggetti senza MGUS (60). Come MGUS anche il

mieloma multiplo (MM), una discrasia plasmacellulare, è strettamente correlato all'amiloidosi AL, infatti fino al 20% dei pazienti che presentanti amiloidosi AL sono altresì da mieloma multiplo (61); ergo, a causa della crescente diagnosi di neoplasie ematologiche, anche l'incidenza e la prevalenza di AL sono aumentate negli ultimi anni e si prevede un aumento ulteriore negli anni a venire.

D'altra parte il numero di pazienti riferiti con amiloidosi AA è crollato drasticamente dal 32% al 6-8% con un contemporaneo incremento dei pazienti aventi wtATTR, passati dallo 0-2% al 6-4% dei casi totali (62).

La vera incidenza dell'amiloidosi ATTRwt negli anziani rimane sconosciuta, i dati sono scarsi e pochi studi la valutano con modalità sistematiche. In generale, l'amiloidosi ATTR è stata tradizionalmente considerata una malattia rara e, in mancanza di un trattamento efficace sino a pochi anni fa, la diagnosi di l'amiloidosi da ATTR ha avuto implicazioni cliniche limitate, ergo i pazienti non sono stati sottoposti a screening proattivo per questa condizione. È tuttavia interessante considerare come depositi cardiaci di amiloide ATTR siano stati riportati all'autopsia in circa un quarto degli individui con età superiore ad 80 anni (63).

L'uso progressivo di strumenti diagnostici come la risonanza magnetica cardiaca e la scintigrafia ossea ha permesso di identificare una percentuale maggiore di pazienti con cardiomiopatia da amiloidosi ATTR: difatti, il 13% dei pazienti anziani con scompenso cardiaco a frazione di eiezione conservata (HFpEF) e concomitante incremento dello spessore di parete cardiaca presentano amiloidosi ATTRwt non diagnosticata in precedenza; in altri studi è stata riscontrata una prevalenza >20% in pazienti di età superiore a 80 anni con diagnosi di HpEF (64)(65)(66)(67).

Questa osservazione è stata recentemente confermata da studi in cui è stato osservato un forte incremento della diagnosi di ATTR-AC negli Stati Uniti e nel mondo con una contemporanea riduzione dei pazienti in classe III-IV della New York Heart Association (NYAH), suggerendo la presenza di strategie diagnostiche più precoci ed efficaci (68)(69)(70)(71).

Questo tipo di incremento manifesta anche delle differenze geografiche, testimoniando sia il fatto che la condizione è stata fortemente sotto-diagnosticata,

sia che centri specializzati in tale ambito ottengono un tasso di rilevamento più elevato.

La stenosi aortica, patologia molto prevalente nell'anziano, sembra presentare una forte coesistenza con la ATTRwt-AC; la prevalenza della doppia malattia aumenta con l'età ed è maggiore nei pazienti con stenosi aortica low flow, low gradient.

Studi hanno dimostrato come la prevalenza di depositi di amiloide vari dal 4% al 29% nei pazienti con stenosi aortica serrata sottoposti a intervento valvolare (72). Non è ancora chiaro se l'accumulo di amiloide TTR contribuisca a determinare la stenosi aortica o siano solo due condizioni sovrapposte; risulta essere invece evidente il fatto che la presenza di cardiomiopatia ATTRwt in caso di stenosi aortica impatti negativamente sulla prognosi e riduca la risposta del paziente a terapie sia farmacologiche che interventistiche. Vi è infatti evidenza di un aumento variabile della mortalità a 1 anno dal 20% al 56% in una casistica, e dal 13,9% al 24,5% in un'altra(73)(74).

Poiché la cardiomiopatia amiloidotica e la stenosi aortica condividono talune caratteristiche cliniche, è stato sviluppato un punteggio detto RAISE al fine di predire la presenza di CA nella stenosi aortica grave; la sua efficacia è ad oggi oggetto di investigazione (75).

La coesistenza di queste due condizioni patologiche è stata ancor più rimarcata, nonché resa più complessa, da un recente studio indiano che mostrava la sussistenza di amiloidosi valvolare isolata nel 71,7% delle valvole aortiche native asportate da pazienti sottoposti a sostituzione chirurgica della valvola aortica (SAVR)(76).

Un altro tipo emergente di amiloidosi è quella dovuta alla deposizione fattore chemiotattico leucocitario-2 (ALect2), che sembra essere attualmente la terza causa più comune di amiloidosi renale acquisita, la quale si verifica prevalentemente nei pazienti dell'Asia meridionale, del Nord Africa, del Medio Oriente e del Messico(77).

Se è complesso giungere ad una panoramica epidemiologica delle forme di amiloidosi acquisite, ancor più complesso è ottenere dati affidabili riguardo le

forme ereditarie di amiloidosi. Ad eccezione della polineuropatia amiloide familiare (ATTR-FAP) che risulta da mutazioni della transtiretina e si manifesta con una frequenza inferiore a 1:1000.000 in Europa, l'epidemiologia dell'amiloidosi ereditaria è ad oggi poco conosciuta. Naturalmente, essendo ascritta alle malattie genetiche, la sua prevalenza varia in modo significativo a seconda dell'origine dei pazienti e spesso organizzata in cluster di mutazioni soprattutto in piccole comunità autoctone: ad esempio la variante Val30Met della transtiretina che ha una prevalenza di 1:538 nel nord del Portogallo e del 4% nella Svezia settentrionale. Ovviamente la penetranza è molto variabile; la forma Thr60Ala TTRv ha una prevalenza nella popolazione della contea del Donegal in Irlanda prossima all' 1,1%; la Val122Ile TTRv è presente nel 3.5% della popolazione afroamericana ed è associato a cardiomiopatia amiloidotica, pur avendo esordio tardivo ed una penetranza molto bassa(78)(79)(80)(81).

I pazienti con ATTRv vengono generalmente diagnosticati in età più giovane rispetto a quelli con ATTRwt; sono state identificate più di 130 mutazioni amiloidogeniche che possono causare un fenotipo prevalentemente cardiomiopatico, prevalentemente neuropatico o di carattere misto.

1.6 Manifestazioni cliniche dell'amiloidosi sistemica

Il fatto che i depositi di amiloide possano osservarsi su quasi tutti i sistemi e gli apparati dell'organismo umano sottende la clinica estremamente eterogenea e proteiforme dell'amiloidosi sistemica ed allo stesso tempo giustifica come raramente si possano riscontrare segni o sintomi specifici per questa condizione. Gli organi più frequentemente coinvolti dalla deposizione di amiloide sono il cuore, i reni, il sistema nervoso, il fegato e il tratto gastrointestinale. Meno frequentemente possono essere colpiti altri distretti come polmoni e muscoli o tessuti molli.

Alcune specifiche forme di amiloidosi provocano tipicamente sintomi localizzati in un organo specifico (come ad esempio la ATTRwt con il cuore), mentre altri tipi si estrinsecano con un coinvolgimento multiorgano (è il caso della amiloidosi AL). Il coinvolgimento renale si presenta tipicamente con proteinuria non selettiva e/o insufficienza renale.

Le manifestazioni neurologiche variano a seconda del tipo di elemento nervoso coinvolto, sia esso un nervo periferico od una struttura nervosa autonoma; più specificamente la neuropatia amiloidotica è caratterizzata dal coinvolgimento precoce dei nervi somatici e autonomi.

I pazienti spesso si presentano con una neuropatia simmetrica lunghezza-dipendente che inizialmente causa riduzione sino alla perdita della sensibilità termico-dolorifica, e che sovente progredisce sino a causare riduzione dell'equilibrio, debolezza e generale intorpidimento. Non è raro che i pazienti riferiscano dolore con caratteristiche brucianti e lancinanti.

Oltre alla valutazione clinica, l'elettromiografia è il principale esame diagnostico e di solito mostra una neuropatia periferica sensoriale-motoria di tipo assonale con caratteristiche lunghezza-dipendente; essa può tuttavia essere normale in fase iniziale, fintanto che sono interessate le sole fibre amieliniche.

Il coinvolgimento autonomo si manifesta con ritenzione urinaria, ipotensione ortostatica, sazietà precoce, alterazione del movimento intestinale e disfunzione erettile. La difficile identificazione delle manifestazioni neurologiche è ulteriormente complicata dal fatto che segni e sintomi di significato neuropatico possono fondersi e sovrapporsi a quelli dipendenti dalle disfunzioni dei diversi organi, come ad esempio il cuore in caso di ipotensione ortostatica od il coinvolgimento del tratto gastrointestinale per la dismotilità intestinale.

Altre manifestazioni gastrointestinali sono disfagia, perdita di peso, sanguinamento, malassorbimento intestinale ed ulcerazione delle pareti gastriche sino alla loro perforazione; si può osservare epatomegalia, incremento degli enzimi epatici e, negli stadi più avanzati, insufficienza epatica.

Ci può essere inoltre un coinvolgimento muscolo-cutaneo, che si manifesta con debolezza, mialgia, pseudoipertrofia, mentre l'interessamento prettamente cutaneo esita in alopecia o cutis laxa.

Il deposito di amiloide a livello polmonare può determinare dispnea, tosse e infiltrati interstiziali diffusi, che possono essere apprezzati all'imaging.

Frequentemente, nelle forme ATTRwt, è possibile osservare la presenza di manifestazioni cliniche suggestive della deposizione di amiloide in contesti

tendinei e ligamentosi, quali sindrome del tunnel carpale (spesso bilaterale), stenosi spinale lombare e rottura del tendine del capo lungo del bicipite brachiale che produce il tipico segno di Popeye (82)(83).

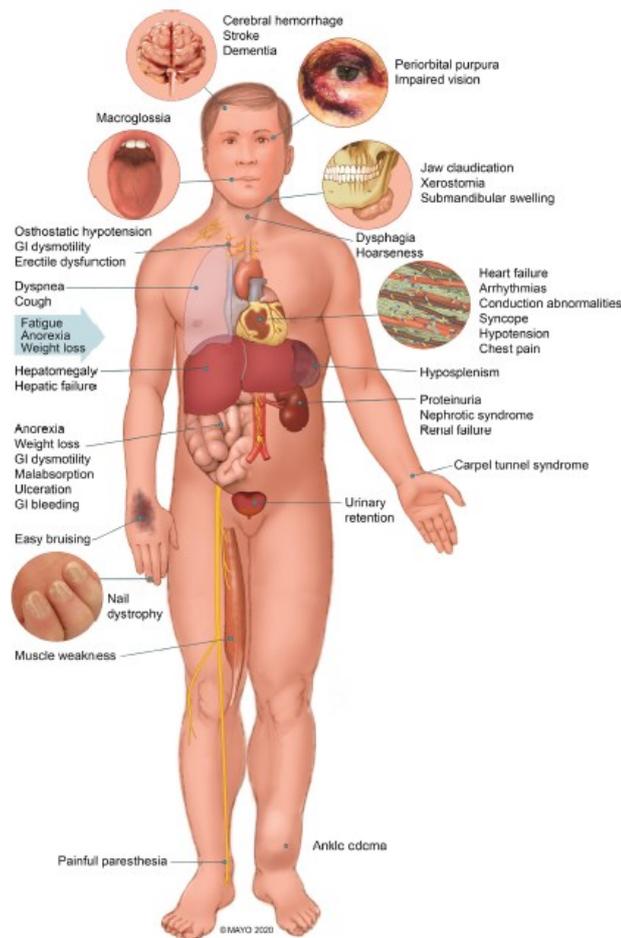


Figura 2: Principali manifestazioni cliniche di amiloidosi sistemica (83).

1.7 Amiloidosi cardiaca

Le principali fibrille amiloidi infiltranti il miocardio sono la transtiretina, sia nella forma wild-type che nella forma mutata, e le catene leggere delle immunoglobuline. Ne consegue che le forme principali di cardiomiopatie amiloidotiche risultano essere quelle ATTR-AC e AL-AC, le quali rappresentano oltre il 95% dei casi riscontrati clinicamente.

La transtiretina è una proteina a composizione omotetramerica sintetizzata nel fegato e nei plessi coroidei del sistema nervoso centrale. Circola nel plasma e nel

liquido cerebrospinale e funge da proteina carrier per la tetraiodotironina (o tiroxina) ed altresì per il retinolo (84).

L'omotetramero si risolve in due dimeri interagenti tra loro mediante due legami deboli prossimi ai rispettivi siti di legame della tiroxina. In questi siti i dimeri del TTR si dissociano e il processo di unfolding inizia con l'esposizione della superficie idrofobica e successivamente con il malripiegamento della proteina e la conseguente strutturazione in transtiretina amiloide.

Considerando la forma mutata della transtiretina, sono diverse le mutazioni che portano da una proteina tetramericamente cineticamente instabile con predisposizione alla dissociazione a monomeri che successivamente vanno incontro a malripiegamento (85).

Ad esempio, è stato dimostrato che la variante Val122Ile destabilizza il tetramero TTR modulando la barriera termodinamica e cinetica per la dissociazione del tetramero, con un evidente incremento della formazione di monomeri malripiegati che poi tendono all'assemblaggio di fibrille amiloidi. Risulta essere curioso come nonostante i tetrameri mutati abbiano una chiara instabilità strutturale, vengono ad essere secreti con la medesima efficacia dei corrispondenti wild type.

Nella forma wild type della cardiopatia amiloidotica da transtiretina modificazioni ossidative della proteina nativa e alterazioni complesse (e non ancora ben caratterizzate) del meccanismo proteolitico, nonché dei sistemi di riparazione (dovuti verosimilmente alla senescenza cellulare) contribuiscono alla dissoluzione degli omotetrameri nativi in monomeri ed alla loro conseguente aggregazione per l'assemblaggio di fibrille di transtiretina, responsabili della patologia amiloidotica.

L'altro tipo più comune di amiloidosi cardiaca è la AL-AC, conseguenza di un'espansione clonale di plasmacellule differenziate, producenti catene leggere libere di immunoglobuline (FLC) soggette a ripiegamento errato.

Considerando le due classi di catene leggere κ e λ queste ultime sono molto più frequentemente causa di amiloidosi sistemica, cagionando circa il 66% delle forme di amiloidosi relate a catene leggere (86)(87).

Infine, sono state riscontrate mutazioni nella linea germinale a livello del gene codificante la regione variabile λ : V λ 6a e V λ 3r sembrano ridurre la stabilità

termodinamica della proteina, presentano inoltre una forte associazione con lo sviluppo dell'amiloidosi possono quindi giustificare la propensione delle catene leggere λ a formare depositi di amiloide.

L'evento mutageno riduce quindi la stabilità termodinamica rendendo così le catene leggere instabili e suscettibili all'endoproteolisi, che a sua volta cagiona il rilascio di frammenti amiloidogenici che andranno incontro ad una aggregazione impropria.

Altre forme meno comuni di AC includono l'amiloidosi AA, l'amiloidosi associata a dialisi e l'amiloidosi atriale isolata. Nell'amiloidosi AA, che è associata a malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide, le malattie infiammatorie croniche intestinali e l'idrosadenite suppurativa, la proteina sierica associata all'amiloide (SAA) è elevata.

Nella forma AA il coinvolgimento cardiaco è quasi sempre preceduto da una amiloidosi renale ed è cruciale garantire un controllo efficace del processo infiammatorio sottostante affinché esso possa essere arrestato e talora addirittura invertito (88).

La cardiomiopatia amiloidotica associata a dialisi a lungo termine riconosce come elemento patogenetico la β 2-microglobulina; è stata nel tempo correlata a membrane per dialisi a basso flusso nei pazienti in dialisi per una durata >9 anni ed è oggi fortemente ridotta grazie alle nuove tecnologie di dialisi (89).

Infine, l'amiloidosi atriale isolata è dovuta a depositi di fibrille da fattore natriuretico atriale ed è estremamente comune con l'avanzare dell'età; viene spesso osservata su biopsie atriali ottenute a seguito di un intervento di cardiocirurgia (90).

1.8 Meccanismi di disfunzione cardiaca

La deposizione delle fibrille amiloidi provoca lesioni cellulari e danni al tessuto miocardico che portano in ultima analisi alla disfunzione d'organo. È possibile identificare alcuni pattern tipici, sebbene non diagnostici, di deposizione di diverse fibre amiloidi: le fibre amiloidi AL tendono a localizzarsi in depositi diffusi,

pericellulari, endocardici e arteriosi o arteriolari mentre le fibre amiloidi TTR sovente formano depositi nodulari (91).

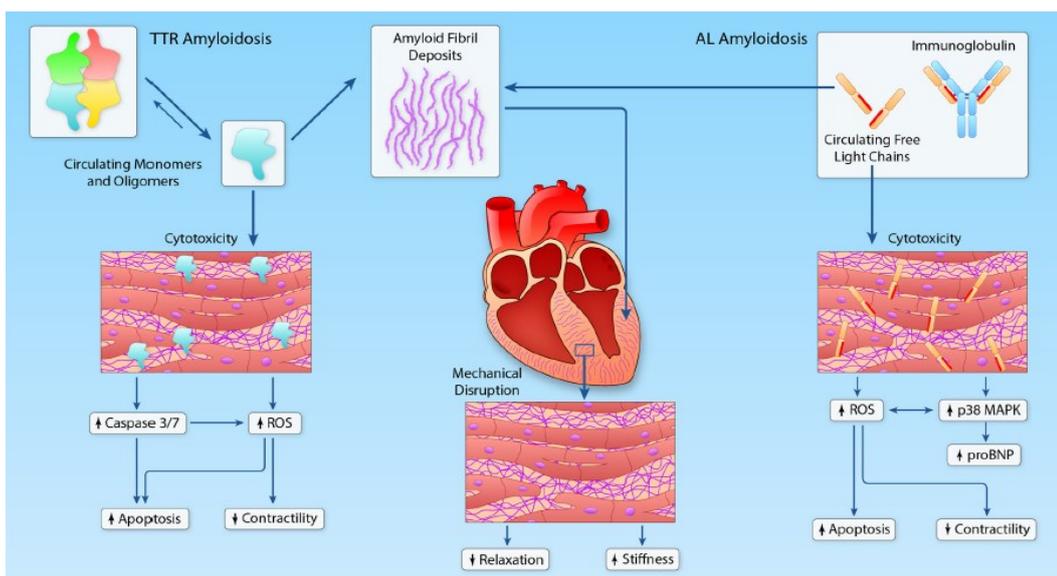


Figura 3: Meccanismi di disfunzione miocardica nell'amiloidosi cardiaca da transtiretina (TTR) e da catene leggere di immunoglobuline (AL). Sia nell'AL che nell'ATTR-AC, la deposizione extracellulare di fibrille amiloidi causa un'alterazione meccanica della normale architettura tissutale, con conseguente compromissione del rilassamento e aumento della rigidità ventricolare. Nell'AL-AC, le catene leggere libere circolanti causano citotossicità aumentando lo stress ossidativo e l'attivazione della via di segnalazione p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase). Nell'ATTR-AC, è stato proposto che i monomeri e gli oligomeri di TTR circolanti causino anche una citotossicità diretta. (94)(95)(99)

Qualsiasi sia la modalità di deposizione, i voluminosi depositi di amiloide a livello dello spazio extracellulare del miocardio cagionano la perdita della normale citoistocarchitettura e del funzionamento dei tessuti. Ciò comporta altresì ipertrofia biventricolare progressiva e rigidità senza dilatazione, con conseguente cardiomiopatia restrittiva e bassa gittata cardiaca. Potrebbe dunque considerarsi una fenocopia rara di cardiomiopatia ipertrofica con una fisiopatologia restrittiva (92).

Nella fase iniziale, la cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina presenta una disfunzione diastolica isolata con normale funzione sistolica. È inoltre presente infiltrazione atriale e disfunzione contrattile.

Man mano che la malattia progredisce nel tempo, la capacità ventricolare ridotta ed il deterioramento contrattilità della stessa camera cardiaca conducono ad una riduzione della gittata sistolica. Si notano inoltre delle alterazioni dell'accoppiamento ventricolare-vascolare (ventricular-vascular coupling) ed una progressiva disfunzione della pompa; questa dovuta sia al continuo peggioramento della funzione diastolica e all'incremento delle pressioni di riempimento, sia all'alterazione sistolica biventricolare.

In effetti, il semplice spostamento meccanico del tessuto parenchimale normale da parte dei depositi amiloidotici non è sufficiente per spiegare la disfunzione d'organo.

I monomeri ed oligomeri solubili di proteina amiloide sono estremamente tossici e si ritiene che svolgano un ruolo importante nella tossicità cellulare, come in quella tissutale.

Questo tipo di danno, detto di carattere tossico, è stato inizialmente postulato in modo da giustificare la significativa discrepanza sussistente tra il carico di fibrille amiloidi localizzate a livello miocardico e la disfunzione cardiaca stessa, nonché per giustificare la differenza prognostica presente tra la forma di amiloidosi AL, più aggressiva, e quella ATTR, meno aggressiva (93). La proteotossicità delle catene leggere manifesta un tropismo d'organo specifico: infatti le catene leggere cardiotropiche fibrillari dell'amiloidosi AL alterano lo stato ossidoriduttivo cellulare comportando un aumento delle specie reattive intracellulari dell'ossigeno, favorendo così stress ossidativo ed apoptosi. Questo stress ossidativo causato dalle catene leggere determina un deterioramento diretto della contrattilità e del rilassamento dei cardiomiociti, nonché una modifica della distribuzione del calcio intracellulare. La diretta conseguenza è l'attivazione di p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) che determina l'apoptosi cellulare; questa via media anche la trascrizione del peptide natriuretico cerebrale (BNP), supportando l'ipotesi che prevede una relazione tra cardiotossicità e livelli elevati di BNP (94)(95)(96).

Il grado di anomalia delle catene leggere circolanti è clinicamente prognostico nell'amiloidosi AL ed è correlato all'aumento dei biomarcatori. D'altra parte la riduzione delle FLC circolanti grazie all'effetto della chemioterapia determina una riduzione dei livelli di BNP (97)(98).

Anche nell'amiloidosi TTR lo spostamento meccanico del tessuto parenchimale da parte della deposizione di transtiretina anomala non spiega completamente la disfunzione cardiaca e un numero crescente di prove suggerisce che la disfunzione tissutale precede la deposizione di fibrille TTR, un fatto che sembrerebbe deporre a favore della tossicità delle proteine fibrillari circolanti.

Infatti, monomeri in vitro e intermedi oligomerici inferiori a 100 kDa inducono citotossicità attraverso interazioni con proteine di membrana; meccanismi apoptotici sono attivati attraverso il clivaggio della caspasi 3/7 e la concomitante formazione di anione superossido (99).

1.9 Diagnosi di amiloidosi cardiaca

1.9.1 Diagnostica di laboratorio di base

Il dosaggio di transaminasi, gamma glutammil transferasi, fosfatasi alcalina e bilirubina (totale e frazionata) per la valutazione della funzionalità epatica risulta essere fortemente raccomandata, in quanto può indicare un interessamento epatico, diretto od indiretto, cioè conseguenza di un danno cardiaco con scompenso cardiaco destro e congestione epatica. Inoltre è cruciale testare i livelli di proteine totali e determinare altresì i valori di albumina. Nei pazienti con sospetta amiloidosi devono inoltre essere esaminati i valori di proteina C reattiva, di elettroliti, la conta differenziale leucocitaria ed i parametri della coagulazione (INR, aPTT).

Poiché i reni sono interessati da forme differenti di amiloidosi, i valori di creatinina, di azoto ureico ed il GFR stimato debbono essere valutati. La quantificazione della proteinuria e dell'albuminuria (in particolare nella raccolta delle urine delle 24 ore) è fondamentale, in quanto rappresenta un criterio diagnostico per la presenza di coinvolgimento renale, sia nell' amiloidosi AL che nella forma AA.

Infine, sussistono inoltre taluni esami di laboratorio che risultano essere vitali per una completezza diagnostica:

- dosaggio delle catene leggere libere (FLC) sieriche (*con rapporto $\kappa:\lambda$ normale tra 0,26 e 1,65*)
- elettroforesi delle proteine sieriche (SPIE)
- elettroforesi delle proteine urinarie (UPIE), con immunofissazione (che dovrebbe essere sempre eseguita, in modo da aumentare la sensibilità per la rilevazione delle proteine monoclonali)(100)

La combinazione di SPIE, UPIE e quantificazione delle FLC sieriche ha una sensibilità del 99% per l'identificazione di precursori pro-amiloidotici anormali,

presenti nell'amiloidosi AL (101). Talora l'interpretazione dei risultati può essere resa complessa in virtù del basso livello di proteine monoclonali riscontrato o ancora dalla presenza di lievi variazioni del rapporto $\kappa:\lambda$ (rapporto FLC) in quanto è possibile trovarli anche in pazienti con malattia renale cronica (CKD) o con una gammopatia monoclonale a significato incerto (MGUS). Più specificamente, nei pazienti con insufficienza renale cronica, poiché la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) diminuisce, la clearance renale delle FLC policlonali cala e la loro concentrazione sierica incrementa, con risultati variabili anche in base al test utilizzato (test Freelite o test N Latex) (101).

Con il test N Latex il rapporto FLC si riduce al diminuire della GFR, tuttavia ad oggi non è stato proposto alcun intervallo di riferimento nei pazienti con insufficienza renale cronica. Con Freelite (il più utilizzato) il rapporto FLC incrementa al diminuire del GFR, per tal ragione ed è stato proposto come range di valori del rapporto [0,37-3,1], da considerare normale in caso di CKD.

Finora non sono disponibili valori di riferimento in base alla gravità dell'insufficienza renale cronica, ma nel momento in cui la GFR stimata (eGFR) è <45 ml/min/1,73 m² nel contesto di una SPIE/UIPE normale, un valore del rapporto FLC fino a 2,0 (o addirittura 3,1 se il paziente è dializzato) può essere generalmente considerato normale.

Naturalmente dovrebbero essere utilizzati i biomarcatori cardiaci BNP, NT-proBNP, troponina I e troponina T (possibilmente ad alta sensibilità), per indagare l'eventuale sussistenza di scompenso cardiaco o cardiomiocitolisi.

In una fase diagnostica detti marcatori non sono specifici per amiloidosi cardiaca, ma in caso di amiloidosi sistemica diagnosticata essi possono essere impiegati per destar sospetto di coinvolgimento cardiaco, soprattutto nell'amiloidosi AL in cui presentano un importante significato prognostico.

1.9.1.2 Troponina I ad alta sensibilità

Le troponine cardiache I (cTnI) e T (cTnT) sono componenti dell'apparato contrattile delle cellule del miocardio e sono espresse quasi esclusivamente nel distretto cardiaco. cTnI e cTnT sono i biomarcatori più utilizzati nella valutazione del danno miocardico ed i loro dosaggi ad alta sensibilità (hs) sono frequentemente impiegati nella diagnostica di plurime patologie cardiache. Difatti l'innalzamento di questi biomarcatori può essere registrato in differenti condizioni morbose, sia acute che croniche, tra le quali l'infarto miocardico acuto, le coronaropatie ed altresì la cardiomiopatia amiloidotica. Attualmente, la troponina I viene misurata con un test ad alta sensibilità, ed il valore del novantanovesimo percentile (99th) sesso-specifico misurato in una popolazione sana rappresenta il cut-off universalmente accettato per definire l'anormalità e la presenza di danno miocardico. La precedente definizione è riportata dal consensus document "Quarta definizione universale di infarto miocardico" (102). I test ad elevata sensibilità, per essere definiti tali, debbono soddisfare due caratteristiche principali:

- il 99esimo percentile deve essere misurato con una imprecisione analitica inferiore al 10% (%CV, coefficiente di variazione);
- valori superiori al limite di rilevamento debbono essere misurabili in almeno il 50% dei soggetti sani.

Se per la hs-TnT sussiste un unico test disponibile, diffuso globalmente, per la sua misurazione, per la hs-cTnI sono disponibili plurimi test prodotti da differenti prodotti da varie aziende ed approvati per l'uso clinico. Ciononostante, è presente scarsa armonizzazione tra detti test, conseguenza della diversa specificità degli anticorpi impiegati per i diversi epitopi, nonché da altri fattori influenzanti il dosaggio, tra i quali si annoverano la degradazione proteolitica, la fosforilazione e la presenza di complessi circolanti di cTnI di diversa conformazione. In ragione di quanto affermato, non è possibile descrivere un cut-off unico per la cTnI (come invece accade per la cTnT), ma sono necessari studi assay specifici come quello presentato in questa Tesi.

1.9.2 Elettrocardiografia

L'elettrocardiogramma a 12 derivazioni è un esame di 1° livello fondamentale, alla base di qualsiasi valutazione cardiologica, utile e necessario sia nel momento della diagnosi che nel follow up del paziente.

Non è possibile identificare reperti ECG specifici per la cardiomiopatia amiloidotica, ma ci sono alcune caratteristiche facilmente riconoscibili e anche abbastanza frequenti nella popolazione, pur tuttavia rimanendo non diagnostiche.

Il reperto ECG più noto che può essere associato ad amiloidosi cardiaca è la presenza di bassi voltaggi definiti da un'ampiezza del QRS inferiore a 5 mm, ovvero 0,5 mV, in ciascuna derivazione periferica e/o da un'ampiezza del QRS inferiore a 10 mm, ovvero 1 mV, in ogni derivazione precordiale e/o un indice di Sokolow-Lyon (S onda in V1 e onda R in V5-V6) inferiore a 15mm.

La presenza di bassi voltaggi si verifica in quasi il 50% dei casi AL e nel 30% dei casi ATTR con alcune variazioni importanti, a seconda degli studi cui si fa riferimento(103). I classici predittori di voltaggio, come età, sesso, etnia, livelli di pressione sanguigna, superficie corporea e l'essere o meno un fumatore, risultano essere spesso dissonanti rispetto ai voltaggi misurati. La cardiomiopatia amiloidotica non è la sola causa di bassi voltaggi all'ECG, difatti condizioni diverse dall'amiloidosi cardiaca possono comportare bassi voltaggi all'ECG come un pregresso infarto del miocardio, presenza di malattie polmonari, o ancora, presenza di versamento pericardico.

Inoltre, la relazione lineare che si osserva tra massa ventricolare sinistra e voltaggi presenti sul tracciato elettrocardiografico non è valida nell'amiloidosi cardiaca (105).

Ergo, classico segno distintivo della malattia può venire descritto come la combinazione di basso voltaggio QRS all'ECG e incremento dello spessore di parete del ventricolo sinistro all'ecocardiografia: il cosiddetto rapporto massa-voltaggio.(106) (107)(108)(109).

Il rapporto massa-voltaggio del ventricolo sinistro si è rivelato molto utile nella diagnostica differenziale della cardiomiopatia amiloidotica nei confronti di altre

condizioni associate ad ipertrofia ventricolare sinistra come la cardiopatia ipertensiva o la cardiomiopatia ipertrofica. (109)(110)(111)(112)

Inoltre, l'aumento del rapporto massa-voltaggio del ventricolo sinistro sembra essere in relazione con la progressione della cardiomiopatia amiloidotica.

Infine, il rapporto massa-tensione VS è stato altresì preso in esame come indicatore prognostico con risultati spesso tra loro in conflitto, tuttavia il suo aumento sembrerebbe essere associato ad un incremento di ospedalizzazioni per scompenso cardiaco. (113)(114)(115)(116)

Parallelamente ai bassi voltaggi è fondamentale evidenziare come fino al 25% dei pazienti con cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina rispetta i criteri di voltaggio per l'ipertrofia ventricolare sinistra. (117)

Un'altra caratteristica elettrocardiografica comune è il prolungamento dell'intervallo QT, corretto per la frequenza con la formula di Bazett. Si è dimostrato che la compresenza di un QTc superiore a 440 ms unitamente ad un indice Sokolow-Lyon inferiore a 1.5 mV in pazienti con ispessimento della parete ventricolare sinistra è diagnostico per amiloidosi cardiaca, con una sensibilità dell'85% e una specificità del 100%. (118)

Un altro reperto ECG comune è il pattern pseudoinfartuale, con onde Q di pseudonecrosi che si possono riscontrare nelle derivazioni periferiche ed anche precordiali, talora imitando un infarto inferiore, antero-settale o laterale(119); questo pattern è stato riportato in diversi studi con una prevalenza variabile tra il 29% e il 60% (120); sembrerebbe inoltre che la presenza del detto pattern abbia anche un significato prognostico negativo. (121)

Inoltre, il blocco atrioventricolare di secondo grado e di terzo grado risulta essere comune e spesso presenta indicazione all'impianto di pacemaker nei pazienti con amiloidosi cardiaca.

Anche il blocco atrioventricolare di primo grado sembrerebbe essere prevalente, essendo riportato nel 56% dei pazienti con ATTR-AC correlata alla variante Val122Ile.

Oltre alle bradiaritmie, comuni nell'amiloidosi cardiaca, anche le tachiaritmie risultano essere particolarmente presenti in questa condizione, prima fra tutte la fibrillazione atriale, con valori di prevalenza fino al 67% dei pazienti con amiloidosi ATTRwt. (122)

Sono presenti altresì tachiaritmie ventricolari, che spesso si presentano come tachicardia ventricolare (TV) sostenuta o fibrillazione ventricolare (VF) nel contesto di arresto cardiaco. È possibile tuttavia osservare ma anche con battiti ventricolari prematuri (BEV) o tachicardie ventricolari non sostenute, spesso di difficile trattamento.

1.9.3 Ecocardiografia

L'ecocardiografia risulta essere una metodica di primo livello fondamentale per l'inquadramento della cardiomiopatia amiloidotica.

Nonostante l'accumulo di amiloide possa verificarsi a livello di qualsiasi distretto cardiaco, il deposito maggiore si ha principalmente a livello delle pareti ventricolari, le quali appaiono ispessite ma non dilatate. Tendenzialmente il deposito risulta essere simmetrico a livello della AL-AC ed asimmetrico a livello della ATTR-AC (123).

Sebbene vi sia ampia disponibilità dell'ecocardiografia, essa di solito rappresenta solo il primo passo dell'iter diagnostico, in quanto non risulta né sufficientemente specifica o sensibile per la diagnosi di cardiomiopatia amiloidotica (124).

Ovviamente, l'elemento più caratteristico della cardiomiopatia amiloidotica, facilmente osservabile all'ecocardiografia, è l'incremento dello spessore del setto interventricolare, il quale ha provato di essere marker di interessamento cardiaco nei pazienti con amiloidosi sistemica da catene leggere non presentanti cause comuni di rimodellamento concentrico quali stenosi aortica od ipertensione arteriosa (125).

I tipici reperti ecocardiografici comprendono inoltre l'ispessimento parietale ventricolare con concomitante riduzione del volume di camera ventricolare, sia destra che sinistra, l'ingrandimento atriale (che tuttavia è spesso lieve in quanto gli stessi atri risultano essere infiltrati da amiloide), l'ispessimento valvolare,

versamento pleurico/pericardico e segni di incremento delle pressioni di riempimento ventricolari come pattern di filling diastolico di natura restrittiva.

Una caratteristica generalmente considerata tipica in passato di cardiomiopatia amiloidotica è il cosiddetto aspetto “granular sparkling” del miocardio, tuttavia ad oggi è noto come questo elemento esso sia altamente non-specifico (106).

Per quanto concerne l’aspetto funzionale, la frazione di eiezione (FE) è tipicamente conservata nelle fasi iniziali della patologia (126)(127) ma tende a peggiorare progressivamente con l’avanzamento della malattia (128), ergo l'indice di gittata sistolica e la frazione di contrazione miocardica (rapporto ottenuto da volume di eiezione e massa miocardica) sono effettivamente il migliore marker diagnostico: la frazione di contrazione miocardica ha mostrato una sensibilità del 56% e una specificità del 96% con valori $\leq 0,234$ e un'accuratezza diagnostica con una AUC di 0,8(129).

Anche le velocità di movimento di parete sistolica di picco longitudinale sono un marker precoce di AC (126).

Inoltre, la disfunzione diastolica ha altresì un ruolo cruciale nel porre sospetto di cardiomiopatia amiloidotica. Essa generalmente si presenta come un alterato rilasciamento, il quale progredisce verso un più significativo pattern restrittivo mano a mano che la deposizione di amiloide incrementa (130), tanto che un rapporto $E/E' > 9,6$ presenta una sensibilità del 50% ed una specificità del 100% nel porre diagnosi di cardiomiopatia amiloidotica.

L’analisi dello strain miocardico, valutata mediante l’impiego del Doppler tissutale, e lo speckle-tracking ecocardiografico hanno acquisito un ruolo cruciale come marcatori clinici della amiloidosi cardiaca: la presenza di un gradiente di deformazione longitudinale definente il così detto “apical sparing”, o risparmio dei segmenti apicali dalla compromissione funzionale, che invece coinvolge le regioni medio-basali (con la formazione del caratteristico bulls-eye) permette di orientarsi in maniera molto marcata verso la diagnosi di amiloidosi cardiaca (131)(132).

Ad oggi non sono conosciute le basi fisiopatologiche di questo fenomeno, sebbene via siano talune teorie che lo descrivano come conseguenza di un diverso pattern

di deposizione dell' amiloide, od ancora conseguenza di un diverso orientamento delle fibre miocardiche tra segmenti apicali e non apicali. Ulteriore teoria suggerisce che la base fisiopatologica dell'apical sparing sia la diversa propensione al rimodellamento cardiaco (dovuta alla maggiore turbolenza del flusso con conseguente maggiore stress parietale) nelle varie regioni del cuore stesso (133). L'apical sparing ha un sensibilità dell'87% ed una specificità del 72% nella diagnosi di ATTR-AC con AUC di 0,85 (129).

Infine si possono trovare alcune differenze tra le diverse forme di AC: AL-AC mostra solo un lieve incremento dello spessore di parete ventricolare con uno squilibrio emodinamico più importante rispetto alla ATTR-AC.

1.9.4 Risonanza magnetica cardiaca (RMC)

La risonanza magnetica cardiaca è emersa nell'ultimo decennio come una cruciale tecnica di imaging, in grado di fornire dati strutturali e funzionali grazie alla formazione di immagini 3D ad altissima risoluzione del tessuto cardiaco e della sua composizione

Per esempio, grazie all'impiego della RMC è stato possibile sfatare il mito per cui si riteneva l'amiloidosi cardiaca come una patologia caratterizzata da una ipertrofia simmetrica concentrica, dimostrando come la cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina ha più spesso un'ipertrofia sinistra asimmetrica, quasi nel 79 dei casi (134). Questo pattern asimmetrico può essere ulteriormente suddiviso in due sottotipi morfologici: quello del "setto sigmoideo" (nel 55% di ATTR-AC) e del "contorno settale inverso" (24% di ATTR-AC) senza significative differenze morfologiche tra forme mutate e forme wild-type.

D'altro canto, diversi studi impieganti risonanza magnetica cardiaca hanno dimostrato la presenza di una ipertrofia simmetrica in quasi il 68% dei pazienti con amiloidosi cardiaca da catene leggere (134). Questa considerazione circa l'ipertrofia ventricolare, talora simmetrica e talora asimmetrica, è tutt'altro che marginale, in quanto è spesso causa di errata diagnostica differenziale tra amiloidosi cardiaca con altre forme di left ventricular hypertrophy.

Ancor di maggior rilievo è il fatto che la RMC possa caratterizzare il tessuto miocardico sia sulla base delle sue proprietà magnetiche intrinseche (T1, T2 e T2*) sia mediante l'uso di agenti di contrasto a base di gadolinio, descrivendo il late gadolinium enhancement (LGE). Inoltre è possibile impiegare la metodica di imaging contrast-enhanced con sequenze pesate in T1 per il calcolo del volume extracellulare (ECV) (135).

Nel tessuto miocardico normale, i cardiomiociti sono densamente stipati e circa l'85% del volume miocardico è formato da liquido intracellulare; quando lo spazio extracellulare si espande, come nell'amiloidosi cardiaca, a seguito del deposito di fibrille di amiloide, si verifica un incremento delle concentrazioni di gadolinio nel miocardio e, quindi, hyper-enhancement (136).

Quindi l'imaging LGE risulta essere talora patognomonico nell'ambito dell'amiloidosi cardiaca, avendo per essa una elevatissima accuratezza diagnostica (137)(138).

Nella fase iniziale il LGE presenta un pattern subendocardico diffuso che evolve in trasmurale negli stadi successivi (138); questo pattern caratteristico risulta essere coerente con la cinetica anormale del gadolinio nel miocardio, in base alla soppressione del segnale del sangue od alla soppressione del segnale del miocardio (139).

Nell'imaging LGE tradizionale l'operatore sceglie il null inversion time (tempo di inversione della soppressione) in funzione di ciò che è considerato miocardio normale. L'accuratezza nella scelta del null inversion time dipende dall'esperienza dell'operatore, dalla clearance del gadolinio e dalla compliance del paziente per quanto concerne l'esecuzione di acquisizioni in apnea (140); tutti questi parametri possono essere estremamente variabili nella pratica clinica.

Inoltre, l'infiltrazione amiloide spesso è diffusa, quindi le aree del miocardio normale (utili per il confronto) possono talora essere molto esigue, tanto che l'operatore può arrivare a sopprimere l'informazione proveniente dal miocardio patologico, perdendo così la determinazione dell'infiltrazione globale (141).

La phase-sensitive inversion recovery o PSIR è una tecnica di ricostruzione dell'immagine di late gadolinium enhancement, che risulta essere meno

dipendente dalla scelta del punto di soppressione da parte dell'operatore e sembrerebbe quindi essere più accurata nel determinare l'entità del coinvolgimento cardiaco(140), riducendo anche la variabilità correlata all'operatore.

Riferendosi ai pattern LGE, se ne possono elencare 3 nell'ambito di pazienti con amiloidosi cardiaca: nessun LGE, LGE subendocardico e LGE transmurale (141).

L'imaging LGE ha tuttavia alcune limitazioni, la più importante di queste è la presenza di una compromissione renale, la quale è forte controindicazione all'impiego di agenti a base di gadolinio (142)(143).

La mappatura T1 o T1-mapping è una metodica di risonanza magnetica che può venire impiegata per misurare quantitativamente la progressione dell'infiltrazione amiloide a livello cardiaco, a partire da una infiltrazione precoce sino ad un massiccio coinvolgimento transmurale diffuso; il tutto senza l'uso del LGE.

La mappatura T1, prima della somministrazione del mezzo di contrasto (144)(145), può essere utilizzata per misurare il segnale intrinseco proveniente dal miocardio, il quale è noto come miocardico nativo in T1.

La mappatura T1 può essere inoltre utilizzata per il calcolo del volume extracellulare miocardico nell'ambito della cardiomiopatia amiloidotica.

Difatti il miocardio nativo in T1 ed il volume extracellulare (ECV) sono entrambi elevati nei pazienti con amiloidosi cardiaca, sia essa AL-AC o ATTR-AC (146)(147) ed entrambi sono considerabili come affidabili indicatori di infiltrazione di amiloide a livello cardiaco (148)(149)(150); il loro valore correla con la gravità dell'infiltrazione miocardica, analizzata impiegando altresì tecniche come la scintigrafia miocardica con dell'acido 3,3-difosfono-1,2-propanodicarbossilico marcato con tecnezio 99 metastabile (99mTc-DPD) (149)(151).

È stato sviluppato un algoritmo clinico utilizzante il miocardico nativo in T1 per consentire la diagnosi di amiloidosi cardiaca senza la necessità di agenti di contrasto a base di gadolinio in un'ampia proporzione di pazienti con sospetta AC(152), inclusi pazienti con grave insufficienza renale.

Nonostante inizialmente si ritenessero uguali o simili sia nella AL-AC che nella ATTR-AC, si è osservato come il valore del miocardio nativo in T1 ed il valore dell'ECV fossero differenti nelle due tipologie, essendo solitamente più elevati nei pazienti con AL (153)(154).

Questa osservazione riflette probabilmente i differenti biologici forniti dal miocardio nativo in T1 e dell'ECV nativo: il primo misura il segnale miocardico composito proveniente dall'interstizio e dai cardiomiociti che sono stati potenzialmente influenzati da altri meccanismi fisiopatologici rispetto alla deposizione di amiloide, come ad esempio l'edema miocardico; il secondo prende in considerazione solamente il segnale proveniente dallo spazio extracellulare (ed infatti rappresenta un marcatore molto più affidabile circa la vera infiltrazione amiloide) (154).

Sia il miocardio nativo in T1 che l'ECV sono predittori di prognosi nei pazienti con AL-AC e ATTR-AC, ma solo l'ECV rimane un predittore indipendente di ATTR-AC dopo aver aggiustato per predittori noti.

La modifica dell'ECV in senso decrementale è anche il primo marker di regressione dell'amiloidosi cardiaca dopo il successo della terapia nei casi di AL(155). L'ECV è altresì elevato durante l'infiltrazione cardiaca precoce, ancor prima della presenza di un LGE o di test clinici convenzionali rilevanti un coinvolgimento cardiaco, quindi l'ECV può essere considerato un marker di malattia precoce (156).

Un'altra proprietà intrinseca del miocardio che può essere misurata con la RMC è la T2-high signal nelle sequenze di risonanza magnetica cardiaca pesate in T2, il quale è indicativo di edema miocardico, miocardite, infarto miocardico o sarcoidosi cardiaca.

Inoltre, il T2-high signal si è rivelato elevato anche nei pazienti con AL -AC (prima della chemioterapia) o nei pazienti con ATTR-AC (157).

Sebbene la RMC fornisca informazioni strutturali e funzionali e aiuti a caratterizzare il tessuto miocardico in modo sempre più meticoloso, nessuna tecnica di RMC può essere utilizzata per differenziare definitivamente, in un singolo paziente, tra amiloidosi cardiaca da catene leggere e cardiomiopatia amiloidotica correlata alla transtiretina.

Come noto i vasi miocardici possono essere infiltrati dall'amiloide, con conseguente alterazione della vasodilatazione, la quale può causare ischemia miocardica globale (158) producendo una riduzione della perfusione miocardica a riposo(159). Inoltre detta infiltrazione può contribuire ad aumentare i livelli di biomarcatori cardiaci come TnT, TnI, BNP o NT -proBNP. L'ultima caratteristica CMR che può essere utile nell'amiloidosi cardiaca è la possibilità di ottenere una mappatura del flusso sanguigno miocardico che possa essere completamente automatizzata (160).

1.9.5 Scintigrafia ossea con radionuclidi

I primi studi di imaging nucleare impieganti traccianti osteoavidi nell'ambito dell'amiloidosi cardiaca vennero condotti negli anni '80(161), ma solo all'inizio degli anni 2000 Puille e colleghi descrissero il potenziale uso della scintigrafia ossea per identificare i depositi di amiloide nel contesto della ATTR-AC (162).

La quantificazione dell'intensità di assorbimento dei radio-traccianti riveste un ruolo cruciale nella diagnosi di ATTR-AC e può essere interpretata mediante analisi visiva semiquantitativa, classificando l'assorbimento miocardico in relazione all'assorbimento costale a livello di immagini di tomografia computerizzata a emissione di fotoni (SPECT) planari o a singolo fotone.

Inoltre è possibile quantificare l'assorbimento del radiofarmaco osteotropo a livello cardiaco impiegando il rapporto cuore-polmone controlaterale (H/CL) (163).

Gli attuali criteri diagnostici per i pazienti con ATTR-AC includono una captazione miocardica uguale o maggiore di quella ossea (coste), descrivibile con approccio semiquantitativo, od un rapporto H/CL $\geq 1,5$ (essendo valori $\geq 1,6$ associati a scarsa sopravvivenza) (164).

Un sistema di classificazione della amiloidosi cardiaca mediante l'impiego di scintigrafia con traccianti osteotropi è stata elaborata da Perugini e colleghi: sulla base di una valutazione dell'immagine planare tardiva (3h), è possibile produrre un punteggio in relazione alla captazione cardiaca analizzabile con approccio semiquantitativo. Il valore Perugini 0 indica assenza di captazione cardiaca, il valore Perugini 1 corrisponde a captazione cardiaca inferiore rispetto a quella

ossea, il valore Perugini 2 indica una captazione cardiaca superiore rispetto a quella ossea ma con la concomitante presenza di captazione ossea ed infine il valore Perugini 3 corrisponde ad un quadro di sostanziale e robusta captazione cardiaca con debole od assente segnale osseo (165).

La scintigrafia con traccianti osteoavidivi è ad oggi metodica impiegata nella pratica clinica, ed ha dimostrato di essere sufficientemente sensibile per diagnosticare un quadro di cardiomiopatia amiloidotica correlata a transtiretina in fase precoce, anche prima dello sviluppo di segni ecocardiografici ed osservabili alla risonanza magnetica cardiaca (166).

Diversi traccianti ossei, tra cui 99mTc-pirofosfato (99mTc-PYP)(164)(167)(168), 99mTc-idrossimetilene difosfonato (99mTc-HMDP)(168)(169) e 99mTc-DPD (99mTc-acido 3,3-difosfono-1,2-propanodicarbossilico)(162)(165)(166) sono stati impiegati nella diagnostica dell'amiloidosi cardiaca con prestazioni diagnostiche equiparabili (170).

Non tutti i traccianti ossei sembrerebbero adatti per la diagnosi di amiloidosi cardiaca; ad esempio talune voci di letteratura affermano come il 99mTc-metilene difosfonato sia inappropriato a causa della bassa sensibilità(170). Il motivo per cui diversi radiofarmaci osteotropi sono oggetto di una captazione miocardica è ad oggi oggetto di dibattito, taluni lo attribuiscono alla presenza di microcalcificazioni nel tessuto cardiaco infiltrato, più comuni in ATTR-AC che in AL-AC (171)(172).

Tuttavia, indipendentemente dalla tecnica utilizzata, una scintigrafia ossea con un Perugini di grado 2 o 3 ha mostrato una sensibilità >99% e una specificità dell'82-86% per ATTR-AC (173) (In figura 4).

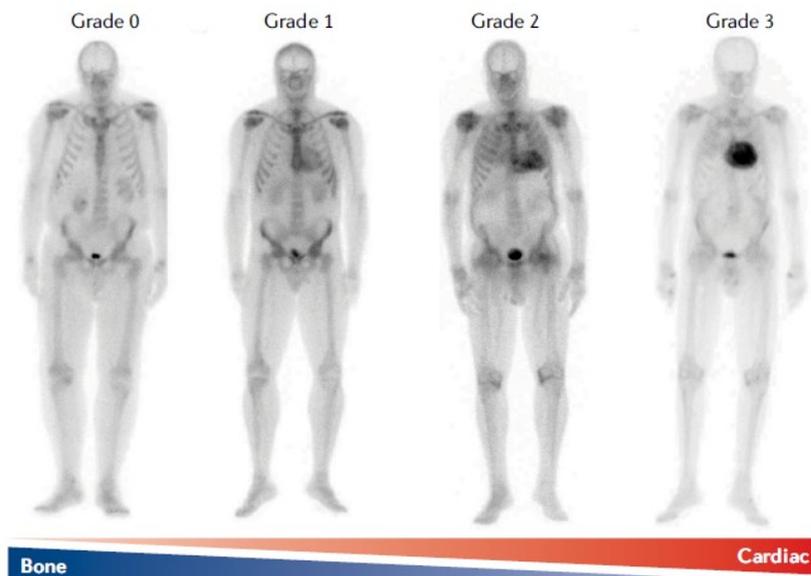


Figura 4: panoramica visiva dello score di Perugini riguardo l'assorbimento cardiaco alla scintigrafia ^{99m}Tc -DPD. Il grado 0 rappresenta l'assenza di captazione cardiaca, il grado 1 rappresenta una captazione cardiaca lieve (inferiore a quella ossea), il grado 2 rappresenta una captazione cardiaca maggiore di quella ossea (ma la captazione ossea rimane ancora visibile) e il grado 3 rappresenta una captazione cardiaca sostanziale con solo una debole captazione o nessun segnale evidente nell'osso. DPD, acido 3,3-difosfono-1,2-propanodicarbossilico(174).

In caso di test urine negativo e siero negativo per amiloidosi AL, la specificità del suddetto test aumenta fino al 100%. È opportuno altresì ricordare che un lieve assorbimento di amiloide (grado 1) può essere descritto anche in pazienti con sottotipi di amiloidosi cardiaca quali quella conseguente alla proteina siero amiloide A ed all'apoA1(175).

Cionondimeno, in letteratura sono state evidenziate delle eccezioni a quanto detto, come accade con la ATTRv Ser77Tyr, nella quale, a fronte di un Perugini nella scintigrafia con traccianti osteotropi, le caratteristiche cliniche, ecocardiografiche, elettrocardiografiche e di risonanza magnetica sono coerenti con la diagnosi di amiloidosi cardiaca(176).

Ser77Tyr non è l'unica variante associata a un assorbimento di inferiore del previsto; può verificarsi a livello di ATTRv con rare mutazioni, in cui i depositi di amiloide sono costituiti principalmente da transtiretina full length: in queste forme v'è un assorbimento cardiaco nullo o minimo di traccianti osteotropi. I possibili falsi positivi e falsi negativi della scintigrafia con bifosfonati sono riassunti nella figura 5.

	Situation	How to suspect and confirm?
False positive	AL amyloidosis	Abnormal SPIE, UPIE or serum free light ratio. Requires histologic confirmation.
	Hydroxychloroquine cardiac toxicity	Interrogation. Requires histologic confirmation.
	AApoAI and AApoAll amyloidosis	Concomitant kidney disease present. Genetic testing.
	ApoAIV amyloidosis	Concomitant kidney disease present. Requires histologic confirmation.
	Aβ2M amyloidosis	Long-term dialysis (>9 years). Requires histologic confirmation.
	Blood pool	Cardiac dysfunction could be present. Use SPECT to detect uptake in myocardium. Delay acquisition.
	Rib fractures, valvular/annular calcifications	Use SPECT to detect uptake in myocardium.
	Recent myocardial infarction (<4 weeks)	Interrogation. Use SPECT to detect diffuse uptake in myocardium.
False negative	Phe84Leu ATTRv, Ser97Tyr ATTRv	Concomitant neuropathy. Familial disease. Genetic testing.
	Very mild disease	Requires histologic confirmation.
	Delayed acquisition	Shorter acquisition time interval.
	Premature acquisition	Prolong acquisition time interval.

Figura 5: possibili falsi positivi e falsi negativi alla scintigrafia ossea nella diagnosi di ATTR-AC (178)

Inoltre, la valutazione quantitativa dell'assorbimento del radiofarmaco fornisce informazioni prognostiche associate a eventi cardiovascolari maggiori, scompenso cardiaco acuto ed aumento della mortalità(177)(166)(167).

Il 99mTc-PYP è più comunemente utilizzato negli Stati Uniti, il 99mTc-HMDP è più comunemente utilizzato in Francia e 99mTc-DPD è più comunemente utilizzato in altri paesi, tra cui Italia e Regno Unito(164).

1.9.6 Tomografia a emissione di positroni (PET)

La tomografia a emissione di positroni sta emergendo come importante esame diagnostico per l'amiloidosi cardiaca.

Alcuni traccianti PET come 18F-florbetapir, 18F-florbetaben, 18F-flutemetamol e 11C-Pittsburgh B (11C-PiB), sono stati utilizzati con successo per diagnosticare l'amiloidosi cardiaca(179).

Questi traccianti, data la loro capacità di legarsi alle placche di β-amiloidi cerebrali, sono comunemente impiegati per la diagnosi ed il follow-up dei pazienti con malattia di Alzheimer; tuttavia, grazie alla loro capacità di legare la struttura a foglietto β delle fibrille amiloidi, essi possono essere facilmente utilizzati per identificare i depositi di amiloide, indipendentemente da quale sia la proteina precursore da cui originano. Inoltre la metodica PET permette una analisi quantitativa, consentendo di misurare il carico della malattia in modo molto preciso.

Alcuni studi in letteratura hanno dimostrato che il ^{18}F -florbetapir viene assorbito dal cuore dei pazienti con amiloidosi cardiaca, senza alcun assorbimento nei controlli sani. Inoltre, l'indice di ritenzione miocardica del tracciante sembrerebbe essere più elevato nei pazienti con AL-AC rispetto a ATTR-AC (180)(181). Risultati simili sono stati osservati con ^{11}C -PiB(182)(183) e ^{18}F -florbetaben(184).

La ritenzione miocardica rilevata era maggiore in pazienti AL-AC o ATTR-AC rispetto ai controlli ed era correlata con modifiche dello strain longitudinale di parete libera, sia del ventricolo sinistro e del ventricolo destro.

Tuttavia, a causa della loro breve emivita di 20 min, è necessario un ciclotrone in loco per la produzione di traccianti marcati con ^{11}C .

L'emivita più lunga dei traccianti marcati con ^{18}F (110 min) determina una più facile distribuzione ed ergo un più facile impiego di questi per la ricerca e per le applicazioni cliniche.

Naturalmente questi agenti (che hanno la capacità di quantificare in modo assoluto il carico di amiloide) possono essere in grado di rilevare la malattia precoce, ma al momento mancano dati solidi.

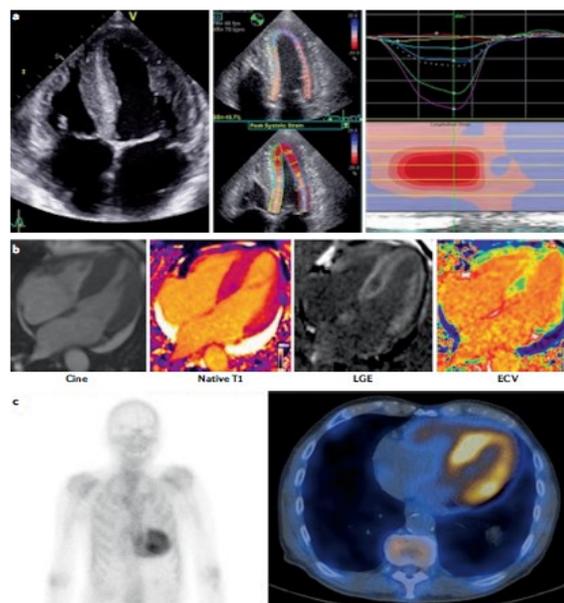


Figura 6:work-up multidisciplinare di un paziente con cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina. a | Tipico ecocardiogramma a quattro camere (sinistra) e con pattern di strain (centro e destra) caratteristici di un processo infiltrativo. b | Immagine a quattro camere, stato stazionario, a precessione libera (a sinistra) corrispondente a un mapping T1 nativo a quattro camere (centro a sinistra). La corrispondente immagine di late gadolinium enhancement (LGE) (al centro a destra) mostra l'LGE transmurale e la corrispondente mappa del volume extracellulare (ECV) (a destra) mostra valori elevati. c | L'immagine scintigrafica dell'acido $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -3,3-difosfono-1,2-propanodicarbossilico di tutto il corpo (a sinistra) e l'immagine PET-TC (a destra) mostrano un assorbimento cardiaco anormale di grado 2 Perugini. (174)

1.10 Percorso diagnostico

Il mancato riconoscimento di questa entità nosologica, la presenza di sintomi non specifici di cardiomiopatia amiloidotica e la concomitante sussistenza di comorbidità sono spesso causa di una diagnosi ritardata, con conseguente progressione della malattia (185).

Uno studio descrittivo ha difatti riportato come fino al 35% dei pazienti con amiloidosi cardiaca considerati aveva ricevuto una precedente diagnosi (erronea) per altre malattie cardiovascolari, quali la cardiopatia ipertensiva, la cardiomiopatia ipertrofica (HCM), la cardiopatia ischemica, la stenosi aortica e lo scompenso cardiaco a ridotta frazione di eiezione.

Come già accennato l'intolleranza all'esercizio fisico è il sintomo più comune, riportato dall'80% dei pazienti alla prima valutazione clinica; altri sintomi frequentemente accusati dai pazienti sono dispnea da sforzo, edema periferico, parestesie, calo ponderale, porpora, disgeusia, xerostomia e macroglossia.

L'amiloidosi cardiaca può essere diagnosticata in modo invasivo o non invasivo: i criteri di diagnosi invasiva possono essere applicati a tutte le forme, i criteri di diagnosi non invasivi possono essere applicati solo alla forma da transtiretina (In figura 7).

Diagnosis of Cardiac Amyloidosis

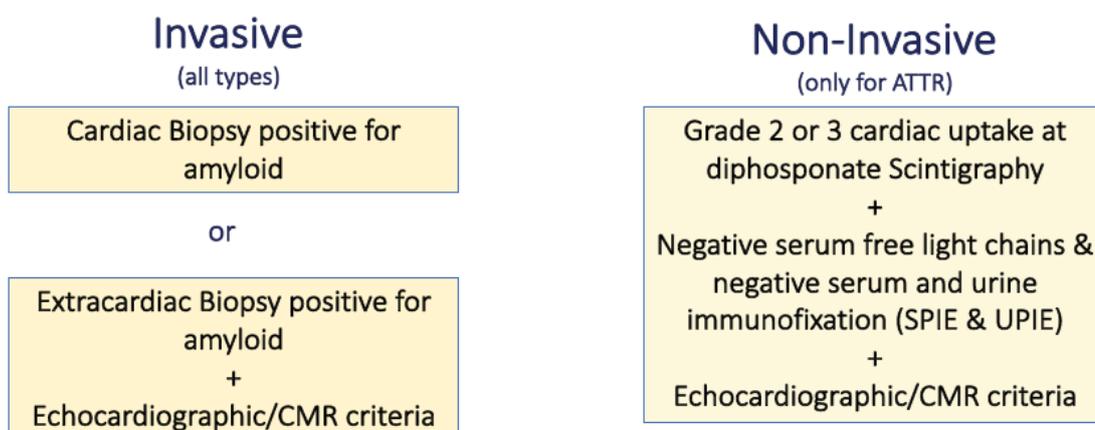


Figura 7: diagnosi invasiva e non invasiva di amiloidosi cardiaca(178).

Il gold standard per la diagnosi di l'amiloidosi cardiaca rimane la biopsia endomiocardica dimostrante la presenza di depositi di amiloide positivi alla

colorazione rosso Congo (in alternativa possono essere impiegati anche tioflavina T o blu di alcian solfato). Una volta dimostrata la presenza di fibrille amiloidi, queste dovrebbero essere tipizzate: la tecnica di riferimento in questo frangente è la microdissezione laser seguita dall'analisi proteomica (basata sulla spettrometria di massa) che ha un'elevata sensibilità e specificità(186)(187), in quanto richiede pochissimo tessuto e identifica inequivocabilmente tutte le tipologie di amiloide in un unico, semplice test. Metodi di tipizzazione alternativi includono analisi basate sull'interazione antigene-anticorpo, come l'immunofluorescenza od ancora l'immunoistochimica (188)(189). Tuttavia queste presentano talune limitazioni in termini di sensibilità e specificità (dovute in parte alla reattività crociata con immunoglobuline depositate).

La diagnosi di amiloidosi cardiaca può altresì essere posta se si riscontrano istologicamente depositi di amiloide all'interno di una biopsia extracardiaca, e concomitantemente vi sono caratteristiche di RMC o ecocardiografiche compatibili con cardiomiopatia di accumulo; per fare questo tipo di diagnosi è tuttavia necessario aver escluso cause alternative di aumento di spessore parietale nel ventricolo sinistro (riassunto in figura 8).

Echocardiography

Unexplained LV thickness (≥ 12 mm) plus 1 or 2:

1. Characteristic echocardiography findings (≥ 2 of a, b, and c have to be present):
 - a. Grade 2 or worse diastolic dysfunction
 - b. Reduced tissue Doppler s' , e' , and a' waves velocities (< 5 cm/s)
 - c. Decreased global longitudinal LV strain (absolute value $< -15\%$).

2. Multiparametric echocardiographic score ≥ 8 points:
 - a. Relative LV wall thickness $(IVS+PWT)/LVEDD > 0.6$
3 points
 - b. Doppler E wave/ e' wave velocities > 11
1 point
 - c. TAPSE ≤ 19 mm
2 points
 - d. LV global longitudinal strain absolute value $\leq -13\%$
1 point
 - e. Systolic longitudinal strain apex to base ratio > 2.9
3 points

CMR

Characteristic CMR findings (a and b have to be present):

- a. Diffuse subendocardial or transmural LGE
- b. Abnormal gadolinium kinetics^a
- c. ECV $\geq 0.40\%$ (strongly supportive, but not essential/diagnostic)

Figura 8: criteri ecocardiografici e di risonanza magnetica cardiaca per la diagnosi non invasiva e invasiva dell'amiloidosi cardiaca.(178)

Data l'intrinseca complessità della patologia, una possibile strategia da adottare nell'iter diagnostico è quella di un approccio graduale composto da due fasi critiche: fase di *sospetta* amiloidosi cardiaca e fase di diagnosi *definitiva* di amiloidosi cardiaca (che include la tipizzazione dell'amiloide stessa). Inizialmente, ciò che è fondamentale ai fini della diagnosi è ricercare segni e sintomi extracardiaci tipici dell'amiloidosi sistemica, anche definite nella letteratura anglosassone come "red flags". Queste "red flags" includono proteinuria, polineuropatia, macroglossia, rottura del tendine bicipitale, sindrome del tunnel carpale e molti altri riassunti nella figura 9.

Type	Red flag	Amyloidosis where it is most frequently found		
Extracardiac	Clinical	Polyneuropathy	ATTRx, AL, AA, AGel	
		Dysautonomia	ATTR, AL	
		Skin bruising	AL	
		Skin discoloration	AApoAl	
		Cutis laxa	AGel	
		Macroglossia	AL	
		Deafness	ATTRwt	
		Bilateral carpal tunnel syndrome	ATTRx, ATTRwt	
		Ruptured biceps tendon	ATTRwt	
		Lumbar spinal stenosis	ATTRwt	
		Vitreous deposits	ATTRx	
		Corneal lattice dystrophy	AGel	
		Family history	ATTRx, AApoAl, AApoAlI	
		Laboratory	Renal insufficiency	AL, AA, AApoAl, AApoAlI, AApoAlV, A[2M, AFb
			Proteinuria	AL, AA, AApoAl, AApoAlI, AFb
Cardiac	Clinical	Hypotension or normotensive if previous hypertensive	ATTR, AL	
		Pseudoinfarct pattern	AlI	
	ECG	Low/decreased QRS voltage to degree of LV thickness	AlI	
		AV conduction disease	AlI	
		Laboratory	Disproportionally elevated NT-proBNP to degree of HF	AlI
	Persisting elevated troponin levels		ATTR, AL	
	Echocardiogram	Granular sparkling of myocardium	AlI	
		Increased right ventricular wall thickness	AlI	
		Increased valve thickness	AlI	
		Pericardial effusion	AlI	
		Reduced longitudinal strain with apical sparing pattern	AlI	
	CMR	Subendocardial late gadolinium enhancement	AlI	
		Elevated native T1 values	AlI	
		Increased extracellular volume	AlI	
		Abnormal gadolinium kinetics	AlI	

Figura 9: manifestazioni cardiache ed extracardiache potenzialmente associabili alla presenza di amiloidosi cardiaca (178)

Esistono chiaramente alcuni aspetti, a livello cardiaco, che possono suggerire la presenza di una amiloidosi cardiaca. Uno di questi è la presenza di una insufficienza cardiaca in cui i livelli di N-term pro-peptide natriuretico cerebrale sono sproporzionatamente elevati rispetto ai reperti ecocardiografici. Altro di questi aspetti è la presenza di uno scompenso cardiaco destro con concomitante "normale" funzione ventricolare, od ancora la presenza di un versamento pericardico idiopatico. Anche un aumento persistente delle troponine, un voltaggio QRS sproporzionatamente basso o una malattia del sistema di conduzione precoce sono segni che potrebbero suggerire la presenza di l'amiloidosi cardiaca. Segni e sintomi di scompenso cardiaco sono spesso la prima manifestazione di amiloidosi cardiaca, ma di solito compaiono in stadi più avanzati della malattia.

In conclusione, la presenza di uno spessore di parete ventricolare superiore ai dodici millimetri, in un ventricolo sinistro privo di dilatazione, alla valutazione ecocardiografica, in paziente con riduzione dei voltaggi elettrocardiografici ed anamnesi positiva per “red flags”, l'amiloidosi cardiaca dovrebbe essere sospettata e ciò dovrebbe portare ad ulteriori valutazioni. Altri elementi anamnestici da considerare sono riassunti in figura 10.

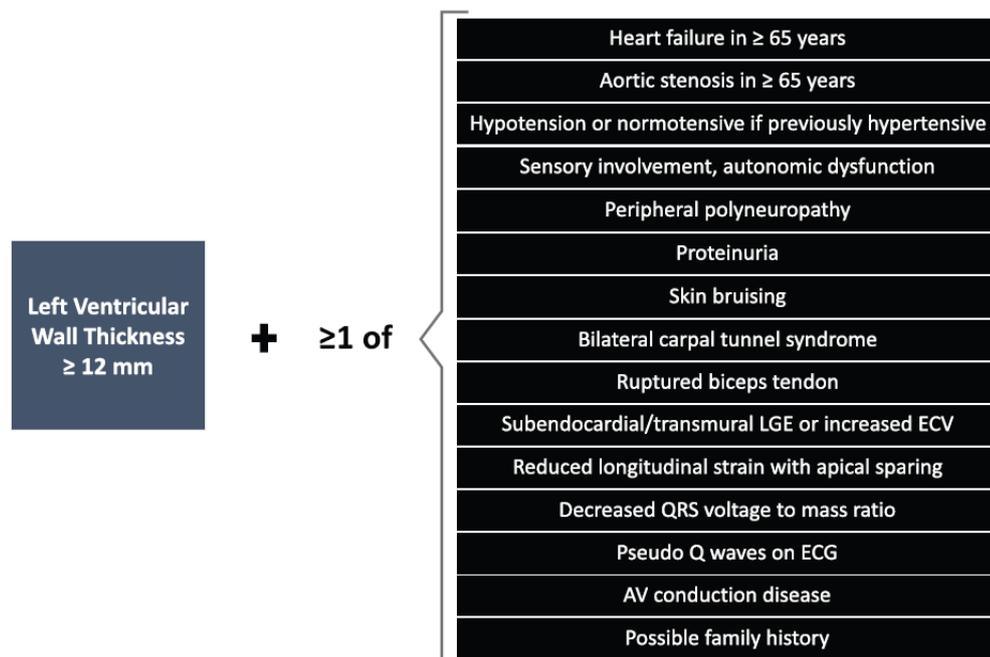


Figura 10: aspetti clinici sospetti che richiedono, in presenza di una LVWT superiore ai 12 mm, ulteriori valutazioni per considerare la diagnosi di amiloidosi cardiaca. (178)

Una volta maturato il sospetto di amiloidosi cardiaca è necessario confermare la diagnosi impiegando i differenti strumenti a disposizione, sia invasivi che non invasivi. Considerando che, dal punto di vista epidemiologico, le due forme più frequenti di amiloidosi cardiaca sono l'AL-AC e la ATTR-AC, i risultati degli esami di secondo livello definiscono a quattro differenti scenari (riassunti nella figura di fine paragrafo):

(1) La scintigrafia non mostra captazione cardiaca (Perugini 0) e le valutazioni per le proteine monoclonali sono negative. C'è una probabilità molto bassa di amiloidosi, sia essa AL-AC o ATTR-AC. Dovrebbe essere presa in considerazione una diagnosi alternativa. Tuttavia, se il sospetto persistesse, si può considerare l'esecuzione di una risonanza magnetica cardiaca. In secondo luogo, può essere performata una biopsia cardiaca od extracardiaca; è possibile che la scintigrafia

ossea sia negativa in quanto l'assorbimento del tracciante dipende dalla composizione della fibrilla di transtiretina ed in alcune forme di ATTRv si ha scintigrafia negativa.

(2) La scintigrafia mostra captazione cardiaca del tracciante osteotropo e le valutazioni per le proteine monoclonali sono negative. Se la captazione cardiaca è Perugini 2 o 3, è possibile diagnosticare amiloidosi cardiaca ATTR ed eseguire test genetici per escludere quadri di mutazione. I test genetici permettono di differenziare le forme ATTRv e ATTRwt. Nel caso in cui la captazione cardiaca sia di Grado 1, non è possibile una diagnosi non invasiva ed è necessaria la conferma istologica dei depositi di amiloide, i quali potrebbero essere solo extracardiaci.

(3) La scintigrafia non mostra captazione cardiaca (Perugini 0), tuttavia almeno uno dei test per la ricerca di proteine monoclonali è anormale. In questo frangente il sospetto di amiloidosi AL aumenta in maniera significativa e la risonanza magnetica cardiaca deve essere eseguita per confermare il coinvolgimento cardiaco. Se la risonanza magnetica fosse negativa, la diagnosi di amiloidosi è in questo caso molto improbabile. Nel caso in cui i risultati della RMC supportino la diagnosi di amiloidosi AL, la diagnosi definitiva si ha con la dimostrazione istologica cardiaca o extracardiaca di depositi di amiloide. In questo contesto, è fondamentale la cooperazione con specialisti in Ematologia. Se la CMR non può essere eseguita tempestivamente si può direttamente performare una biopsia.

(4) La scintigrafia mostra captazione cardiaca e almeno uno dei test delle proteine monoclonali è anormale. In questo scenario sono possibili diverse condizioni: coesistenza di amiloidosi AL e ATTR, sola amiloidosi AL od amiloidosi ATTR con concomitante MGUS (gammopatia monoclonale di significato incerto). La diagnosi definitiva di amiloidosi cardiaca, anche in questo caso, richiede una biopsia endomiocardica per la ricerca di fibrille amiloidi e loro eventuale tipizzazione.

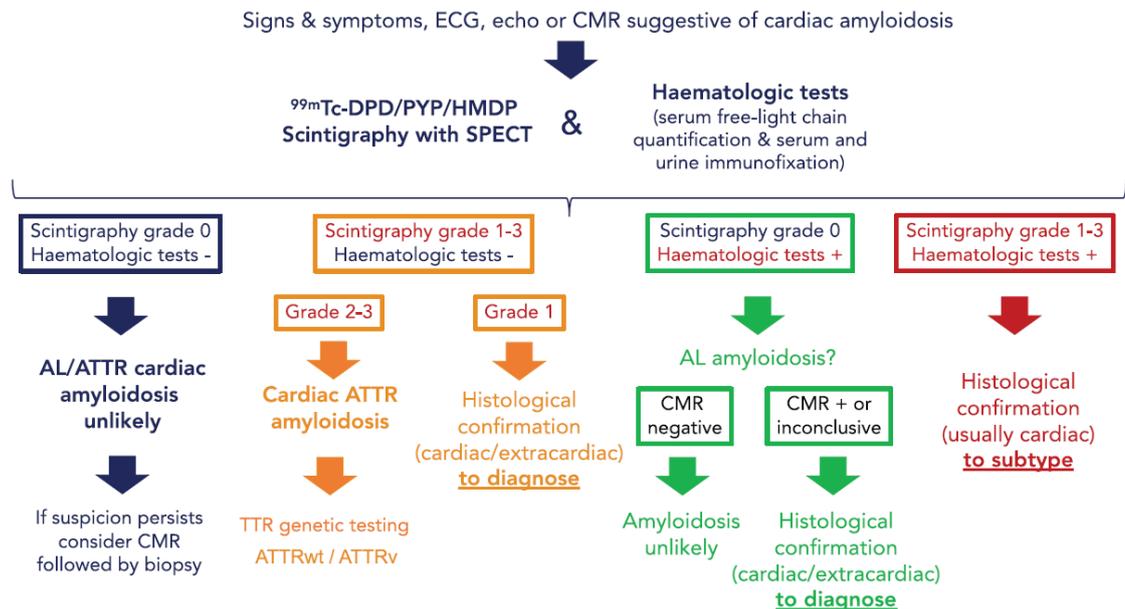


Figura 11: algoritmo diagnostico per amiloidosi cardiaca(178).

1.11 Prognosi dell'Amiloidosi Cardiaca

La prognosi dell'amiloidosi AL dipende dai 2 aspetti fondamentali della malattia: il coinvolgimento cardiaco e le caratteristiche del clone plasmacellulare responsabile della produzione anomala di immunoglobuline. Il grado di coinvolgimento della struttura cardiaca è il predittore più importante per la sopravvivenza a breve (190) ed a lungo termine (191). I principali aspetti contraddistinguenti clone plasmacellulare hanno un maggiore impatto per la sopravvivenza a lungo termine (191)(192).

I biomarcatori cardiaci solubili sono alla base della stadiazione cardiaca. Considerato il profondissimo impatto che il coinvolgimento cardiaco possiede sulla sopravvivenza, l'impiego di biomarcatori cardiaci per la stadiazione della amiloidosi cardiaca risulta essere estremamente specifico, ed allo stesso tempo la determinazione di questi biomarcatori ha un costo relativamente basso ed è facilmente eseguibile, oltre che ben riproducibile. L'unico grande svantaggio può dipendere dal fatto che una concomitante insufficienza renale cronica possa determinare alterazione dei parametri di laboratorio.

Il primo modello di stadiazione dell'amiloidosi cardiaca è stato il Mayo Model del 2004, che impiegava TnT e NT-proBNP per la definizione di 3 diversi stadi di

patologia (193). Lo stadio 3 è stato successivamente suddiviso, mediante una modifica europea, in 2 sotto-stadi chiamati rispettivamente 3a e 3b, impiegando un cutoff più elevato di NT-proBNP. Questo nuovo modello ha permesso di identificare meglio i pazienti ad alto rischio di decesso e di essere più preciso nei pazienti con basso eGFR e aritmie atriali (194) (195)(196).

Il livello di immunoglobuline sieriche è prognostico (197)(198)(199) ed in virtù di ciò è stato incorporato nel sistema di stadiazione Mayo del 2012 (197) (successivamente è stato fornito, nel 2017, uno strumento di conversione tra TnT e TnT ad alta sensibilità).

	Troponina T (µg/L)	NT-proBNP (ng/L)	Altro	Stadi	Hazard ratio di decesso
Modello Mayo del 2004 (con revisione europea del 2015)	≥0.035	≥332	Stage 3: NT-proBNP >8500 ng/L		
				1	Reference
				2	2.5 (1.9-3.5)
				3	4.9 (3.6-6.8)
				3b	11.1 (8.1-15.4)
Modello Mayo revisionato del 2012	≥0.025	≥1800	dFLC ≥180 mg/L		
				1 ^b	Reference
				2	1.7 (1.2-2.3)
				3	4.1 (3.1-5.5)
				4	6.3 (4.8-8.3)

Tabella I: sistema di stadiazione dell'amiloidosi cardiaca. Nello stadio 1 non è presente alcun fattore di rischio, nello stadio 2 è presente un fattore di rischio, nello stadio 3 sono presenti due fattori di rischio. Se presente, lo stadio 4 indica la presenza di tutti i fattori di rischio.

	Troponina T (µg/L)	Troponina I (µg/L)	Troponina T ad alta sensibilità (ng/L)	NT-proBNP (ng/L)	BNP (ng/L)
Modello Mayo del 2004 (con revisione europea del 2015)	≥0.035	≥0.1	≥50	≥332	≥81
				≥8500	≥700
Modello Mayo revisionato del 2012	≥0.025	≥0.07	≥40	≥1800	≥400

Tabella II: tabella di conversione dei valori di TnT, TnI, e TnT ad alta sensibilità

Anche parametri ecocardiografici come la frazione di eiezione, lo strain longitudinale del ventricolo sinistro e l'indice di gittata sistolica hanno un ruolo prognostico, tuttavia sono chiaramente limitati dalle competenze dell'operatore e

dai protocolli di imaging che possono variare da nosocomio a nosocomio (200)(201).

Si sono sviluppati inoltre sistemi di stadiazione per la amiloidosi cardiaca da transtiretina. Questi sistemi di stadiazione sono stati prodotti mediante l'impiego di parametri ottenuti alla presentazione e garantiscono una buona stratificazione prognostica iniziale. Cionondimeno, non si hanno ancora dati circa l'eventuale impatto prognostico di una modifica di questi parametri durante il follow up dei pazienti.

Grogan et al. (Mayo)(200)		Gillmore et al (NAC)(202)		Cheng et al. (Columbia)(120)(203)	
ATTRwt		ATTRv and ATTRwt		ATTRv and ATTRwt	
Parametri di stadiazione Troponin T > 0.05 ng/mL NT-proBNP > 3000 pg/mL		Parametri di stadiazione: eGFR < 45 mL/min/1.73 m ² NT-proBNP > 3000 pg/mL		Parametri del punteggio: Punteggio Mayo o NAC (0–2 points) Dose giornaliera di furosemide od equivalente: 0mg/kg (0 punti), >0–0.5 mg/kg (1 punto), >0.5–1 mg/kg (2 punti), and > 1 mg/kg (3 punti) Classe NYHA I-IV (1 to 4 punti)	
Stadio	Sopravvivenza a 4 anni/sopravvivenza mediana	Stadio	Sopravvivenza mediana	Punteggio	Sopravvivenza mediana
Stadio I (0 parametri)	57% 66 mesi	Stadio I (0 parametri)	69.2 mesi	Punteggio 1–3	90.5 mesi
Stadio II (1 parametro)	42% 40 mesi	Stadio II (1 parametro)	46.7 mesi	Punteggio 4–6	38.5 mesi (Mayo) 36 mesi (NAC)
Stadio III (2 parametri)	18% 20 mesi	Stadio III (2 parametri)	24.1 mesi	Punteggio 7–9	20.3 mesi(Mayo) 19.8 mesi(NAC)

Tabella III: sistemi di stadiazione per la amiloidosi cardiaca da transtiretina

1.12 Terapia dell'amiloidosi cardiaca

1.12.1 Terapie di supporto e delle complicazioni

1.12.1.1 Scompenso Cardiaco

Le misure igienico-dietetiche volte ad evitare la congestione sono particolarmente importanti nei pazienti con amiloidosi cardiaca che sviluppano in seguito un quadro di scompenso cardiaco. I pazienti devono essere informati sull'importanza del peso giornaliero, del mantenimento di una dieta iposodica (<2 g/die) e della restrizione idrica ($\leq 1,5$ l/die).

La prima linea di trattamento per il quadro di congestione conseguenza dello scompenso sono i diuretici dell'ansa, può essere in un primo momento impiegata la furosemide, ma in caso di risposta inadeguata torasemide o bumetanide offrono maggiore potenza e biodisponibilità. I diuretici dell'ansa possono poi essere

somministrati in combinazione con antagonisti del recettore dei mineralcorticoidi (a basse dosi) per evitare quadri di ipokaliemia. In caso di pazienti refrattari ai diuretici, l'uso di tiazidici deve essere considerato in aggiunta ai diuretici dell'ansa. La somministrazione ambulatoriale di diuretici per via endovenosa comporta una riduzione degli accessi al pronto soccorso e dei ricoveri ospedalieri senza un incremento dei casi di ipotensione sintomatica o di grave danno renale (204). Si è tuttavia osservata una forte associazione tra dose di diuretico impiegata e mortalità per ATTR-AC (203).

Naturalmente l'impiego dei diuretici, a prescindere dalla loro farmacodinamica, deve essere gestito con attenzione, in virtù del progressivo peggioramento cardiaco in termini di incremento delle pressioni di riempimento (raggiunte al fine di garantire buona gittata cardiaca). Inoltre, la presenza di una concomitante neuropatia autonoma può facilmente condurre a quadri di ipotensione e di ipo-perfusione, soprattutto renale. Le calze compressive, la midodrina e la droxidopa possono essere somministrate nei quadri di ipotensione sintomatica dovuta alle alterazioni neuroautonomiche od alla necessità di impiegare alte dosi di diuretici (205)(206).

Ad oggi non esistono evidenze di beneficio terapeutico conseguente all'impiego di farmaci per lo scompenso cardiaco a ridotta frazione di eiezione (come β -bloccanti ACE-i, ARB, ARNI o ivabradina) nell'amiloidosi cardiaca. Al contrario, l'uso di questi farmaci può impattare negativamente su un delicato equilibrio emodinamico nel quale le tachicardie compensatorie sono essenziali per garantire una sufficiente perfusione.

Pochi dati su detto argomento sono stati pubblicati, ma in un piccolo studio i β -bloccanti e gli ACE-i hanno dimostrato di peggiorare la prognosi in ATTRv, e di avere un effetto neutro nella prognosi di pazienti con ATTRwt (207).

In un'altra indagine nazionale italiana, la terapia con betabloccanti, in presenza di comorbilità per la quale è abitualmente utilizzata (come la fibrillazione atriale), è stata tollerata, ma solo in pazienti non presentanti disfunzione diastolica avanzata (208).

La sintomatologia nei pazienti con scompenso cardiaco progressivo può essere dovuta da una riduzione della riserva miocardica, la quale può essere stimata mediante test da sforzo o dall' ecocardiografia(209)(210).

Sulla scorta di quanto affermato circa l'ipo-perfusione come conseguenza di una riduzione del volume di eiezione, uno studio monocentrico francese ha analizzato l'effetto di inotropi in pazienti con amiloidosi cardiaca ricoverati in unità di terapia intensiva (ICU) per shock cardiogeno; lo studio ha riportato una mortalità più elevata in coloro che hanno ricevuto catecolamine (211); non è chiaro se questo rappresenti una relazione causale od alternativamente un bias di trattamento (in quanto i soggetti presentavano in ogni caso una patologia allo stadio terminale).

Per quanto concerne il trapianto cardiaco, negli ultimi anni si è registrato un incremento dei trapianti di cuore in pazienti con amiloidosi cardiaca ed un sostanziale aumento della sopravvivenza a lungo termine di detti pazienti, tale da eguagliare quella di pazienti non-amiloidotici (212)(213).

La presenza di cavità ventricolare ridotte nelle loro dimensioni è causa di difficile posizionamento della cannula di afflusso, oltre che di frequenti disfunzioni ventricolari e rischio maggiore di infezione, specialmente nei pazienti con amiloidosi AL. Tutti questi aspetti limitano l'impiego di una circolazione meccanica nei pazienti con amiloidosi cardiaca. In una case-series di 28 pazienti (10 dei quali affetti da amiloidosi cardiaca) si è registrata una sopravvivenza notevolmente più lunga in pazienti con cavità ventricolari sinistre maggiori (diastolico telediastolico >46 mm) (214)

Un altro studio monocentrico composto da 11 pazienti con amiloidosi cardiaca ha riportato come tutti avessero ricevuto supporto biventriolare (cuore artificiale totale o dispositivi di assistenza biventriolare) e come 4 di essi avessero ricevuto ECMO come terapia bridge verso la circolazione meccanica: entro il primo anno 9 di loro erano stati trapiantati e 2 erano morti (215).

I dati INTERMACS suggeriscono che i pazienti con amiloidosi cardiaca mostrano tassi più elevati di complicanze, tra cui sanguinamento gastrointestinale, disfunzione renale e disfunzione neurologica (216).

1.12.1.2 Fibrillazione Atriale

La fibrillazione atriale è la tachiaritmia sopra-ventricolare sostenuta ad attività elettrica completamente desincronizzata più frequente nei pazienti con amiloidosi cardiaca, con una prevalenza variabile dal 15% al 70%, arrivando ad avere valori molto elevati nella cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina (217)(218)(219)(220)(221). In virtù dell'elevata prevalenza molti autori suggeriscono un monitoraggio a lungo termine dei pazienti, con frequenti valutazioni elettrocardiografiche.

La gestione della fibrillazione atriale è difficile nei pazienti con amiloidosi cardiaca: sono stati pubblicati pochi studi a riguardo, i quali che non hanno riscontrato differenze statisticamente significative nella sopravvivenza tra i pazienti con ritmo sinusale rispetto ai pazienti con fibrillazione atriale(122)(220), quindi la decisione tra controllo del ritmo e controllo di frequenza dovrebbe essere considerata paziente per paziente. Nel caso del controllo del ritmo l'amiodarone è il farmaco antiaritmico più utilizzato; è stato descritto un rischio maggiore di complicanze nei pazienti con amiloidosi cardiaca in caso di cardioversione elettrica per ripristinare il ritmo sinusale (222).

Il controllo della frequenza può essere difficile nei pazienti con amiloidosi cardiaca sia perché solo una gamma ristretta di frequenze cardiache è permessa (in quanto è fondamentale ottimizzare l'aspetto emodinamico di questi pazienti) sia perché molte terapie (come quella con calcioantagonisti non diidropiridinici o con digossina) possono essere molto complesse nella loro gestione.

I calcioantagonisti non diidropiridinici sono controindicati a causa dell'affinità di questi farmaci nei confronti delle fibrille amiloidi, con un forte rischio di accumulo e di tossicità(223),e per tale ragione il loro impiego dovrebbe essere limitato e, se necessario, caratterizzato da un monitoraggio frequente e da dosaggi ridotti (219).

Anche la digossina è stata considerata per molto tempo controindicata per gli stessi motivi (224), ma un recente studio sulla amiloidosi cardiaca da catene leggere ha riaperto un possibile dibattito al riguardo (225), ergo l'impiego di la digossina a basse dosi con un attentissimo monitoraggio rappresenta una

alternativa ragionevole nella strategia di controllo della frequenza, soprattutto nei pazienti inclini all'ipotensione.

È stato rilevato un rischio più elevato di formazione di trombi intracardiaci nei pazienti con amiloidosi cardiaca. Questo rischio è indipendente dal momento di insorgenza o dalla corretta anticoagulazione (226), ergo è indicato escludere la loro presenza prima della cardioversione elettrica e proporre un trattamento anticoagulante indipendentemente dal punteggio CHA₂DS₂-VASC (227).

Nei pazienti con CA un rischio più elevato di formazione di trombi intracardiaci è stato rilevato da diversi studi indipendentemente dal momento di insorgenza o dalla corretta anticoagulazione (226), quindi sarebbe ragionevole escludere la loro presenza prima dell'ECV e iniziare l'anticoagulazione indipendentemente dal punteggio CHA₂DS₂-VASC (227) e, d'altra parte, l'anticoagulazione in pazienti con ritmo sinusale può essere considerata, paziente per paziente, tenendo conto di fattori come la dilatazione atriale significativa o basse frequenze atriali.

I dati sull'ablazione delle vene polmonari sono scarsi e controversi, quindi non è possibile stabilire delle indicazioni in tal senso (228). Non sono ad oggi disponibili dati per il confronto tra antagonisti della vitamina K (VKA) ed gli anticoagulanti orali diretti (DOAC).

Il ruolo dei dispositivi di occlusione dell'auricola atriale sinistra è sconosciuto, ma dato il rischio più elevato di trombosi intracardiaca, v'è una significativa preoccupazione circa la trombosi del dispositivo stesso.

1.12.1.2 Disordini della conduzione

L'infiltrazione da parte di fibrille amiloidi ed il successivo quadro di fibrosi che può instaurarsi possono determinare disordini della conduzione seno-atriale od atrio-ventricolare, come altresì incompetenza cronotropa. Ad oggi, le indicazioni per l'impianto di pacemaker (PM) sono coerenti con le linee guida prodotte per tutte le altre affezioni cardiache.

Alcuni autori suggeriscono l'impianto profilattico di pacemaker nei pazienti con ATTRv, a condizione che vi sia uno o più dei seguenti parametri di conduzione (misurati mediante uno studio elettrofisiologico): intervallo ventricolare ≥ 70 ms,

intervallo ventricolare >55 ms associato a blocco fascicolare, blocco atrioventricolare di primo grado o punto di Wenckebach ≤ 100 bpm. È stato infatti dimostrato che il 25% dei pazienti con impianto profilattico di pacemaker, diveniva pacemaker-dipendente durante un follow-up di 45 mesi (229).

Data l'eventualità che una frequente stimolazione (e la successiva dissincronia ventricolare) possano portare ad un peggioramento della gittata cardiaca, esistono alcuni centri che preferiscono impiantare dispositivi di risincronizzazione cardiaca anziché pacemaker del ventricolo destro, in quanto sembrerebbe portare maggiore beneficio nei pazienti con amiloidosi cardiaca da transtiretina in cui la stimolazione ventricolare è >40% (230).

1.12.1.3 Aritmie ventricolari

Sebbene sia nota da tempo la relazione tra amiloidosi cardiaca ed aritmie ventricolari, dato l'alto tasso di morte cardiaca improvvisa in questi pazienti per PEA (ritmo non defibrillabile) il beneficio dell'implantabile cardioverter defibrillatore (ICD) non è ben stabilito (231). Tuttavia, se si decidesse di posizionare un ICD, si dovrebbe preferire la via transvenosa in modo da avere a disposizione anche la funzione di stimolazione.

1.12.1.4 Patologie valvolari

La stenosi aortica calcifica (SAC) è una patologia comune negli anziani, con una prevalenza di quasi il 4% nella popolazione di età superiore ai 70 anni, secondo stime sulla popolazione americana. Non sorprende dunque che la stenosi aortica e l'amiloidosi cardiaca (soprattutto la forma collegata alla transtiretina wild-type) coesistano. Infatti il 15% dei pazienti con stenosi aortica sottoposti a impianto valvolare aortico transcateretere presenta una scintigrafia con traccianti osteoavidi compatibile con amiloidosi cardiaca da transtiretina(232)(233)(234)(235).

I pazienti con stenosi aortica grave e concomitante amiloidosi cardiaca da transtiretina tendono ad essere generalmente anziani e più frequentemente maschi. Presentano inoltre una storia di sindrome del tunnel carpale. A livello ecocardiografico hanno altresì alcuni rilievi importanti e tipici: aumento dello spessore della parete del setto interventricolare, stenosi aortica "low-flow, low

gradient”, frazione di eiezione del ventricolo sinistro leggermente ridotta e indice di gittata sistolica diminuita (233)(73)(236).

Dati emergenti suggeriscono che l’impianto valvolare aortico transcateretere sia da preferirsi alla sostituzione chirurgica nei pazienti con concomitante stenosi aortica ed amiloidosi cardiaca da transtiretina, probabilmente a causa di un maggiore rischio chirurgico (237)(238).

Gli studi in letteratura suggeriscono che l'intervento di sostituzione della valvola aortica sia superiore rispetto alla terapia medica per prevenire il decesso di questi pazienti, ma i dati sulla morbilità sono davvero scarsi.

Un recente studio prospettico europeo di tipo multicentrico ha valutato 200 pazienti con stenosi aortica serrata, 13% dei quali con amiloidosi cardiaca. Detto studio non ha evidenziato differenze statisticamente significative nella mortalità per pazienti con sola stenosi aortica e pazienti con stenosi aortica ed amiloidosi cardiaca, nel rispetto di un follow up di 19 mesi; in tutti i pazienti l’impianto valvolare aortico transcateretere si è associato ad un significativo beneficio di sopravvivenza (sia per quanto riguarda la coorte totale che il sottogruppo di pazienti a duplice fenotipo)(239). D'altra parte si deve considerare che, nell’ambito di un un follow-up mediano di 1,7 anni, i soggetti con stenosi aortica e cardiomiopatia amiloidotica transtiretina-correlata presentavano rischio di mortalità quasi 2 volte maggiore rispetto ai pazienti con sola stenosi aortica, questo indipendentemente dal tipo di terapia ricevuta, fosse stata essa percutanea o medica (75).

I dati chirurgici e interventistici relativi alla malattia della valvola mitrale e della valvola tricuspide in pazienti con amiloidosi cardiaca sono estremamente limitati. Uno studio monocentrico includente quasi 7.700 individui sottoposti a chirurgia della valvola mitrale (isolata o combinata) dal 2007 al 2016 ha rilevato l'amiloide in <1% del tessuto rimosso (240).

Una piccola case-series monocentrica ha valutato i risultati della riparazione percutanea della valvola mitralica (PMVR) rispetto alla terapia conservativa in pazienti con amiloidosi cardiaca e insufficienza mitralica da moderato a grave. Il braccio “PMVR” comprendeva 4 pazienti ATTR e 1 AL, mentre il braccio di “terapia

medica” comprendeva 2 pazienti ATTR e 5 AL. Lo studio ha dimostrato la fattibilità tecnica dell'intervento percutaneo (PMVR) in questo complesso gruppo di pazienti con amiloidosi cardiaca, senza alcun impatto negativo a livello di prognosi (241).

Mancano studi concernenti il trattamento della patologia tricuspidalica in pazienti con amiloidosi cardiaca. Nonostante la predominanza della disfunzione di cuore destro nella cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina, l'utilità dell'intervento per l'insufficienza tricuspidalica è discutibile, in quanto quest'ultimo è più spesso secondario ad un rimodellamento ventricolare destro piuttosto che ad una vera e propria affezione valvolare primitiva. (242)

1.12.2 Terapie specifiche per amiloidosi cardiaca da transtiretina

Ad oggi sono disponibili due strategie terapeutiche nel trattamento della amiloidosi cardiaca da transtiretina: stabilizzare la transtiretina andando ad impattare sulla “rate limiting step” di degradazione della stessa, o silenziare la produzione della transtiretina. Inoltre esistono differenti terapie oggi in via di sviluppo, tra cui estrattori o degradatori della proteina, terapie anti-seeding ed inibitori dell'aggregazione della transtiretina.

1.12.2.1 Stabilizzazione della transtiretina

Il diflunisal è un agente antinfiammatorio di carattere non steroideo, che presenta proprietà stabilizzanti del TTR.

La sua farmacodinamica si basa sulla interazione con i siti di legame della tiroxina nel contesto del tetramero di transiretina a livello dell'interfaccia dimero-dimero. Diflunisal è quindi in grado di prevenire la dissociazione “rate limiting” della transtiretina, nonché il conseguente malripiegamento della proteina in monomeri e oligomeri amiloidogenici. Diflunisal è associato ad effetti avversi tra cui emorragia gastrointestinale, disfunzione renale, ipertensione arteriosa e ritenzione idrica. Cionondimeno, la dose di diflunisal impiegata nel trattamento della amiloidosi cardiaca da transtiretina è inferiore a quella antinfiammatoria (250mg bis in die), ed è generalmente ben tollerata. In uno studio coinvolgente 130 pazienti con polineuropatia amiloide familiare randomizzati alternativamente a 250 mg di diflunisal b.i.d. o placebo b.i.d. per 2 anni, il diflunisal ha ridotto il tasso

di progressione della polineuropatia; ha inoltre determinato una migliore qualità della vita (243). Per quanto riguarda l'amiloidosi cardiaca da transtiretina, Diflunisal sembrerebbe rallentare la progressione della patologia in pazienti con scompenso cardiaco, con peggioramento della funzione renale o con sanguinamento gastrointestinale (244).

Altro farmaco che sta divenendo sempre più cruciale nella gestione della cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina è il Tafamidis; questo è un derivato benzossazolico somministrabile per via orale, che è in grado di stabilizzare il tetramero di transtiretina grazie ad una interazione con i siti di legame per la tiroxina. Lo studio ATTR-ACT (*Safety and Efficacy of Tafamidis in Patients With Transthyretin Cardiomyopathy*) è stato uno studio randomizzato in doppio cieco che ha arruolato 441 pazienti. I soggetti erano alterativamente assegnati ad una terapia placebo, ad una terapia con 20mg di Tafamidis al giorno o ancora a 80 mg di Tafamidis al giorno (245). Lo studio ha dimostrato una riduzione assoluta della mortalità del 13,4% per tutte le cause nella coorte sottoposta a terapia con tafamidis rispetto alla coorte sottoposta a terapia placebo (29,5% vs 42,9%); inoltre ha dimostrato come, nel sottogruppo di pazienti con scompenso cardiaco e classe NYHA I o II, il tasso di ospedalizzazione per patologia cardiovascolare era ridotto del 32%. Ciononostante, nel caso di pazienti con scompenso cardiaco e classe funzionale NYHA III, i tassi di ricovero per patologia cardiovascolare erano più elevati nel caso di una terapia con tafamidis, piuttosto che con placebo. Ancora una volta, ciò indica come sia cruciale una diagnostica precoce, ed un celere trattamento.

Gli endpoint secondari dello studio ATTR-ACT hanno inoltre dimostrato un incremento della distanza percorsa durante il test del cammino di 6 minuti (6MWT) ed una riduzione del declino della qualità di vita, analizzata mediante il Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire. Lo studio ATTR-ACT ha inoltre comprovato come la mortalità per tutte le cause venga a ridursi maggiormente con la terapia "Tafamidis 80 mg" rispetto alla terapia "Tafamidis 20 mg", senza problematiche di sicurezza dose-dipendenti; questo è il motivo per cui ad oggi il tafamidi 80mg è l'opzione di dosaggio preferita (246).

Nel maggio 2019, Tafamidis è divenuta la prima terapia specifica ad essere approvata nel trattamento dell'amiloidosi cardiaca da transtiretina. Tafamidis è ad oggi disponibile come capsule "Tafamidis Meglumina 20 mg" (da assumere 4 volte al giorno) o come compresse "acid-free" di Tafamidis 61 mg (quest'ultima formulazione è stata sviluppata per una maggiore comodità di assunzione). Queste 2 formulazioni sono bioequivalenti anche se non sostituibili (247).

Acoramidis imita la farmacodinamica di stabilizzante strutturale di Tafamidis, ed è impiegato nella forma di amiloidosi cardiaca da transtiretina ereditaria con mutazione T139M o V50M. Questa molecola con attività altamente stabilizzante riesce a proteggere dallo sviluppo di polineuropatia amiloide familiare in quei soggetti presentanti la mutazione V50M in eterozigosi, andando a rallentare la dissociazione dei tetrameri di transtiretina (248). La mutazione T139M favorisce la formazione di legami idrogeno tra i residui serinici presenti in posizione 137 su ciascun monomero, e riduce la dissociazione della transtiretina di 40 volte rispetto a ciò che accade nella forma wild-type(249).

Penchala et al. (250) hanno dimostrato come Acoramidis sia più selettiva e potente rispetto a Diflunisal o Tafamidis:

- Acoramidis si lega in modo più selettivo alla transtiretina sierica, se confrontata con Diflunisal, Tafamidis o tiroxina, il ligando naturale della transtiretina;
- Se paragonato al Tafamidis sembra fornire una maggiore stabilizzazione della molecola;
- Differentemente dal Tafamidis, stabilizza i tetrameri TTR mutati V142I con la stessa farmacocinetica con cui stabilizza la TTR wild type.

Durante uno studio di fase 2 si è registrata una stabilizzazione dei tetrameri di transtiretina superiore al 90% sia al picco che al minimo dei livelli sierici di Acoramidis (>90%); inoltre si è registrato un incremento dei livelli sierici di transtiretina del 50% a 28 giorni dall'assunzione b.i.d. di 800 mg di acoramidis (251).

Lo studio Eidos AG10 (ATTRIBUTE-CM) è uno studio di fase 3 in cui si avrà un arruolamento pianificato di più di 500 pazienti con amiloidosi cardiaca da

transtiretina; questi saranno allocati, con un rapporto 2:1, a 800 mg b.i.d. di acoramidis o placebo b.i.d. per 30 mesi. L'endpoint primario composito comprende la variazione della distanza percorsa al 6MWT a 12 mesi, la mortalità per tutte le cause, la frequenza dei ricoveri cardiovascolari in 30 mesi.

1.12.2.2 Silenziamento della transtiretina

Il silenziamento della proteina TTR può essere raggiunto mediante l'impiego di oligonucleotidi antisenso, detti ASO, o di "small-interfering" RNA, detti siRNA.

Gli ASO sono molecole oligonucleotidiche a singolo filamento, di natura anfipatica. Una volta somministrati, questi si distribuiscono ampiamente nell'organismo, contattando le proteine sieriche e penetrando altresì nel citosol delle cellule bersaglio. Qui contatta l'mRNA codificante per la transtiretina e, richiamando l'endonucleasi RNasi H2, promuove la degradazione del RNA messaggero. (252)

Gli small interfering RNA sono molecole oligonucleotidiche a doppio filamento (uno senso, l'altro antisenso): mentre il primo garantisce il rilascio del farmaco nella cellula bersaglio, il secondo garantisce il silenziamento della transtiretina. I siRNA sono molecole polianioniche, dal carattere idrofilico, ragion per cui necessitano di una formulazione in nanoparticelle lipidiche o la coniugazione a "delivery systems" che ne favoriscano il rilascio tissutale.

Dopo aver raggiunto il citosol della cellula bersaglio. Il filamento antisenso (parte attiva) del siRNA viene caricato a livello della proteina Ago2, generando un complesso di silenziamento in grado di contattare l'mRNA codificante per la transtiretina, inducendone la sua degradazione. (252)

Considerato che una delle principali funzioni della transtiretina risulta essere il trasporto del retinolo, coloro che assumono una terapia di silenziamento della transtiretina debbono integrare vitamina A con la dieta. Cionondimeno i livelli sierici della vitamina non riflettono con precisione le riserve corporee totali, e non debbono essere utilizzati, nei pazienti in terapia con silenziatori del gene della transtiretina per modulare il tipo di integrazione.

Per quanto concerne i farmaci silenziatori della transtiretina, è possibile individuare agenti di prima e di seconda generazione.

Inotersen è un oligonucleotide antisenso, coniugato con un fosforotioato sostituito con un gruppo metossietilico a livello dell'ossigeno in posizione 20. Questa modifica garantisce una maggiore resistenza all'attività delle nucleasi, ed altresì permette un migliore legame alle proteine carriers, avendo così maggior potenza e migliore profilo farmacocinetico (253). Nello studio NEURO-TTR, l'impiego di 300 mg di inotersen una volta alla settimana per via sottocutanea ha permesso di stabilizzare la neuropatia, migliorando la qualità della vita in pazienti con ATTRv e polineuropatia (con o senza coinvolgimento cardiaco) (254).

In uno studio monocentrico di 33 pazienti, arruolante soggetti con amiloidosi cardiaca da transtiretina e scompenso cardiaco con classe funzionale NYHA I-II-III, l'impiego di inotersen ha garantito una riduzione media dell'8,4% della massa ventricolare sinistra (dato analizzato all'imaging di risonanza magnetica) e ha incrementato la tolleranza all'esercizio fisico (nel 6MWT a 2 anni dall'inizio del trattamento v'è stato un incremento medio della distanza percorsa di 20,2 metri) (255). Nonostante inotersen sia ancora disponibile in commercio, non è più oggetto di studi clinici riguardo amiloidosi cardiaca da transtiretina, in quanto si sono sviluppati oligonucleotidi antisenso ad azione prolungata, con un maggiore profilo di sicurezza.

Patisiran è uno short-interfering RNA inglobato in una nanoparticella lipidica che ne migliora l'assorbimento epatico. Nello studio APOLLO di fase 3 sono stati randomizzati 225 con polineuropatia amiloide familiare da transtiretina e scompenso cardiaco con classe NYHA I-II a ricevere alternativamente terapia placebo o terapia con Patisiran (0.3 mg/kg ogni 3 settimane). La randomizzazione si è svolta con rapporto 2:1. (256). A 18 mesi, la progressione della neuropatia è stata interrotta o addirittura invertita nel gruppo di pazienti sottoposti a terapia con Patisiran.

Inoltre, nel sottogruppo di pazienti con interessamento cardiaco (definiti con uno spessore parietale ventricolare sinistro superiore a 13 mm e anamnesi negativa per valvulopatia aortica od ipertensione arteriosa) la terapia con Patisiran ha ridotto lo spessore medio della parete ventricolare, lo strain longitudinale globale,

e l'NT-proBNP. Questo sempre in riferimento ad un periodo di osservazione di 18 mesi (257). Un'analisi post hoc dello studio APOLLO ha dimostrato una riduzione del 46% dei ricoveri per patologia cardiovascolare e della mortalità per tutte le cause nei pazienti randomizzati a Patisiran piuttosto che al placebo. Ulteriore prova del fatto che Patisiran possa potenzialmente svolgere un ruolo nel trattamento della amiloidosi cardiaca da transtiretina è stata fornita da Fontana et al. (258).

Sono stati altresì sviluppati agenti di silenziamento della transtiretina di seconda generazione. Vutrisiran è un siRNA di seconda generazione il quale, a differenza del Patisiran, è coniugato ad un residuo di N-acetil-galattosammina (GalNAc), che presenta importante affinità per il recettore della asialoglicoproteina (ASGPR) il quale si colloca a livello degli epatociti. Ciò permette un rapido assorbimento epatico. Inoltre, non essendo coniugato a nanoparticelle lipidiche, non c'è necessità di premedicazione per la sua somministrazione sottocutanea, che è eseguita ogni tre mesi (dosaggio di 25 mg). In uno studio di fase 1 detto principio attivo è stato in grado di ridurre i livelli di transtiretina dell'83 % entro la sesta settimana; tale riduzione si è mantenuta per 3 mesi (257). HELIOS-B è uno studio clinico di fase 3 che ha arruolato 600 pazienti con amiloidosi cardiaca da transtiretina e scompenso cardiaco di classe funzionale NYHA I-III. Questi pazienti sono stati randomizzati 1:1 a vutrisiran o a placebo. Un sottogruppo di pazienti arruolati in questo studio potrà assumere contemporaneamente lo stabilizzatore di transtiretina Tafamidis.

AKCEA-TTR-LRx (ION 682884) è un oligonucleotide antisense coniugato con GalNAc, in grado di interagire con il recettore della asialoglicoproteina degli epatociti. In ragione di ciò, ION-682884 ha un miglior assorbimento nel fegato rispetto al suo predecessore, inotersen, con il quale condivide la medesima sequenza di base. Gli studi di fase 1 su ION-682884 hanno dimostrato una potenza di 51 volte superiore rispetto ad inotersen, con una esposizione 27 volte inferiore; la posologia di ION-682884 è quella di una monodose mensile per via sottocutanea al dosaggio di 45 mg. La riduzione media dei livelli plasmatici di transtiretina è dell'85,7%, e gli effetti collaterali sembrerebbero molto inferiori, rispetto a quelli di inotersen (259). Cardio-TTRansform è uno studio di fase 3 in cui 750 pazienti

con amiloidosi cardiaca da transtiretina saranno randomizzati 1:1 a ION-682884 mensilmente o terapia placebo mensilmente. L'end point primario composito sarà costituita da mortalità cardiovascolare ed eventi cardiovascolari: il tutto con un follow up di 120 settimane ed un monitoraggio clinico frequente.

1.12.2.3 Nuovo approccio terapeutico: il “knockdown” della transtiretina

CRISPR sta per clusters of regularly interspaced short palindromic repeats (cluster di brevi ripetizioni palindromiche regolarmente inter-spaziate) e Cas9 è la proteina 9 associata a CRISPR. CRISPR-Cas9 è dunque una tecnica di modifica genica in cui il DNA bersaglio può essere modificato od alterato in modo permanente. Detta tecnologia si articola in due componenti: un RNA guida che conduce la proteina Cas9 a livello di una sequenza DNA bersaglio, e la stessa Cas9 che catalizza un clivaggio doppio filamento del DNA bersaglio. Ergo, il clivaggio induce la riparazione cellulare del DNA, al fine di correggere la mutazione; detta mutazione è quindi eliminata tramite un processo di “non-homologous end joining” o tramite una “homology-directed repair” che sfrutta l’RNA fornito come filamento stampo.

NTLA-2001 è un farmaco, somministrabile per via endovenosa, utilizzando una nanoparticella lipidica per fornire alla cellula un RNA guida ed un mRNA codificante per Cas9: detto farmaco è stato sviluppato con l’obiettivo di trattare definitivamente, con una singola somministrazione, la amiloidosi da transtiretina.

I dati di sperimentazione su modelli murini hanno dimostrato che una singola dose di NTLA-2001 induce un knockdown >97% del gene della transtiretina a 12 mesi dalla sua somministrazione. NTLA-2001 è ad oggi oggetto di investigazione in uno studio di fase 1 comprendente pazienti con ATTRv con polineuropatia (260).

1.12.2.4 Terapia di estrazione e degradazione dell'amiloide

PRX-004 è un anticorpo monoclonale somministrabile per via endovenosa, in grado di contattare la transtiretina malripiegata a livello miocardico, senza agire sulla transtiretina circolante nativa. È quindi in grado di eliminare i depositi di amiloide nel miocardio.

In uno studio di fase 1 arruolante 21 pazienti con amiloidosi cardiaca da transtiretina di tipo ereditario (esclusi coloro che presentavano classe funzionale NYHA III-IV), PRX-004 è risultato un farmaco sicuro e ben tollerato, senza gravi eventi collaterali. 7 di 21 pazienti hanno ricevuto la terapia per un periodo di 9 mesi; in essi si è osservato un miglioramento dello strain longitudinale globale rispetto alla baseline, di 1,2%.

NI006 è un anticorpo monoclonale umano IgG1 ricombinante, in grado di bersagliare le forme mal-ripiegate di transtiretina, siano esse wild-type o mutate. È attualmente in corso l'arruolamento dei pazienti per condurre uno studio di fase 1 al fine di valutare la sicurezza e l'efficacia di NI006 nei pazienti con cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina.

La componente P dell'amiloide sierica (SAP) è una glicoproteina plasmatica non fibrillare prodotta nel fegato in grado di legare tutte le forme di fibrille amiloidi. In virtù delle sue caratteristiche, il targeting della componente P dell'amiloide sierica potrebbe garantire l'eliminazione dei depositi di amiloide. Bodin et al. hanno dimostrato che la somministrazione di anticorpi IgG anti-SAP in modelli murini presentanti SAP umano comporta una fagocitosi complemento mediata dei depositi amiloidotici. Quando somministrati, successivamente ad una small-molecule in grado di ridurre i livelli di SAP circolante di oltre il 90%, gli anticorpi anti-SAP sono in grado di eliminare i depositi di fibrille amiloidi (261).

In uno studio di fase 1 coinvolgente pazienti con amiloidosi sistemica, i quali sono stati inizialmente trattati con CPHPC e successivamente da anticorpi IgG anti-SAP, ha dimostrato la riduzione della stiffness epatica ed una riduzione del carico amiloide renale, il tutto a 6 settimane dalla prima somministrazione. Tuttavia, sono stati esclusi quelli con coinvolgimento cardiaco (262). Uno studio di fase 2 sull'anticorpo anti-SAP dezamizumab non ha dimostrato alcun miglioramento del carico di amiloide a livello cardiaco in pazienti con amiloidosi cardiaca da transtiretina. Detto farmaco non è più oggetto di studio a causa di un profilo rischio-beneficio sfavorevole.

1.12.2.5 Terapie emergenti

Con il termine "amyloid seeding" ci si riferisce al processo di deposizione della transtiretina nativa su fibrille amiloidi già accumulate nell'organo e nei tessuti molli. Pertanto, nonostante l'uso della terapia stabilizzante TTR, la semina dei tetrameri nativi può continuare in presenza di un carico significativo di amiloide. TabFH2 è un inibitore peptidico che ricopre le estremità dei filamenti beta F e H, i motori primari dell'aggregazione delle fibrille (263), inibendo così l'autoassociazione e il fenomeno di seeding. Nonostante questa rimanga una terapia sperimentale, essa può comunque svolgere un ruolo nel trattamento di pazienti con un significativo carico di amiloide in sede cardiaca, prevenendo un'ulteriore deposizione di transtiretina.

1.12.2.6 Altri tipi di agenti

Si è osservato che la doxiciclina, antibiotico appartenente alla classe delle tetracicline, interrompe le fibrille TTR nei topi transgenici, dimostrando una riduzione dei marcatori associati alla deposizione di amiloide, tra cui SAP e la metalloproteinasi di matrice-9. L'ursodiolo e il suo coniugato con taurina, l'acido taursodesossicolico, sono efficaci nell'abbassare la TTR non fibrillare e possono agire in sincronia con la doxiciclina. Alcuni piccoli studi su questi agenti nella cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina non hanno riscontrato benefici dimostrabili ed inoltre vi è un alto tasso di interruzione della terapia in virtù di effetti collaterali gastrointestinali e dermatologici (264)(265).

L'epigallocatechina-3-gallato (EGCG) è una catechina presente nel tè verde che ha dimostrato di inibire la formazione di fibrille nella ATTRv in studi su modelli animali non umani. In uno studio monocentrico su 19 pazienti con ATTR-AC che hanno consumato 500-700 mg di EGCG al giorno per 12 mesi, non vi è stata progressione della malattia, come dimostrato da una riduzione media della massa miocardica ventricolare sinistra del 12,5% e da un incremento della velocità anulare mitralica del 9% (calcolati su 14 pazienti, disponibili per il follow-up) indicativo di un effetto inibitorio sulla progressione della AC (266).

La curcumina sembra avere effetti neuroprotettivi nell'ATTR, agendo come stabilizzatore della TTR a livello del suo sito di legame con la tiroxina. In modelli murini con TTR V50M, la somministrazione cronica di curcumina ha determinato una riduzione della dissociazione del tetramero, nonché un calo della tendenza all'aggregazione delle fibrille amiloidi. La curcumina sembra anche innescare la disaggregazione delle fibrille amiloidi e promuovere la loro clearance (267). La breve emivita e la limitata tollerabilità della curcumina ad alte dosi la rendono inadatta all'uso terapeutico; tuttavia, sono in fase di sviluppo nuove formulazioni con una maggiore biodisponibilità.

1.12.3 Terapie specifiche per amiloidosi cardiaca da catene leggere

I pazienti con amiloidosi AL spesso manifestano sindromi complesse e coinvolgimento multi sistemico, richiedenti un approccio terapeutico multidisciplinare per ottimizzare al meglio le cure. L'obiettivo della terapia nell'amiloidosi AL è una rapida e profonda riduzione delle FLC circolanti attraverso un trattamento del clone plasmocellulare anomalo; anche la terapia intensiva di supporto ed il trattamento della disfunzione d'organo sottostante sono di fondamentale importanza per migliorare non solo la qualità ma altresì la quantità di vita dei pazienti affetti. Nonostante i pazienti con MM generalmente decedano per complicazioni di un cancro diffuso, spesso recidivante e refrattario alle terapie, i pazienti con AL decedono perlopiù in conseguenza di una insufficienza d'organo, più frequentemente cardiaca, irreversibile e progressiva, causata dal deposito di amiloide nell'organo. Ergo, il tempo è davvero cruciale nell'amiloidosi AL. Sebbene la terapia PC-diretta non impatti direttamente sulla deposizione di amiloide, se questa dovesse rivelarsi efficace vi può essere l'interruzione o la riduzione significativa delle secrezioni di FLC, e ciò può indirettamente diminuire la deposizione di amiloide stessa, arrestando la progressiva disfunzione d'organo.

Un punto di snodo fondamentale che deve essere considerato nella gestione clinica di pazienti con amiloidosi AL di nuova diagnosi è il valutare se l'ASCT (trapianto autologo di cellule staminali) possa rappresentare o meno una strategia appropriata di trattamento. Storicamente, l'ASCT ha rappresentato l'unica terapia in grado di condurre ad una remissione prolungata e, quindi, ad una sopravvivenza a lungo termine in pazienti con amiloidosi AL. Tuttavia, la sempre maggiore

disponibilità di chemio-immunoterapie altamente efficaci ha modificato drasticamente questo paradigma ed oggi non solo si deve considerare se un paziente soddisfa i criteri per essere candidato al trapianto autologo di cellule staminali, ma anche quali sono le preferenze personali di ciascun individuo. L'assenza di dati randomizzati circa il ruolo dell'ASCT nell'era della moderna chemioimmunoterapia limita la consulenza medica, ma d'altro canto offre ai pazienti una maggiore flessibilità per quanto concerne le opzioni di trattamento. Considerando i pazienti affetti da MM, è verosimile che il raggiungimento di una "minimal residual disease response", possa comportare un significativo impatto sulla sopravvivenza libera da progressione (progression free survival), indipendentemente dalla quale strategia di trattamento sia stata messa in atto per raggiungerla (268). Nonostante non sia sufficiente, una remissione ematologica significativa e prolungata è condizione necessaria affinché si verifichi una risposta d'organo. Gli esatti meccanismi molecolari alla base della risposta d'organo rimangono in gran parte non chiarificati. Il riassorbimento delle fibrille amiloidi nel tempo è stato osservato in pazienti che ottengono una remissione ematologica, sebbene non sia noto quale livello di riduzione di amiloide sia necessario per produrre una risposta d'organo. Dal momento che la rimozione dei depositi di amiloide grazie a meccanismi intrinseci risulta inefficace, la risposta d'organo è tipicamente conseguenza di una risposta ematologica di mesi, a volte anni, nonostante esista una significativa variabilità inter-paziente sia per quanto concerne l'estensione che la cinetica del riassorbimento dell'amiloide (268). Le cause alla base dell'inadeguata clearance dell'amiloide rimangono ad oggi non chiarificate; I MAb diretti alle fibrille amiloidi sono attualmente in fase di valutazione in studi clinici (269)(270). Le seguenti tabelle espongono i criteri ematologici e di risposta d'organo nei pazienti con amiloidosi AL.

Parametri di risposta ematologica	Risposta complete (CR) ^a	Risposta parziale molto buona (VGPR)	Risposta parziale (PR)	Progressione da CR	Progressione da PR
FLC	Rapporto normale	dFLC <40 mg/L	dFLC >50%	FLC ^b anormale	>50% di incremento nelle FLC coinvolte E >100 mg/L di valore assoluto
SPEP+IFE	Nessuno spike monoclonale. Immunofissazione negativa	Non applicabile	Non applicabile	Positivo	>50% di incremento nella componente monoclonale E >0.5 g/dL di componente monoclonale
UPEP+IFE	Nessuno spike monoclonale. Immunofissazione negativa	Non applicabile	Non applicabile	Non applicabile	>50% di componente monoclonale urinaria e AND >200 min/24 h del valore di componente monoclonale

Tabella IV: criteri di risposta ematologica. La tabella sintetizza i criteri più aggiornati di risposta ematologica nell'amiloidosi AL (31). A) Tutti i criteri debbono essere soddisfatti. B) Le catene libere sieriche coinvolte debbono raddoppiare in valore.

	Risposta del NT-proBNP	Risposta della NYHA Functional Class		Risposta del NT-proBNP
Risposta cardiaca	Riduzione del NT-proBNP maggiore del >30% E sua riduzione di almeno >300 pg/mL rispetto la baseline ^a	Incremento di 2 classi funzionali NYHA rispetto la baseline ^b	Progressione cardiaca	Incremento del NT-proBNP di >30% E suo incremento assoluto di almeno >300 ng/L dal baseline
	Proteinuria			eGFR
Risposta renale	Riduzione della proteinuria del >30% or fino a <0.5 g/24 h ^c		Progressione renale	Incremento della eGFR di 25% rispetto al baseline

Tabella V: la tabella riassume i criteri di risposta renale e cardiaca che sono stati validati per l'amiloidosi cardiaca (15-17). A) Da una baseline di NT-proBNP superior a 650 ng/L. B) Alla diagnosi deve essere presente una classe NYHA 3 o 4. C) In assenza di un decline di eGFR pari o superior al 25%.

Le più recenti acquisizioni suggeriscono che maggiore sia la risposta ematologica, migliore è il risultato sia in termini di miglioramento degli organi principali che in termini di sopravvivenza in assenza di progressione di malattia PFS(271). In recenti studi retrospettivi, è stato comprovato che la marcata soppressione del clone plasmocellulare, che ha come conseguenza una franca riduzione della FLC coinvolta (≤ 10 mg/L) nonché una riduzione della differenza tra FLC coinvolta e non coinvolta al di sotto dei 10 mg/L, si associa a una migliore PFS, remissione d'organo e overall survival (OS) (272)(273). È stato inoltre dimostrato che anche la negatività di una malattia minima residua, come misurata alla citometria a flusso di nuova

generazione, si associa ad un aumento della progression free survival nonché ad un incremento della risposta d'organo (271)(274)(275).

Sicuramente con il tempo si è verificata una evoluzione del concetto di “malattia progressiva” nel quadro della amiloidosi AL. Questo dipende anche dal fatto che modesti livelli di FLC possono essere sufficienti a cagionare una progressiva disfunzione d’organo nel tempo. Un recente studio ha esaminato tra criteri di progressione la differenza di FLC coinvolte e non coinvolte ed ha dimostrato l’impatto di questo parametro sulla sopravvivenza generale, supportandone quindi l'uso come fattore per avviare al trattamento pazienti i quali avevano precedentemente ottenuto una remissione ematologica (276).

Sebbene sia la remissione ematologica che quella d'organo influenzino di molto la sopravvivenza a lungo termine, il coinvolgimento cardiaco avanzato persiste ad oggi come il più cruciale fattore nel definire il rischio di mortalità precoce, evidenziando quindi la necessità di aumentare la consapevolezza clinica limitatamente questa patologia, di modo da migliorare la diagnosi precoce (277).

1.12.3.1 Agenti terapeutici

Storicamente i farmaci impiegati per la gestione dei quadri di amiloidosi AL risultavano essere gli stessi appartenenti alle strategie terapeutiche per il mieloma multiplo, ergo i pazienti sono stati per anni sottoposti a trattamenti con farmaci anti-PC *off label*. Per decenni il melfalan orale in associazione a steroidi è stato il cardine del trattamento dell'amiloidosi AL. Alla fine degli anni '90, Melfalan a dosi elevate in associazione alla ASCT ha acquisito sempre più dati sull'efficacia con un migliore controllo di malattia e prognosi. Alla fine degli anni 2000 sono emersi nuovi farmaci come i farmaci immunomodulatori (IMiD) e gli inibitori del proteasoma (PI). Da gennaio 2021 è stato approvato dalla FDA un nuovo protocollo terapeutico (Dara-CyBorD) per la gestione di AL di nuova diagnosi (esclusi i pazienti in stadio IIIB) sulla base dei risultati dello studio Andromeda (278)(279).

1.12.3.2 Agenti alchilanti

Melfalan, ciclofosfamide e bendamustina sono agenti alchilanti derivati dalla mostarda azotata con attività antineoplastica associata all'alchilazione delle guanine e alla formazione di legami crociati tra filamenti di DNA (ICL), che portano a danni del DNA stesso con successiva interferenza al processo di replicazione del DNA e di trascrizione da DNA a RNA. Recentemente, è stato dimostrato che questi agenti riescano ad indurre una morte cellulare correlata all'attivazione del sistema immunitario e modifichino il contesto citochinico da un microambiente tollerante nei confronti della neoplasia ad un microambiente in grado di favorire un alto livello di immunosorveglianza (280). Poiché gli agenti alchilanti sono ciclo cellulare-non specifici, si può frequentemente osservare citopenia e tossicità gastrointestinale come possibili effetti collaterali.

1.12.3.3 Inibitori del proteasoma

Inizialmente utilizzati nell'ambito della ricerca al fine di studiare i meccanismi molecolari alla base della proteolisi, i gli inibitori del proteasoma hanno totalmente rivoluzionato il trattamento delle discrasie plasmocellulari (281). Ad oggi, sono stati approvati dalla FDA 3 inibitori del proteasoma per la gestione del mieloma multiplo: gli acidi boronici peptidici bortezomib e ixazomib, (il primo ad uso parenterale, il secondo ad uso enterale) ed il carfilzomib, un derivato dell'epossichetone (282). Tutti e 3 i PI prendono di mira principalmente l'attività catalitica della subunità chimotriptico-simile (CT-L, b5) del proteasoma, una voluminosa proteasi multi-catalitica responsabile della degradazione della maggior parte delle proteine scorrettamente ripiegate, precedentemente contrassegnate da una catena poliubiquitinica (281).

Un ampio studio concernente i meccanismi molecolari alla base dell'attività degli inibitori del proteasoma nel mieloma multiplo ha dimostrato che l'efficacia degli inibitori del proteasoma si espleta principalmente con l'esacerbazione della proteotossicità, l'induzione della morte cellulare immunogenica e la modulazione del microambiente del midollo osseo (283). Inizialmente si riteneva che il principale meccanismo d'azione degli inibitori del proteasoma fosse il blocco del signaling della via NF- κ B, mediante stabilizzazione della proteina I κ B (284).

Tuttavia, con il tempo si chiarificò come il vero meccanismo di citotossicità da inibitori del proteasoma fosse l'esacerbazione della proteotossicità basale e la concomitante compromissione della proteostasi. Inoltre, si comprese come un biomarcatore della sensibilità nei confronti degli inibitori del proteasoma fosse il rapporto tra carico di attività del proteasoma e attività del proteasoma stesso(284)(285).

Successivamente si è dimostrato come, nell'amiloidosi AL, la sensibilità delle cellule nei confronti degli inibitori del proteasoma sia dovuta ad una proteostasi alterata nel contesto di una altrettanto alterata autofagia (286). Una riduzione del carico di attività di proteasoma, un aumento della capacità del proteasoma od una sovra-regolazione di meccanismi proteolitici alternativi, come l'autofagia potrebbero rappresentare possibili meccanismi molecolari in grado di favorire la resistenza nei confronti dei PI (287). Nonostante le iniziali, crescenti preoccupazioni circa la somministrazione sistemica di inibitori del proteasoma, che si pensava sarebbero stati estremamente tossici, in considerazione dell'espressione ubiquitaria di questa proteina e della sua funzione cruciale, gli inibitori del proteasoma sono generalmente ben tollerati, con una gamma di tossicità differente che varia anche a seconda del composto che viene preso in considerazione(283).

Bortezomib ha cambiato nel modo più drastico la gestione del paziente con amiloidosi AL. Fin dai suoi primi utilizzi in combinazione con desametasone e ciclofosfamide, bortezomib ha dimostrato miglioramenti clinici e laboratoristici quando aggiunto a qualsiasi altro agente chemio/immunoterapico nell'ambito di un regime multifarmaco. CyBorD, regime multifarmaco per la prima volta impiegato nel 2009, prevedente l'uso di bortezomib, desametasone e ciclofosfamide, è ad oggi la prima linea di trattamento nell'amiloidosi AL, in virtù della sua efficacia e sicurezza, anche nei pazienti con malattia renale allo stadio terminale (194).

1.12.3.4 Farmaci immunomodulatori

Talidomide e suoi derivati, lenalidomide e pomalidomide, sono agenti farmacologici somministrabili per os, approvati dalla FDA per il trattamento del mieloma multiplo. La loro efficacia clinica si basa sia sulla citotossicità diretta nei confronti del clone plasmocellulare anomalo, sia sulla modulazione del microambiente tumorale: presentano difatti proprietà antiangiogenetiche e immunostimolanti (288).

Il bersaglio molecolare della lenalidomide nel mieloma multiplo, che ne giustifica l'efficacia, è stato recentemente identificato, ed è la proteina cereblon (CRBN). Unitamente alla DDBP1 (damaged DNA binding protein 1) cereblon rappresenta il recettore del complesso Ubiquitina ligasi E3-cullina 4 (CRL4CRBN), il quale è a sua volta responsabile della degradazione (proteasoma-mediata) di IKZF1 (Ikaros) e IKZF3 (Aiolos). IKZF1 e IKZF3 sono repressori trascrizionali dell'interleuchina (IL)-2, ergo la lenalidomide promuove la loro degradazione, con conseguente incremento dei livelli di IL-2 e aumento dell'immuno-stimolazione delle cellule T (289)(290)(291).

Tutti i sopracitati farmaci immunomodulatori sono somministrati per via orale, e sono tutti considerati farmaci di classe X, in considerazione del noto effetto teratogeno presentato dalla talidomide: quest'ultima, somministrata tra gli anni '50 e '60 del secolo scorso in donne in gravidanza come farmaco antiemetico ha provocato diversi casi di focomelia nei nuovi nati.

Ulteriori effetti collaterali degni di nota sono fatica, eruzione cutanea, diarrea, nausea e citopenia. Inoltre si è osservato un incremento del rischio di eventi tromboembolici qualora questi farmaci siano somministrati nel contesto di un regime di combinazione: ciò richiede una adeguata profilassi per TEV. In combinazione con melfalan, si è osservato come la lenalidomide aumenti il rischio di discrasie mieloidi secondarie(292).

1.12.3.5 Anticorpi monoclonali nell'amiloidosi AL

Considerata la loro notevole efficacia nel trattamento del mieloma multiplo, i MAb diretti contro marcatori espressi dalle plasmacellule sono stati introdotti anche nella gestione dell'amiloidosi AL (293)(294)(295). Daratumumab (DARA) e isatuximab (ISA) sono anticorpi monoclonali IgG1 diretti contro il CD38, un marcatore universale di plasmablasti e plasmacellule (296).

Studi preclinici hanno dimostrato come DARA e ISA riescano ad indurre la morte delle cellule del mieloma multiplo mediante differenti meccanismi, tra cui la citotossicità complemento-dipendente (CDC), la fagocitosi cellulare anticorpo-dipendente (ADCP), e la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC). Inoltre tramite la modulazione di CD38 favoriscono altresì l'apoptosi diretta conseguente impatto nell'ambito midollare (297). Nello specifico, daratumumab (DARA) si è dimostrato altamente efficace nei pazienti con amiloidosi AL ed ha cambiato radicalmente la storia naturale di questa malattia. Inizialmente disponibile come infusione endovenosa, una formulazione sottocutanea di DARA è stata approvata nel 2020 (298). Daratumumab è un farmaco generalmente ben tollerato, i cui principali effetti avversi, oltre che un aumentato rischio infettivo e quadri di citopenia, sono correlati all'infusione (299). La premedicazione utilizzando steroidi, antistaminici anti-H2 e montelukast, antagonista del recettore dei leucotrieni, ha garantito una efficace riduzione di gravi reazioni all'infusione. Nei pazienti con amiloidosi AL presentanti una malattia cardiaca o renale avanzata, sono state osservate esacerbazioni di scompenso cardiaco o peggioramento dell'anasarca con la somministrazione endovenosa di daratumumab, per questo la formulazione sottocutanea è fortemente preferita (300).

Nell'amiloidosi AL, daratumumab in monoterapia si è dimostrato altamente efficace nell'indurre risposte d'organo profonde e durature, in pazienti pesantemente pretrattati (300)(301). È importante evidenziare come si siano osservate significative risposte ematologiche già dopo 1 singola infusione di daratumumab (300)(302). Questi straordinari risultati come monoterapia hanno

aperto la strada all'uso anticipato di daratumumab in combinazione allo standard of care CyBorD, composto da desametasone, bortezomib e ciclofosfamide.

ANDROMEDA è uno studio, ancora in corso, multicentrico di fase III che randomizza i pazienti a ricevere alternativamente CyBorD da solo od in combinazione con daratumumab per via sottocutanea (il così detto protocollo DARA-CyBorD) (303). Secondo lo studio, l'aggiunta di daratumumab si traduce in tassi di risposta ematologica (92% contro 77%), cardiaca (42% contro 22%) e renale (54% contro 27%) significativamente più elevati rispetto al solo CyBorD. La sopravvivenza libera da progressione del deterioramento d'organo maggiore (MODPFS) ha altresì suggerito come lo schema DARA-CyBorD sia più efficace, con un HR di 0,58 (IC 95%: 0,36-0,93; P = 0,02); inoltre, come già affermato, le risposte cardiache e renali sono approssimativamente raddoppiate nel braccio DARA-CyBorD (41% vs 22 % e 53% vs 24%, rispettivamente).

Dara-CyBorD è risultato un protocollo caratterizzato da buona tollerabilità, senza problemi di sicurezza imprevisti. Inoltre, la formulazione sottocutanea di daratumumab ha comportato un minor numero di reazioni correlate all'infusione rispetto ai dati storici con daratumumab per via endovenosa. Sulla base di questi risultati eccellenti, il 15 gennaio 2021 la FDA ha concesso l'approvazione accelerata al protocollo DARA-CyBorD, ad oggi primo ed unico trattamento approvato dalla FDA per pazienti con nuova diagnosi di amiloidosi AL

Elotuzumab (ELO) è un anticorpo monoclonale IgG1k umanizzato, diretto contro CD319, il membro F7 della famiglia delle molecole di segnalazione per l'attivazione linfocitica (SLAMF7), una glicoproteina espressa dalle plasmacellule, nonché da sottoinsiemi di linfociti citolitici quali cellule NK, cellule NKT o cellule T CD8 β . SLAMF7 viene a mapparsi sul cromosoma 1q23, ed è un gene spesso amplificato nel mieloma multiplo, e ciò lo rende un interessante bersaglio per la terapia. Diversamente da daratumumab od isatuximab, elotuzumab non provoca ADCC o citotossicità diretta.

1.12.3.6 Agenti diretti contro le fibrille di amiloide AL

La mortalità precoce è un problema estremamente significativo nell'amiloidosi AL, difatti il rischio di mortalità è del 35%-60% entro i primi 12 mesi dalla diagnosi, a

seconda di quale sia l'entità del coinvolgimento cardiaco. Lo stesso schema terapeutico Dara-CyBorD sembrerebbe non influenzare la mortalità precoce nell'amiloidosi AL in quanto esso è privo di un effetto diretto sul riassorbimento dell'amiloide. Negli ultimi anni v'è stato un grande interesse nello sviluppo di agenti che fossero mirati specificamente alle fibrille amiloidi, con la speranza che prevenire la deposizione di fibrille amiloidi, od ancora rimuovere fibrille precedentemente depositate, possa migliorare la prognosi dei pazienti con amiloidosi AL.

Dal momento che SAP è una proteina plasmatica che si lega, come per l'ATTR, alle fibrille amiloidi AL, essa potrebbe rappresentare un ideale bersaglio terapeutico, per questo si è sviluppato Dezamizumab, un MAb IgG1 anti-SAP umanizzato, in grado di legare SAP ed eliminare l'amiloide precedentemente contattata da SAP una volta che la SAP stessa sia stata rimossa tramite una piccola molecola chiamata Miridesap (262).

Birtamimab, un derivato umanizzato del MAb 2A4 murino, riconosce un epitopo criptico sulla fibrilla amiloide AL che si pensa sia esposta selettivamente dalle FLC scorrettamente ripiegate ed aggregate. In vitro, 2A4 si lega specificamente agli aggregati FLC sia solubili che insolubili e promuove la clearance di detti aggregati tramite la fagocitosi dei macrofagi Fc-mediata (304).

11-1F4 (CAEL-101) è un MAb murino reattivo nei confronti delle fibrille amiloidi, in grado di legare direttamente un epitopo localizzato esclusivamente su fibrille amiloidi derivate da catene leggere umane scorrettamente ripiegate. CAEL-101 contatta dette fibrille amiloidi e migliora la loro opsonizzazione, nonché la proteolisi mediata dal FcγR. Detto agente è attualmente oggetto di studio (305).

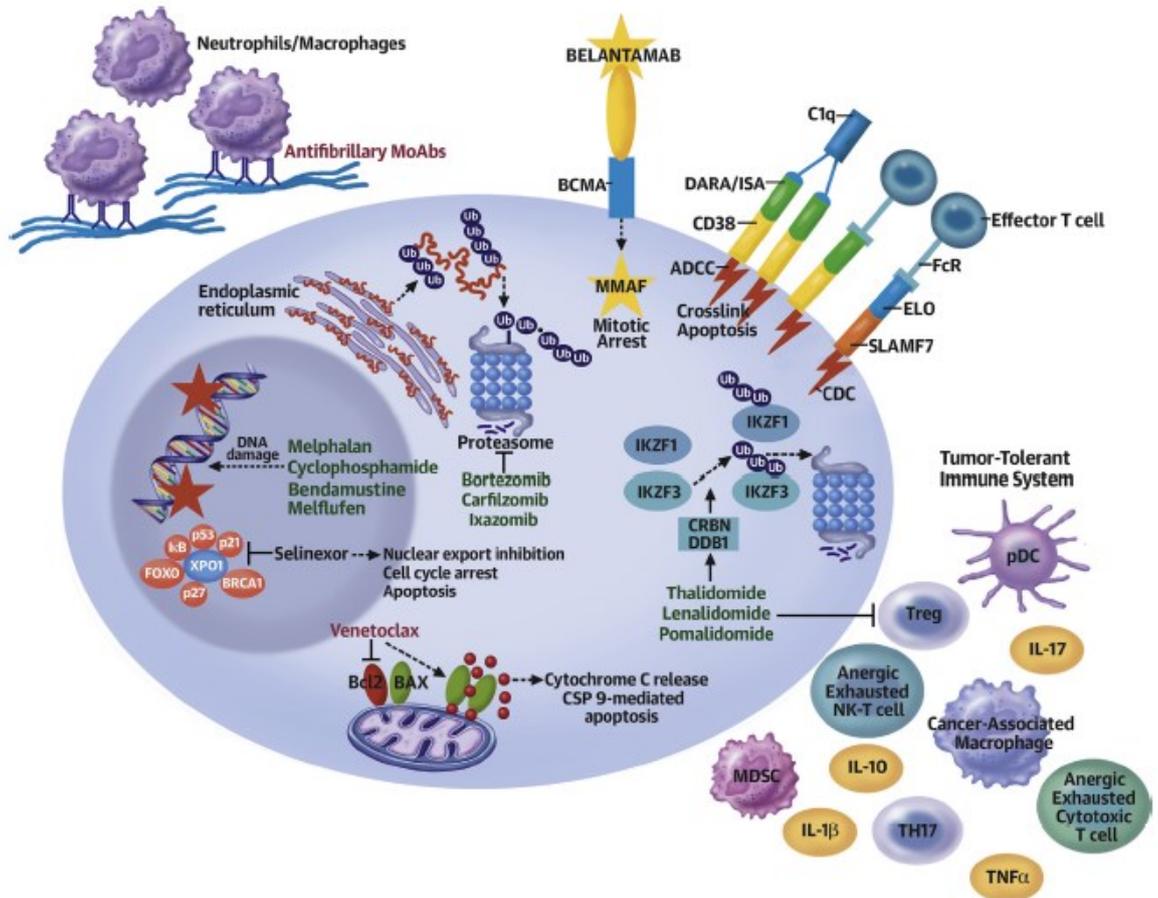
Venetoclax è un inibitore orale di BCL-2 che ha dimostrato di essere particolarmente efficace nell'amiloidosi AL, spesso con risposte significative e celeri pazienti pesantemente pretrattati (306)(307), cionondimeno è oggetto di studi in virtù dell'aumentata incidenza, nei pazienti allocati al braccio venetoclax di differenti studi, di eventi infettivi (308).

Belantamab mafoditin è un anticorpo monoclonale IgG1 afucosilato coniugato ad un agente antitubulare, la monometil-auristina-F (MMAF). Esso risulta essere diretto contro BCMA, un recettore di superficie per BAFF/APRIL che risulta essere espresso in maniera piuttosto specifica dalle plasmacellule; esso è in grado di espletare un'attività citotossica tramite il diretto rilascio di MMAF in sede intracellulare. Inoltre, parte dell'effetto citotossico si ha l'inibizione della segnalazione di BAFF/APRIL, un pathway che favorisce la sopravvivenza cellulare; in più promuove la ADCC tramite Fc(309).

Belantamab mafodotin induce remissioni ematologiche significative ed a lungo termine in pazienti con mieloma multiplo (pesantemente pretrattati) ed è ad oggi approvato dalla FDA nel mieloma multiplo recidivante e/o refrattario. Da segnalare tuttavia la sua tossicità dose-limitante che è rappresentata da una cheratopatia comunque reversibile. Gli studi clinici di belantamab mafodotin nei pazienti con amiloidosi AL sono attesi con impazienza (310).

Selinexor è un inibitore della proteina di esportazione nucleare, Exportin1 (XPO1). XPO1 risulta essere responsabile della regolazione nell'esportazione di proteine cargo dal nucleo al citoplasma, inclusi gli oncosoppressori p53, RB1 e p27, regolatori del ciclo cellulare e proteine antiapoptotiche. Bloccando la loro esportazione nucleare, selinexor inibisce la funzione di questi fattori, determinando una significativa attività antitumorale che può espletarsi in un'ampia gamma di neoplasie ematologiche e maligne solide.

Selinexor ha mostrato attività nei pazienti con mieloma multiplo pesantemente pretrattati ed è approvato dalla FDA nel MM recidivante e/o refrattario. Tra i suoi principali effetti collaterali, che ne impattano la tollerabilità, si ricordano citopenia, nausea, diarrea e anomalie elettrolitiche; queste sono osservate frequentemente e richiedono un'attenta terapia ausiliaria, nonché una adeguata selezione del paziente. Stanno emergendo casi clinici sull'attività del selinexor nell'amiloidosi AL e si prevede che gli studi clinici possano iniziare a breve in questa sottopopolazione di pazienti (311).



Bianchi, G. et al. J Am Coll Cardiol CardioOnc. 2021;3(4):467-487.

Figura 12: nell'immagine è possibile apprezzare i principali meccanismi d'azione degli agenti più frequentemente impiegati nella amiloidosi cardiaca da catene leggere, nonché i farmaci attualmente in sperimentazione. Gli inibitori del proteasoma agiscono inibendo la struttura proteica nota come proteasoma, deputata alla proteolisi, favorendo l'accumulo di protein polyubiquitinate. I farmaci immunomodulatori favoriscono la degradazione proteasoma mediante di Ikaros and Aiolos (IKZF1 e IKZF2, rispettivamente) incrementando così l'attività dei linfociti T ed NK. Gli anticorpi monoclonali DARA ed ISA causano la citotossicità dipendente da complemento, nonché la citotossicità dipendente da anticorpo, andando a legare il CD38. Il belantamab mafodotin, comporta il danneggiamento del DNA tramite il rilascio di MMAF. Selinexor blocca l'attività di esportina 1, XPO1. Venetoclax lega BCL2, favorendo un processo apoptotico mediato dall'attività della caspasi 9. I farmaci approvati dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti di America sono contrassegnati in verde, mentre i farmaci ancora oggetto di studio sono contrassegnati in rosso. DARA daratumumab; ELO elotuzumab; IL interleuchina; ISA isatuximab; MMAF monometil auristatina F; TNF α tumor necrosis factor alpha; MDSC myeloid derived suppressor cell; pDC cellula dendritica plasmocitoide; TH17 T helper 17; Treg linfocita T regolatore; Ub ubiquitina; XPO1 esportina 1.

Capitolo 2: Scopo dello studio

Questo studio si propone di analizzare le caratteristiche clinico-anamnestiche, elettrocardiografiche, ecocardiografiche e laboratoristiche dei pazienti affetti da Amiloidosi Cardiaca (AC), in carico all'Ambulatorio Specialistico per l'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, nel periodo compreso tra gennaio 2019 e maggio 2022.

Gli obiettivi dello studio sono i seguenti:

- Raccolta di dati anamnestici, strumentali e laboratoristici per ciascun paziente affetto da AC, nonché dati circa la sopravvivenza di detti pazienti nel medio termine ed eventuali ospedalizzazioni per scompenso cardiaco (SC);
- Elaborazione ed analisi dei dati raccolti con descrizione, delle caratteristiche dei pazienti affetti da AC da transtiretina wild-type (ATTRwt), AC da transtiretina ereditaria (ATTRv) ed AC da catene leggere (AL).
- Correlazione di variabili clinico strumentali considerate alla diagnosi e outcomes di mortalità od ospedalizzazione per scompenso cardiaco nel medio termine;
- Significato clinico di hs-cTnI alla diagnosi come possibile marcatore prognostico per outcomes di mortalità od ospedalizzazione per scompenso cardiaco nel medio termine.

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1 Popolazione dello studio

È stato condotto uno studio di tipo osservazionale e natura retrospettiva nel quale sono stati raccolti i dati relativi a pazienti adulti (età ≥ 18 anni) affetti da AC e seguiti presso l'Ambulatorio Specialistico per l'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedale-Università di Padova dal 2019 fino a maggio 2022. È stato valutato inoltre se, nel periodo compreso tra la data di diagnosi di ogni singolo paziente ed il 25 maggio 2022 (data di conclusione della raccolta dati), si fosse verificato il decesso del paziente od un ricovero ospedaliero per scompenso cardiaco.

I candidati per lo studio sono stati rintracciati a partire dal database dell'Ambulatorio Specialistico per l'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, all'interno del quale vengono registrati tutti i pazienti valutati presso il medesimo. E' stata inoltre inclusa una coorte di pazienti seguiti presso la Clinica Ematologica dello stesso istituto prima del 2019.

I criteri di inclusione adottati sono stati dunque i seguenti:

- Soggetti maschi e femmine di età ≥ 18 anni alla diagnosi di ATTRwt-AC;
- Soggetti maschi e femmine di età ≥ 18 anni alla diagnosi di ATTRv-AC;
- Soggetti maschi e femmine di età ≥ 18 anni alla diagnosi di AL-AC

I criteri di esclusione adottati sono stati dunque i seguenti:

- Soggetti maschi e femmine di età ≥ 18 anni che, pur avendo una diagnosi di Amiloidosi sistemica, non presentavano caratteristiche clinico-laboratoristico-strumentali di interessamento cardiaco;
- Soggetti che alla diagnosi di AC, indipendentemente dalla sottoclassificazione, non avevano entro un mese dalla diagnosi, un dato laboratoristico disponibile di hs-cTnI.

Le informazioni utili per la raccolta dei dati sono state reperite mediante il programma informatico *Galileo* (in dotazione all'Azienda Ospedale-Università di

Padova). Per tutti i parametri raccolti, si è fatto sempre riferimento a referti ufficiali, prodotti dai vari specialisti coinvolti nella gestione del paziente (Cardiologi, Ematologi, Neurologi, Radiologi, Medici di medicina di Laboratorio). Per quanto riguarda gli ecocardiogrammi, qualora non fosse disponibile un referto ufficiale, si è fatto riferimento alle note di diario clinico segnate nella cartella o si sono recuperate ed analizzate le immagini salvate nell'archivio dedicato (PACS).

I dati sono stati raccolti in un form appositamente progettato all'interno della piattaforma *Microsoft Excel*, ed organizzati distinguendo per ogni paziente aspetti anamnestici, elettrocardiografici, ecocardiografici, laboratoristici e di follow up. La raccolta dei dati è stata organizzata come di seguito.

3.2 Raccolta dati

Dati anagrafici:

- Nome e cognome del paziente;
- Data di nascita del paziente (gg-mm-aaaa);
- Sesso del paziente (M/F), indicando con 1 il sesso maschile e con 2 il sesso femminile;

Dati anamnestici relativi alla diagnosi di Amiloidosi Cardiaca:

- Data di diagnosi di AC. Per ATTR-AC, sia ereditaria che wild-type, si è considerata alternativamente la data di esecuzione di scintigrafia con traccianti osteotropi documentante captazione cardiaca, biopsia endomiocardica o biopsia del grasso periombelicale documentante depositi di transtiretina od ancora risonanza magnetica cardiaca compatibile con quadro di cardiomiopatia amiloidotica in quadro sistemico indicativo di ATTR-AC. Per AL-AC si è considerata alternativamente la data di esecuzione di biopsia endomiocardica o biopsia del grasso periombelicale documentante deposizione di catene leggere kappa o lambda, od ancora risonanza magnetica cardiaca compatibile con quadro di cardiomiopatia amiloidotica in quadro sistemico indicativo di AL-AC;
- Diagnosi di AL-AC, indicando con 1 la avvenuta diagnosi di Amiloidosi cardiaca da catene leggere e con 0 la mancata diagnosi;

- Diagnosi di ATTRwt-AC, indicando con 1 la avvenuta diagnosi di Amiloidosi cardiaca da transtiretina *wild-type* e con 0 la mancata diagnosi;
- Diagnosi di ATTRv-AC, indicando con 1 la avvenuta diagnosi di Amiloidosi cardiaca da transtiretina *ereditaria* e con 0 la mancata diagnosi;
- Metodologia di diagnosi. Indicando con una numerazione progressiva differenti esami di natura strumentale od istopatologica, si sono descritti gli esami a cui il paziente è stato sottoposto in relazione allo specifico quesito clinico, con risultato dell'esame compatibile con quadro di AC. Per 1 ci si riferisce alla biopsia endomiocardica, per 2 a qualsiasi biopsia extracardiaca (non GPO), per 3 scintigrafia con traccianti osteotropi, per 4 a risonanza magnetica cardiaca, per 5 alla biopsia del grasso periombelicale e per 6 all'ecocardiografia transtoracica.
- Esito della scintigrafia con traccianti osteotropici. Si è indicato con 0 la mancata esecuzione dell'esame sopracitato o l'avvenuta esecuzione dell'esame che ha tuttavia comportato assenza di captazione del tracciante da parte del miocardio. Rispettivamente con 1,2 e 3 si è indicata l'avvenuta esecuzione dell'esame che ha comportato captazione del tracciante da parte del miocardio con un associato Perugini Score di 1, 2 o 3.

Dati clinico-anamnestici:

- Diabete: paziente con precedente diagnosi di diabete mellito, indipendentemente dal tipo e dal trattamento. Si è indicato con 1 la presenza di diabete, con 0 l'assenza;
- Ipertensione arteriosa: paziente con precedente diagnosi di ipertensione arteriosa, indipendentemente dal trattamento. Si è indicato con 1 la presenza di ipertensione arteriosa, con 0 l'assenza;
- CAD significativa: paziente con pregresso infarto del miocardico in anamnesi, od alternativamente un intervento di rivascolarizzazione, sia esso di natura percutanea o chirurgica. Paziente con CAD significativa alla coronarografia od alla coro-TC. Con significativa ci si è riferiti ad un coinvolgimento del tronco comune >50% od ad un coinvolgimento degli altri vasi >70%. Si è indicato con 1 la presenza di CAD significativa, con 0 l'assenza;

- Fibrillazione atriale o flutter atriale: paziente che, precedentemente alla diagnosi od entro sei mesi dalla diagnosi di AC, ha presentato un episodio di fibrillazione atriale o di flutter atriale. Si è indicato con 1 la presenza di fibrillazione atriale o flutter atriale, con 0 l'assenza;
- PM/ICD: paziente che, precedentemente alla diagnosi od entro sei mesi dalla diagnosi di AC è stato sottoposto a posizionamento di *pace-maker* od *implantable cardioverter defibrillator*. Con 1 si è indicato il posizionamento di PM/CRT-P, con 2 il posizionamento di ICD/CRT-D, con 0 l'assenza di alcun posizionamento.
- SC sintomatico: paziente con quadro di scompenso cardiaco sintomatico alla diagnosi di AC, ad esempio anamnesi positiva per scompenso recente, accesso in pronto soccorso per scompenso cardiaco, od ancora necessità di aumento della terapia diuretica per la presenza di edemi declivi o dispnea da sforzo. Si è indicato con 1 la presenza di HF sintomatico, con 0 l'assenza;
- Classe funzionale New York Heart Association;
- Tunnel carpale: paziente affetto al momento della diagnosi o precedentemente trattato per sindrome del tunnel carpale. Si è indicato con 0 assenza di sindrome del tunnel carpale, con 1 sindrome del tunnel carpale monolaterale, con 2 sindrome del tunnel carpale bilaterale;
- Stenosi del canale lombare: paziente affetto al momento della diagnosi o con anamnesi patologica remota positiva per stenosi del canale lombare. Si è indicato con 1 la presenza di stenosi del canale lombare, con 0 l'assenza;
- Altra patologia osteoarticolare: paziente affetto da una patologia osteoarticolare ad esempio tenosinovite stenosante dei tendini flessori, coxartosi, periartrite scapolo-omerale. Si è indicato con 1 la presenza di altra patologia osteoarticolare, con 0 l'assenza;
- Macroglossia: paziente che, al momento della prima visita ambulatoriale, presenta macroglossia. Si è indicato con 1 la presenza di macroglossia, con 0 l'assenza;
- Segno di Popeye: paziente che, al momento della prima visita ambulatoriale, presenta segno di Popeye. Si è indicato con 0 l'assenza di

segno di Popeye, con 1 la presenza del segno di Popeye monolaterale, con 2 la presenza di segno di Popeye bilaterale.

- Disfunzione autonoma: paziente che, precedentemente alla diagnosi od entro sei mesi dalla diagnosi di AC, presenta un quadro di disfunzione autonoma. Indicando con una numerazione progressiva i possibili disordini autonomici di cui il paziente può essere affetto, ci si riferisce con 1 all'ipotensione ortostatica, con 2 alla disfunzione erettile, con 3 a disturbi dell'alvo quali stipsi o diarrea e con 4 a disordini genitourinari quali incontinenza.
- PAS e PAD: i valori di pressione arteriosa, sistolica e diastolica, valutati alla prima visita ambulatoriale, espressi in mmHg;
- Pregressa diagnosi di AL-AC: il paziente presenta in anamnesi una pregressa diagnosi di amiloidosi sistemica AL, che nel tempo ha comportato un successivo coinvolgimento cardiaco. Si è indicato con 1 la presenza di una pregressa diagnosi di Amiloidosi AL, con 0 la sua assenza;
- Data pregressa diagnosi AL-AC: nell'eventualità in cui il paziente avesse sviluppato un quadro di amiloidosi sistemica che solo in seconda istanza avesse coinvolto il distretto cardiaco, questo dato si riferiva al momento temporale in cui era stata posta diagnosi di Amiloidosi AL mediante prova istologica di coinvolgimento d'organo, come ad esempio una biopsia renale.

La redazione dei dati clinico-anamnestici si è basata sui referti delle prime visite ambulatoriali presso l'Ambulatorio Specialistico dell'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, od alternativamente, qualora possibile, sui dati anamnestici relativi ai nel caso di ricoveri dei pazienti contestuali alla data di diagnosi di AC. Tutte le notizie cliniche circa il paziente e le modalità di diagnosi sono state reperite dall'archivio di *Galileo*, qualora possibile.

Dati elettrocardiografici

- Data esecuzione ECG (gg-mm-aaaa);
- Frequenza cardiaca registrata all'esame elettrocardiografico, espressa in battiti per minuto (bpm);

- Fibrillazione atriale o flutter atriale: il tracciato evidenzia fibrillazione atriale o flutter atriale. Si è indicato con 1 presenza di fibrillazione atriale o flutter atriale, con 0 la sua assenza;
- Ritmo indotto da PM o ICD: il tracciato evidenzia ritmo indotto da PM o ICD. Si è indicato con 1 presenza di ritmo indotto da PM o ICD, con 0 la sua assenza;
- Bassi voltaggi nelle derivazioni periferiche: la definizione di bassi voltaggi utilizzata è stata quella della presenza, in tutte le derivazioni periferiche, di complessi QRS inferiori a 5 mm (0.5mV), includendo sia componenti positive sia negative del QRS. Si è indicato con 1 presenza di bassi voltaggi nelle derivazioni periferiche, con 0 la loro assenza;
- Blocco di branca destra: il tracciato evidenzia pattern di blocco di branca destra. Si è indicato con 1 presenza di blocco di branca destra, con 0 la sua assenza;
- Blocco di branca sinistra: il tracciato evidenzia pattern di blocco di branca sinistra. Si è indicato con 1 presenza di blocco di branca sinistra, con 0 la sua assenza;
- Pattern di pseudonecrosi anteriore: il tracciato evidenzia onde Q patologiche nelle derivazioni anteriori, compatibili con pattern di pseudonecrosi. Si è indicato con 1 presenza di pattern di pseudonecrosi anteriore, con 0 la sua assenza;
- Onde T invertite: il tracciato evidenzia la presenza di onde T invertite nelle derivazioni inferiori e/o laterali. Si è indicato con 1 presenza di onde T invertite, con 0 la loro assenza o la loro presenza secondaria ad un disturbo di conduzione od alla presenza di un ritmo indotto da PM.

Per la redazione dei dati elettrocardiografici si è fatto riferimento, qualora possibile, ad un tracciato eseguito in un periodo coerente con l'epoca di diagnosi. Nell'eventualità in cui non fosse stato disponibile un tracciato elettrocardiografico che soddisfacesse le caratteristiche poc'anzi citate, ci si è riferiti all'esame elettrocardiografico condotto durante la prima visita ambulatoriale.

Dati ecocardiografici:

- Data esecuzione ecocardiografia (gg-mm-aaaa)

- BSA, body area surface od area di superficie corporea, espressa in metri elevati al quadrato;
- Spessore del setto interventricolare, espresso in millimetri;
- Spessore della parete posteriore, espresso in millimetri;
- Volume ventricolare sinistro in telediastole, espresso in millilitri;
- Massa del ventricolo sinistro, espressa in grammi;
- Frazione d'eiezione del ventricolo sinistro, espressa in percentuale;
- Strain longitudinale globale, espresso in percentuale;
- Rapporto E/E', espresso come numero puro;
- Presenza di riempimento restrittivo: l'esame ecocardiografico evidenzia, nella valutazione del ventricolo sinistro, un pattern di riempimento di natura restrittiva. Si è indicato con 1 presenza di pattern di riempimento restrittivo, con 0 la sua assenza;
- Pressione sistolica stimata in arteria polmonare, espressa in mmHg, calcolata in base alla velocità massima del reflusso tricuspidalico;
- TAPSE, o tricuspid annular plane excursion, escursione sistolica del piano dell'anello tricuspide;
- Versamento pericardico: l'esame ecocardiografico evidenzia la sussistenza di un versamento pericardico. Si è indicato con 0 assenza di versamento pericardico, con 1 presenza di versamento pericardico di grado lieve, con 2 presenza di versamento pericardico di grado moderato, con 3 presenza di versamento pericardico di grado severo;
- Valvulopatia almeno moderata: l'esame ecocardiografico evidenzia la sussistenza di una valvulopatia almeno moderata, a carico della valvola aortica, mitrale o tricuspide. Si è indicato con 1 presenza di valvulopatia almeno moderata, con 0 la sua assenza;

Per la redazione dei dati ecocardiografici si è fatto riferimento, qualora possibile, ad esame ecocardiografico eseguito in un periodo coerente con l'epoca di diagnosi. Nell'eventualità in cui non fosse stato disponibile un esame ecocardiografico che soddisfacesse le caratteristiche poc'anzi citate, ci si è riferiti all'esame ecocardiografico condotto durante la prima visita ambulatoriale.

Qualora non fosse disponibile un referto ufficiale, si sono recuperate ed analizzate le immagini dall'archivio PACS. Ogni esame ecocardiografico è stato condotto, valutato e refertato mediante l'acquisizione di immagini come da linee guida congiunte della Società Americana di Ecocardiografia ed Associazione Europea di Imaging Cardiovascolare (312)(313).

Dati laboratoristici:

- Emoglobina, espressa in grammi/decilitro;
- Fosfatasi alcalina, espressa in unità internazionali/litro;
- Creatinina plasmatica, espressa in microgrammi/litro;
- Velocità di filtrazione glomerulare stimata, eGFR, espressa in ml/min e calcolata mediante formula MDRD;
- Albumina plasmatica, espressa in grammi/litro;
- Componente monoclonale sierica all'analisi elettroforetica delle proteine plasmatiche, espressa in grammi/litro;
- Catene leggere libere Kappa, espresso in milligrammi/litro;
- Catene leggere libere Lambda, espresso in milligrammi/litro;
- dFLC, ovvero la differenza tra la concentrazione del tipo catene leggere libere coinvolto nella patologia ed il tipo di catene leggere libere non coinvolto nella patologia. Viene calcolata come modulo della differenza dei valori di catene leggere libere kappa e catene leggere libere lambda;
- Proteinuria di Bence-Jones: presenza di proteinuria di Bence-Jones all'immunofissazione urinaria. Si è indicato con 1 la presenza di proteinuria di Bence-Jones, con 0 la sua assenza
- Proteinuria delle 24h, espressa in grammi
- Plasmacellule presenti a livello midollare, espresse in percentuale rispetto alla cellularità totale. Per reperire detto dato si è fatto riferimento, qualora possibile, al referto della biopsia osteomidollare diagnostica per discrasie plasmocellulari. Qualora detto referto non fosse stato disponibile, si è fatto riferimento al referto della prima visita ematologica ambulatoriale disponibile;
- Hs-cTnI, troponina I ad alta sensibilità, espressa in nanogrammi/litro: le concentrazioni di Hs-cTnI sono state rilevate, quando eseguite presso la

Azienda Ospedale-Università di Padova mediante metodica Abbott (*Abbott Architect Stat High Sensitive Troponin I assay*), che presenta un limite superiore di riferimento al 99° percentile di 16 ng/L per le donne e 34 ng/L per gli uomini; il limite di rilevazione è di 2 ng/L (314);

- Hs-cTnI di picco, espressa in nanogrammi/litro. Sono stati inclusi in questa colonna i valori di hs-cTnI misurati presso un'altra struttura di cui non si conoscesse il particolare test utilizzato.;
- Hs-cTnT, troponina T ad alta sensibilità, espressa in nanogrammi/litro;
- BNP, peptide natriuretico di tipo B, espresso in nanogrammi/litro;
- NT-pro-BNP, estremità N terminale del propeptide natriuretico di tipo B, espresso in nanogrammi/litro.

Per la redazione dei dati laboratoristici si è fatto riferimento a dati di laboratorio refertati in un periodo coerente con la diagnosi di AC, vale a dire entro 1 mese dalla data di diagnosi. Qualora non possibile, si è fatto riferimento a dati di laboratorio il più possibile prossimi alla data di diagnosi di AC. Tutti i dati laboratoristici sono stati reperiti dall'archivio di *Galileo*, qualora possibile.

Nella definizione delle analisi di sopravvivenza sono stati solamente considerati pazienti che, al momento della diagnosi di AC, avessero presentato un valore di hs-cTnI ottenuta mediante *Abbott assay*.

Sistema di staging di AL-AC e ATTR-AC

Al fine di condurre analisi di sopravvivenza, i pazienti sono stati stratificati mediante taluni sistemi di stadiazione. I pazienti affetti da AL-AC sono stati categorizzati mediante il Mayo Model 2004 (193) ed il Mayo Model 2012 (197)(198)(199), mentre i pazienti affetti da ATTR-AC sono stati stadiati mediante il Mayo Model 2004 ed il NAC ATTR staging (202). Per la stadiazione con il Mayo Model è stata impiegata la hs-cTnI alternativamente alla hs-cTnT, con cutoff di 95 ng/L e 70 ng/L per AL-AC e ATTR-AC rispettivamente; i valori dei cutoff per i peptidi natriuretici sono stati definiti come NTproBNP > 1800 ng/L o BNP > 400 ng/L per la AL-AC (97), e NTproBNP > 3000 ng/L o BNP > 250 ng/L per la ATTR-AC (202). Il NAC ATTR staging è stato impiegato per i pazienti con ATTR-AC, definendo tre classi utilizzando il cutoff di 45 ml/min/1.73m² per la velocità di filtrazione glomerulare stimata (eGFR) e 3000 ng/L per NTproBNP (o 250 ng/L per BNP).

Outcomes:

- Data ultimo contatto (gg-mm-aaaa);
- Decesso: si è indicato con 0 assenza di decesso, con 1 l'avvenuto decesso del paziente;
- Data del decesso (gg-mm-aaaa), in caso di avvenuto decesso;
- Prima ospedalizzazione per scompenso cardiaco: paziente con avvenuta ospedalizzazione per scompenso cardiaco in un periodo successivo alla diagnosi di AC. Si è indicato con 1 l'avvenuta ospedalizzazione per scompenso cardiaco in un periodo successivo alla diagnosi, con 0 l'assenza di questa;
- Data della prima ospedalizzazione per scompenso cardiaco (gg-mm-aaaa).

Ogni soggetto è stato seguito nei mesi successivi alla diagnosi di AC, e per ciascuno di essi è stata riportata una data che può corrispondere alternativamente al suo decesso od all'ultimo contatto con l' Azienda Ospedale-Università di Padova (non obbligatoriamente associato all'attività dell'Ambulatorio specialistico). La differenza in mesi tra la data di decesso o di ultimo contatto e la data di diagnosi di Amiloidosi Cardiaca ha rappresentato il dato di follow up. Qualora non fossero stati disponibili dati circa l'eventuale ricovero per scompenso cardiaco dopo diagnosi di AC od il decesso del paziente nell'archivio Galileo, si è fatto ricorso al contatto telefonico del paziente per sincerarsi circa il suo stato di salute.

3.3 Analisi statistica

Le variabili categoriali sono presentate come numeri assoluti e percentuali (%) mentre le variabili continue sono presentate come mediane (con intervalli interquartili, IQR). Per i confronti delle variabili categoriali tra i gruppi, sono stati utilizzati il test chi quadrato di Pearson e il test esatto di Fisher, come appropriato. Per il confronto delle variabili continue tra due gruppi, è stato utilizzato il test t di Student non appaiato per campioni indipendenti per le variabili normalmente distribuite e il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per variabili non normalmente distribuite.

Per valutare la performance prognostica della troponina I ad alta sensibilità, sono state prodotte delle curve Receiver operating characteristic (ROC) con le rispettive aree sotto la curva (AUC) nei confronti dell'outcome di interesse (mortalità). Successivamente, con test di Youden, sono stati selezionati i cutoffs migliori per massimizzare sensibilità e specificità.

Il log-rank test e le analisi di sopravvivenza secondo Kaplan Meier sono state utilizzate per confrontare la sopravvivenza dei pazienti con hs-cTnI maggiore o inferiore al cutoff prescelto, da sola o in combinazione con gli altri parametri utilizzati negli staging system già validati. L'analisi di regressione di Cox con modello univariato e multivariato è stata utilizzata per verificare i determinanti di mortalità nei pazienti con AL-AC, in cui il numero di eventi avversi durante il follow-up lo consentiva (il numero di variabili nei modelli è stato limitato per mantenere un rapporto 1:10 tra covariate ed eventi avversi per evitare overfitting). Per i pazienti con ATTR-AC, per cui il follow-up è risultato più breve e il numero di eventi minore, è stata utilizzata la regressione logistica per verificare il ruolo di hs-cTnI come variabile continua (log-transformed) come determinante di mortalità e di outcome combinato di mortalità e ricovero per scompenso.

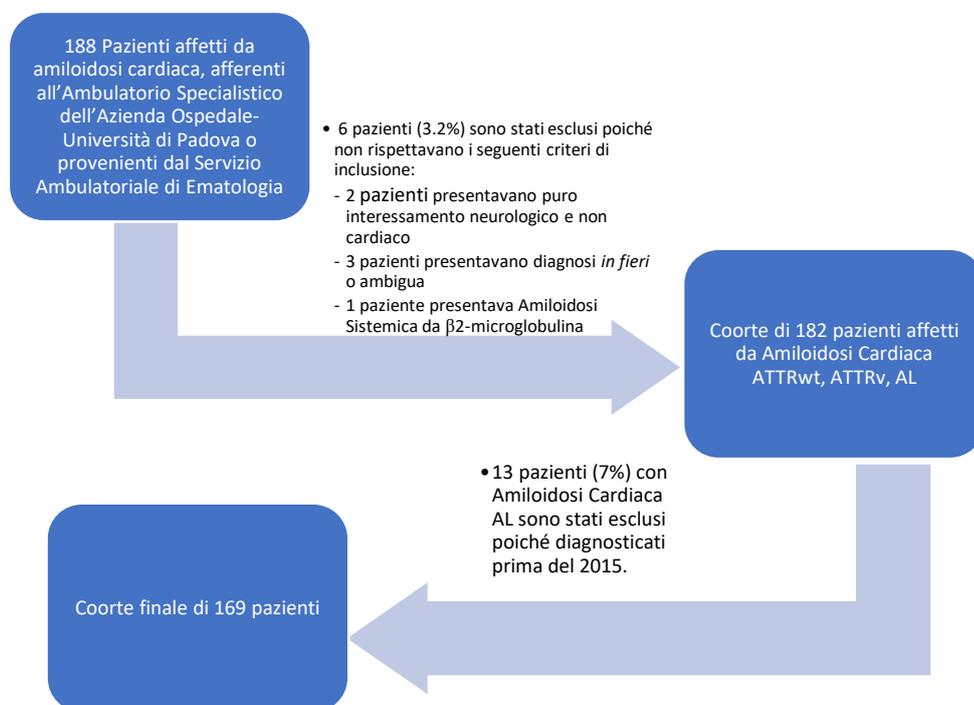
I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS versione 27.0 (IBM). Per tutte le analisi statistiche, $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

Capitolo 4: Risultati

4.1 Caratteristiche della popolazione

4.1.1 Caratteristiche demografiche della popolazione

Sono stati selezionati 188 valutati afferenti all'Ambulatorio Specialistico dell'Azienda Ospedale-Università di Padova o provenienti dal Servizio Ambulatoriale di Ematologia. Di questi, 169 sono stati selezionati a comporre la popolazione di studio, in quanto essi rispettavano i criteri di inclusione e di esclusione citati nel *Capitolo 3 Paragrafo 1*. Nella flowchart sottostante viene riportato il processo di selezione dei pazienti al fine di comporre la popolazione oggetto di questo studio.



Le principali caratteristiche demografiche della popolazione oggetto di studio sono riassunte nella tabella VI:

Variabile	Overall N=169	ATTR (wt+v) N= 99	AL N=70	P value
Sesso (M), n (%)	137(81.1)	92 (93)	45 (64)	<0.001
Età alla diagnosi, mediana (IQR)	74 (68, 80)	78 (72, 82)	69.5 (60, 76)	<0.001
ATTR v, n (%)	11 (6.5)	11 (11)	NA	NA

Tabella VI: caratteristiche demografiche della popolazione studiata

Considerando l'intera popolazione oggetto di studio, 137 erano di sesso maschile (81.1%), mentre 32 erano di sesso femminile (18.9%). Considerando la sottopopolazione di pazienti affetti da ATTR-AC, 92 erano di sesso maschile (93%) e 7 erano di sesso femminile (7%). Considerando la sottopopolazione di pazienti affetti da AL-AC, 45 erano di sesso maschile (64%) e 25 erano di sesso femminile (36%). Considerando l'intera popolazione oggetto di studio, l'età media dei pazienti alla diagnosi era di 74 anni, il range interquartile si collocava tra 68 anni ed 80 anni. Considerando la sottopopolazione di pazienti affetti da ATTR-AC, l'età media dei pazienti alla diagnosi era di 78 anni, il range interquartile si collocava tra 72 ed 82 anni. Considerando la sottopopolazione di pazienti affetti da AL-AC, l'età media dei pazienti alla diagnosi era di 69 anni e mezzo, il range interquartile si collocava tra 60 e 76 anni.

Dei 99 pazienti con ATTR-AC, 11 pazienti presentavano una forma ATTRv-AC (11%), mentre 88 pazienti presentavano un quadro di ATTRwt-AC. In figura 13, e 14a e 14b è possibile apprezzare la distribuzione per sesso e per età della popolazione oggetto di studio, analizzata nel suo complesso e per sottogruppi.

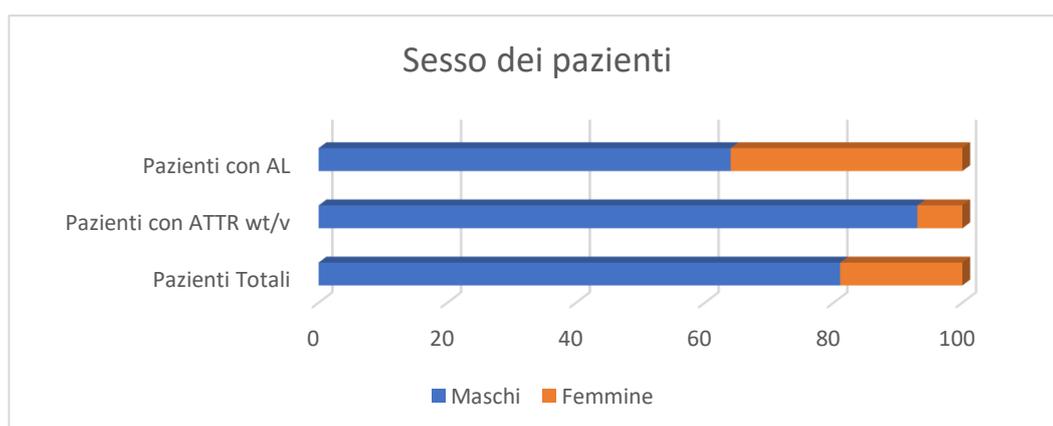


Figura 13: distribuzione per sesso nella popolazione studiata

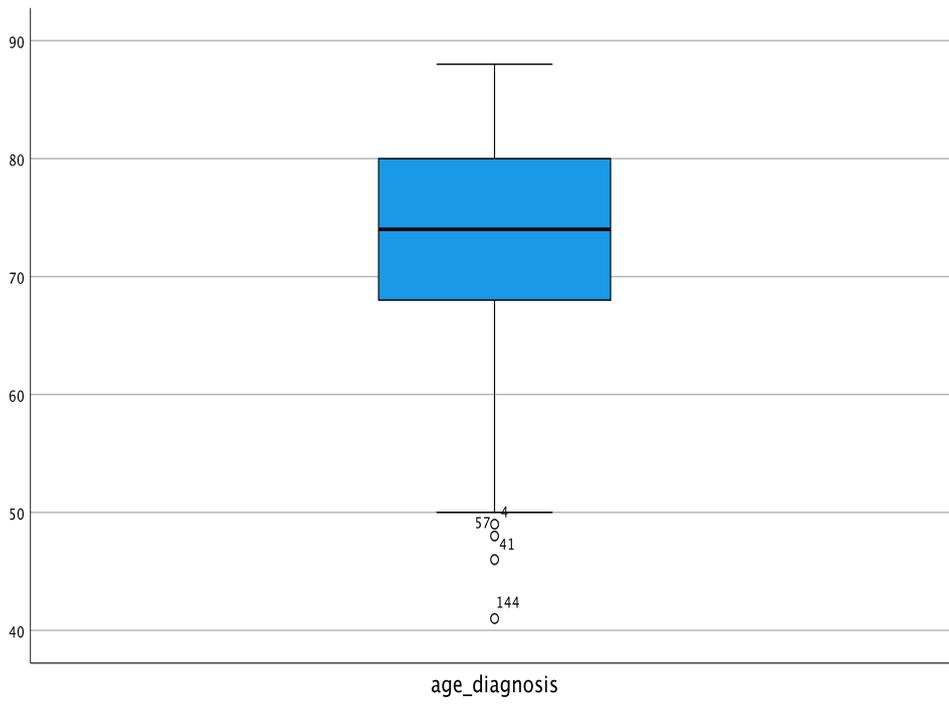


Figura 14a: distribuzione per età alla diagnosi nella popolazione studiata (overall)

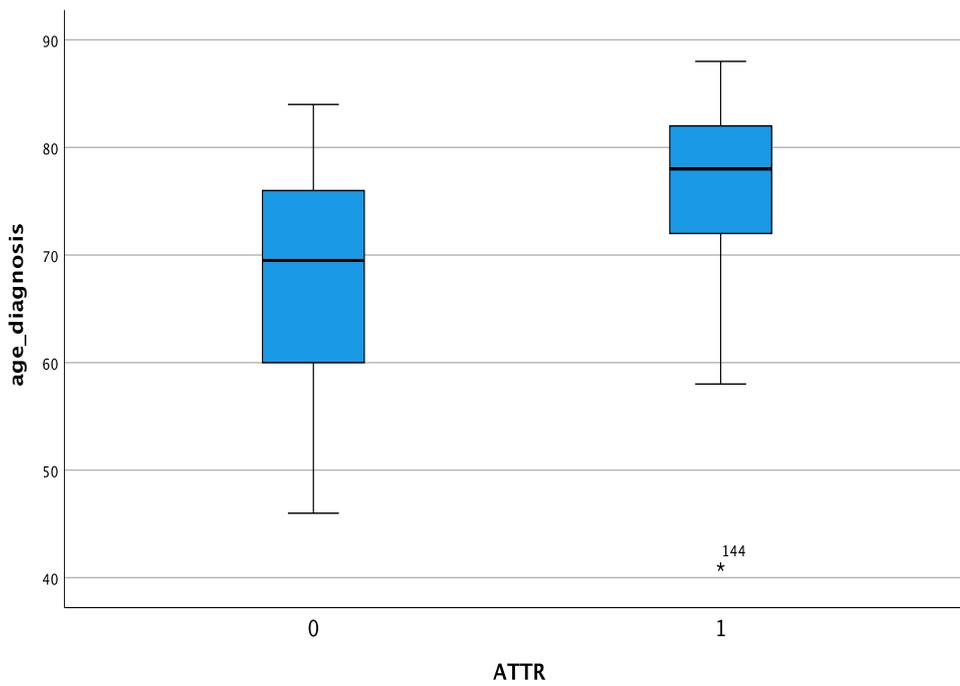


Figura 14b: distribuzione per età alla diagnosi nelle due sottopopolazioni (0=AL 1=ATTR)

4.1.2 Caratteristiche relative alla modalità di diagnosi

Le caratteristiche relative alla modalità di diagnosi della popolazione oggetto di studio sono riassunte nella tabella VII:

Modalità di diagnosi	Overall N=169	ATTR (wt+v) N=99	AL N=70	P value
BEM, n (%)	21 (12.4)	7 (7.1)	14 (20)	0.012
Biopsia extra-cardiaca (no GPO), n(%)	27(16)	2 (2)	25 (36)	<0.001
Scintigrafia con tracciante osseo, n (%)	90(53.3)	89 (90)	<u>NA</u>	<u>NA</u>
Perugini 2-3, n (%)	79/161 (49)	79 (87)	0 (0)	<0.001
RM cardiaca, n (%)	99 (58.6)	60 (61)	39 (56)	0.525
GPO, n (%)	50 (29.6)	13 (13)	37 (53)	<0.001

Tabella VII: caratteristiche relative alla modalità di diagnosi della popolazione studiata

Per quanto concerne la popolazione totale oggetto di studio, si nota come il 12.4% abbia eseguito una biopsia endomiocardica documentante la presenza di depositi di amiloide, il 16% abbia eseguito una biopsia extracardiaca (tratto gastro-intestinale, parenchima epatico, parenchima renale, tessuto ghiandolare salivare), il 53% abbia eseguito una scintigrafia con tracciante osteotropo, il 58.9% abbia eseguito una Risonanza Magnetica Cardiaca ed il 29.6% ha eseguito una biopsia del grasso periombelicale. Considerando invece la sottopopolazione di pazienti affetti da ATTR-AC, si apprezza come solamente il 7% ed il 2% rispettivamente nel proprio iter diagnostico è stato sottoposto ad una biopsia endomiocardica od una biopsia extracardiaca, con un 13% di pazienti che ha eseguito la biopsia del grasso periombelicale. Per quanto riguarda la scintigrafia con tracciante osteotropo, il 90% dei pazienti con ATTR-AC ha eseguito detto esame nel proprio iter diagnostico, e, di questi, l'89% ha avuto alternativamente un esito "Perugini 2" od un "Perugini 3". Il 61% dei pazienti con ATTR-AC ha eseguito la Risonanza Magnetica Cardiaca. Valutando la popolazione con AL-AC, il 20% dei pazienti ha eseguito una biopsia endomiocardica, il 36% ha eseguito una biopsia extracardiaca ed più di un paziente su due (53%) ha eseguito la biopsia del grasso periombelicale. Il 56% dei pazienti afferenti a questa sottopopolazione ha eseguito la Risonanza Magnetica Cardiaca. L'analisi relativa alla distribuzione dei pazienti che nel proprio percorso diagnostico ha effettuato RMC ha presentato un P value di 0.525. Per

quanto riguarda le altre analisi, esse sono risultate statisticamente significative, con un P value <0.05.

4.1.3 Caratteristiche relative alle comorbidità

Le caratteristiche relative alle comorbidità della popolazione oggetto di studio sono riassunte nella tabella VIII:

Comorbidità	Overall N=169	ATTR (wt+v) N= 99	AL N=70	P value
NYHA >2, n (%)	45 (26.6)	20 (24)	25 (42)	0.024
Iperensione arteriosa, n (%)	106(62.7)	72 (73)	34 (49)	0.001
Diabete mellito, n (%)	24(14.2)	17 (17)	7 (10)	0.19
CAD significativa, n (%)	35(20.7)	27 (27)	8 (11)	0.012
FA/flutter, n (%)	75(44.4)	60 (60)	15 (21)	<0.001
PM/ICD				0.017
PM, n (%)	12(7.1)	10 (10)	2 (2.9)	
ICD, n (%)	10(5.9)	9 (9.1)	1 (1.4)	
HF sintomatico alla diagnosi, n (%)	86(50.9)	58 (59)	28 (40)	0.017
Tunnel carpale				<0.001
Monolaterale, n (%)	18(10.7)	16 (16)	2 (2.9)	
Bilaterale, n (%)	60(35.5)	55 (56)	5 (7.1)	
Stenosi spinale lombare, n (%)	15(8.9)	14 (14)	1 (1.4)	0.004
Segno di Popeye				<0.001
Monolaterale, n (%)	13(7.7)	13 (13)	0 (0)	
Bilaterale, n (%)	5(3)	5 (5.1)	0 (0)	
Altra patologia osteoarticolare, n (%)	52(30.8)	37 (37)	15 (21)	0.027
Disfunzione autonoma, n (%)	22(13)	16 (16)	6 (8.7)	0.15
Macroglossia, n (%)	10 (5.9)	1 (1)	9 (13)	0.001

Tabella VIII: caratteristiche relative alle comorbidità della popolazione studiata

Per quanto riguarda la classe funzionale New York Heart Association, il 26.6% della popolazione totale oggetto di studio presentava una NYHA class superiore a 2. Detto quadro si apprezzava nel 24% dei pazienti con ATTR-AC e nel 42% dei pazienti con AL-AC. Il 62.7% dei pazienti afferenti all'intera popolazione oggetto di studio era iperteso, mentre il 14.2% era diabetico. Considerando la sottopopolazione di soggetti presentanti ATTR-AC il 73% era iperteso ed il 17% diabetico. Percentuali inferiori di soggetti ipertesi e diabetici si riscontravano nella sottopopolazione di soggetti con AL-AC, 49% e 10% rispettivamente.

Il 20.7% del totale della popolazione analizzata presentava anamnesi patologica positiva per CAD, ed il 50.9% manifestava scompenso cardiaco sintomatico alla diagnosi. Nel caso di pazienti ATTR-AC, il 27% presentava coronaropatia significativa in anamnesi, contro l'11% dei pazienti con AL-AC. I quadri di scompenso cardiaco sintomatico alla diagnosi erano del 59% nel caso di pazienti con ATTR-AC, del 40% nei pazienti con AL-AC.

Considerando il quadro di patologie aritmiche, il 44.4% dei pazienti totali presentava, prima della data di diagnosi od entro sei mesi dalla stessa, fibrillazione atriale o flutter atriale, dato che saliva al 60% considerando la sottopopolazione di soggetti con ATTR-AC e che invece era del 21% nel caso di soggetti con AL-AC.

Il 13% della popolazione totale oggetto di studio era portatore di PM o ICD; la maggior parte di questi presentava amiloidosi cardiaca da transtiretina (86% del totale di pazienti portatori di PM o ICD), mentre solo una piccola proporzione di pazienti con AL-AC aveva un PM od un ICD al momento della diagnosi.

Tutte le sopracitate analisi sono risultate statisticamente significative, con un P value <0.05, meno quella relativa alla distribuzione del diabete mellito nei due sottogruppi, non statisticamente significativa.

Relativamente alle comorbidità di interesse non cardiovascolare, si è evidenziata una differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei casi di sindrome di tunnel carpale monolaterale e bilaterale nelle due sottopopolazioni affette rispettivamente da ATTR-AC e AL-AC. Il 46.2% della popolazione totale presentava alternativamente sindrome del tunnel carpale monolaterale o sindrome del tunnel carpale bilaterale. Valutando nello specifico i pazienti affetti da ATTR-AC, il 56% di questi presentava sindrome del tunnel carpale bilaterale, il 16% sindrome del tunnel carpale bilaterale.

Ergo, il 72% di questa sottopopolazione manifestava detta condizione, molto meno rappresentata nel caso della sottopopolazione affetta da AL-AC, presente solo nel 10% dei casi (7.1% a coinvolgimento bilaterale, 2.9% a coinvolgimento monolaterale). La stenosi spinale lombare ed il segno di Popeye erano anch'essi maggiormente presenti nella sottopopolazione affetta da ATTR-AC, difatti il 14% di questi presentava stenosi del canale lombare contro l'1% di casi nei pazienti con

AL-AC. Il 18% dei pazienti con ATTR-AC presentava all'esame obiettivo segno di Popeye (13% monolaterale, 5% bilaterale), mentre nessun paziente con AL-AC presentava segno di Popeye. Analizzando invece la distribuzione di macroglossia nel campione di pazienti, si osserva come il 5.9% della popolazione totale valutata presentava macroglossia all'esame obiettivo; nella sottopopolazione con AL-AC questa percentuale era del 13%, dell'1% nel caso della sottopopolazione con ATTR-AC.

Considerando la presenza di altre patologie di interesse osteoarticolare, quali periartrite scapolo-omerale, gonartrosi, coxartrosi od ancora dito a scatto, si è potuto evidenziare come il 30.8% della popolazione totale presentasse detto genere di patologie; tuttavia, il 37% dei pazienti con ATTR-AC risultava affetto da una delle predette condizioni, solo il 21% dei soggetti con AL-AC manifestava dette patologie. Tutte le sopracitate analisi hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le sottopopolazioni di studio, con un P value <0.05. Per quanto concerne la presenza di disfunzioni autonome, si è evidenziata una percentuale di affetti del 16% nella popolazione con ATTR-AC, ed una percentuale del 8.7% nei pazienti con AL-AC; tuttavia, il P value è risultato in questo caso superiore alla soglia per la significatività statistica.

4.1.4 Caratteristiche relative agli indici antropometrici

Le caratteristiche relative agli indici antropometrici della popolazione oggetto di studio sono riassunte nella tabella IX:

Variabile	Overall N=169	ATTR (wt+v) N= 99	AL N=70	P value
Parametri				
BMI, mediana (IQR)	24.5 (23, 27.5)	25.5 (23, 28)	24.5 (22, 26)	0.028
Frequenza cardiaca bpm, mediana (IQR)	73 (65, 85)	72 (64, 81)	75 (67, 86)	0.094
PAS mmHg, mediana (IQR)	120 (110, 135)	120 (110, 140)	115 (110, 130)	0.012
PAD mmHg, mediana (IQR)	80 (70, 80)	80 (70, 81)	75 (60, 80)	0.034

Tabella IX: caratteristiche relative agli indici antropometrici della popolazione studiata

Considerando l'indice di massa corporea, calcolato come rapporto tra peso del paziente, espresso in chilogrammi, e quadrato dell'altezza del paziente, espresso in metri, la mediana della popolazione generale era 24.5 kg/m², con un range interquartile tra 23 e 27.5 kg/m². Si è evidenziata una differenza statisticamente significativa (con P=0.028) a livello delle distribuzioni di valori di BMI nelle due sottopopolazioni oggetto di studio. Per quanto riguarda la mediana della frequenza cardiaca nella popolazione generale, essa è risultata 73 bpm, con un range interquartile compreso tra 65 ed 85 bpm. Non vi erano differenze clinicamente impattanti tra le due mediane di frequenza cardiaca nelle due sottopopolazioni. Analizzando invece la pressione arteriosa, nella popolazione generale la mediana è risultata essere 120/80 mmHg, con un range interquartile compreso tra 110 e 135 mmHg per la pressione arteriosa sistolica, compreso tra 70 e 80 mmHg per la pressione arteriosa diastolica. La sottopopolazione affetta da ATTR-AC ha presentato valori medi di pressione arteriosa più elevati rispetto a quelli della sottopopolazione affetta da AL-AC, con una differenza che è risultata statisticamente significativa.

4.2 Caratteristiche elettrocardiografiche

Dei 169 pazienti analizzati, sono risultati disponibili 168 ECG. La tabella X riassume le principali caratteristiche elettrocardiografiche registrate mediante ECG nella popolazione oggetto di studio, e nelle due sottopopolazioni con ATTR-AC e AL-AC, rispettivamente:

Variabile	Overall N=169	ATTR (wt+v) N= 99	AL N=70	P value
Parametri				
Elettrocardiogramma (disponibile per 168 pazienti)				
Mesi tra diagnosi e ECG, mediana (IQR)	1 (0,5)	0 (1, 5)	0 (0, 5)	0.31
Aritmia da FA/flutter, n (%)	50 (29.6)	43 (43)	7 (10)	<0.001
Ritmo da PM/ICD, n (%)	12 (7.1)	9 (9.1)	3 (4.3)	0.24
Bassi voltaggi periferici, n (%)	59 (34.9)	28 (28)	31 (45)	0.026
BBsin, n (%)	8 (4.7)	6 (6.1)	2 (2.9)	0.47
BBdx, n (%)	29(17.1)	19 (19)	10 (15)	0.43
Pseudonecrosi anteriore, n (%)	33 (19.5)	20 (20)	13 (19)	0.83
Onde T invertite infero-laterali, n (%)	28 (16.6)	17 (17)	11 (16)	0.83

Tabella X: caratteristiche elettrocardiografiche della popolazione studiata

La valutazione elettrocardiografica è stata di norma condotta entro un mese dalla diagnosi. Sempre in riferimento alla popolazione generale, 50 pazienti (29.6%) presentavano un'aritmia da FA o da flutter atriale all'ECG, e 12 pazienti (7.1%) un ritmo indotto da un *pace-maker* o da un *implantable cardioverter defibrillator*. Un totale di 59 pazienti (34.9%) della popolazione generale presentava bassi voltaggi alle derivazioni periferiche, 33 pazienti (19.5%) un pattern di pseudonecrosi con complessi QS nelle derivazioni anteriori ed in 28 pazienti (16.6%) onde T invertite nelle derivazioni infero-laterali. 8 pazienti (4.7%) presentava all'ECG un blocco di branca sinistra, 29 (17.1%) un blocco di branca destra.

Analizzando singolarmente le due sottopopolazioni oggetto di studio, si è potuto definire come 43 (43%) tra i pazienti affetti da ATTR-AC avessero una aritmia da FA o flutter atriale, mentre solo 7 (10%) dei soggetti affetti da AL-AC avessero detta aritmia (P <0.001). 28 pazienti (28%) con ATTR-AC e 31 pazienti (45%) con AL-AC

hanno presentato bassi voltaggi nelle derivazioni periferiche dei loro tracciati elettrocardiografici.

Per quanto concerne il pattern di pseudonecrosi anteriore, esso è stato osservato nel 20% dei pazienti con ATTR-AC e nel 19% dei pazienti con AL-AC; si è apprezzata la presenza di T invertite nelle derivazioni infero-laterali degli ECG di 17 pazienti con ATTR-AC (17%) e nel 16% (11 pazienti) con AL-AC. Il blocco di branca sinistra è stato osservato in 6 pazienti (6.1%) con ATTR-AC e 2 pazienti (2.9%) con AL-AC; al contrario, il blocco di branca destra si è documentato in 20 pazienti (20%) e 13 pazienti (19%) per le due sottopopolazioni rispettivamente. In riferimento a queste ultime analisi, nessuna ha presentato un P value inferiore a 0.05.

Le caratteristiche elettrocardiografiche della popolazione totale, della sottopopolazione ATTR-AC e della sottopopolazione AL-AC si possono apprezzare nella figura 15:

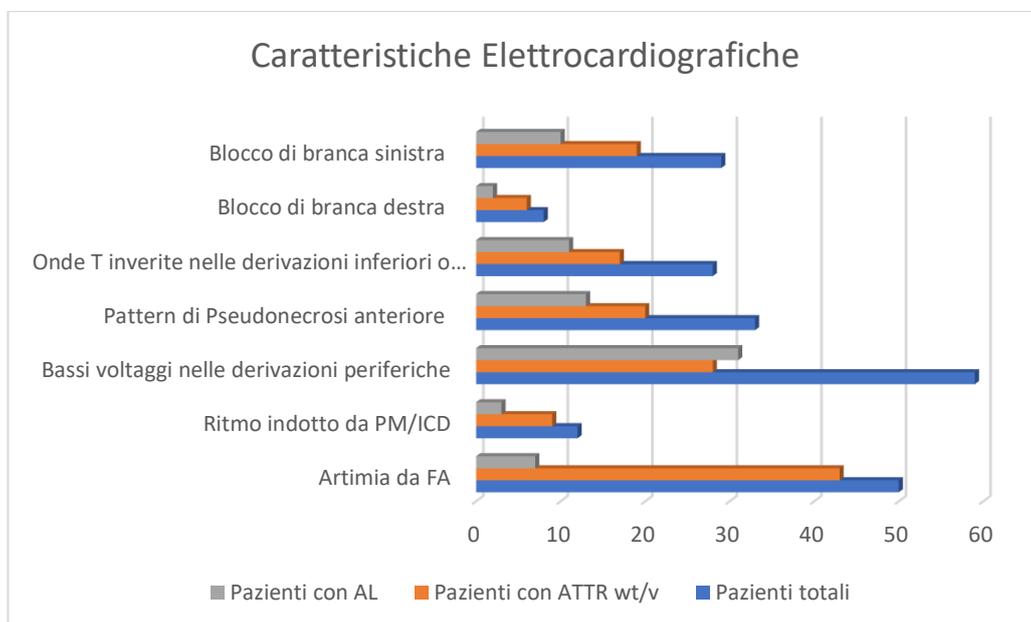


Figura 15: riassunto di principali aspetti elettrocardiografici della popolazione indagata

4.3 Caratteristiche ecocardiografiche

Un ecocardiogramma transtoracico è risultato disponibile per 167 pazienti sui 169 totali valutati. Non tutte le variabili sono risultate sempre disponibili nei referti analizzati durante il processo di raccolta dati. La tabella XI riassume le principali caratteristiche ecocardiografiche registrate mediante ecocardiografia con color doppler transtoracica nella popolazione oggetto di studio, e nelle due sottopopolazioni con ATTR-AC e AL-AC, rispettivamente:

Variabile	N disponibile	Overall	ATTR (wt+v) N= 99	AL N=68	P value
SIV mm, mediana (IQR)	165	17 (15, 19)	18 (16, 20)	15 (14, 18)	<0.001
PP mm, mediana (IQR)	165	15 (13, 17)	15 (14, 17)	14 (12, 17)	0.004
VTDi ml/mq, mediana (IQR)	165	54 (44, 64)	56 (44, 70)	53 (44, 61)	0.124
LV mass index gr/m ² , mediana (IQR)	164	155 (130, 186)	168 (143, 201)	135 (112, 172)	<0.001
Atrio sin volume index, mediana (IQR)	165	46 (37, 54)	49 (42, 58)	40 (32, 51)	<0.001
LVEF %, mediana (IQR)	167	54 (47, 59)	54 (45, 59)	55 (50, 60)	0.11
GLS %, mediana (IQR)	111	-11 (-13, -8)	-12 (-13, -8)	-11 (-15, -7)	0.94
E/e' mediana (IQR)	148	15.6 (12.5, 21)	15.6 (12.45, 19.33)	15.7 (12.4, 23.3)	0.66
Pattern restrittivo, n (%)	166	39 (24)	20 (20)	19 (28)	0.224
PAPs mmHg, mediana (IQR)	140	34 (26, 40)	35 (28, 43)	32 (25, 38)	0.065
TAPSE mm, mediana (IQR)	143	18 (15, 21)	17 (15, 20)	19 (15, 23)	0.084
Valvulopatia almeno moderata, n (%)	167	31 (19)	20 (20)	11 (16)	0.51
Versamento pericardico	162				0.021
Lieve, n (%)		43 (27)	18 (19)*	25 (38)*	
Moderato, n (%)		4 (2.5)	2 (2.1)	2 (3)	
Severo, n (%)		0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Tabella XI: caratteristiche ecocardiografiche della popolazione studiata

L'esame ecocardiografico, in riferimento alla popolazione generale, è stato di norma condotto in concomitanza alla diagnosi di AC. Di 167 esami ecocardiografici condotti, 165 hanno valutato lo spessore del setto interventricolare e della parete posteriore: la mediana dei valori di spessore del setto interventricolare è risultata, per la popolazione generale, 17mm (IQR 15-19 mm), mentre per la parete posteriore è risultata 15 mm (IQR 13-17 mm). Il volume telediastolico del ventricolo sinistro, valutato in 165 esami, ha presentato una mediana di 54 ml/mq (IQR 44-64 ml/mq) mentre l'indice di massa ventricolare sinistra, espresso in g/m², ha presentato una mediana di distribuzione di 155 g/m², con IQR compreso tra 130 e 186 g/m². Considerando invece il volume index dell'atrio sinistro, disponibile per 165 pazienti, si è evidenziata una mediana di distribuzione di 46 con un range interquartile compreso tra 37 e 54. La frazione di eiezione del ventricolo sinistro, calcolata come una percentuale e presente in tutte le 167 ecografie, ha presentato come mediana 54% (IQR 47-59%). Lo strain longitudinale globale, definito in percentuale ed ottenuto in 111 ecografie, ha avuto come mediana -11%, con un IQR compreso tra -13% e -8%. Il rapporto tra onda E ed onda E', importante marker di pressione di riempimento ventricolare, per il quale un valore elevato indica un'aumentata stiffness ventricolare sinistra, è stato analizzato in 148 ecocardiografie, ed ha presentato una mediana di 15.6 (IQR 12.5-21). Non si sono apprezzate significative differenze tra i sottogruppi analizzati. La presenza di pattern restrittivo, in riferimento alle 166 ecocardiografie che lo hanno ricercato, si è osservata in 39 pazienti (24%). La pressione sistolica in arteria polmonare o PAPs, espressa in mmHg, si è ottenuta in 140 ecocardiografie, ed ha presentato una mediana di 34mmHg con un IQR compreso tra 26 e 40mmHg. Il parametro TAPSE, definente l'escursione del piano valvolare tricuspidalico, è stato valutato in 143 ecografie; la mediana dei valori di TAPSE nella popolazione totale oggetto di studio è risultata di 18 millimetri, con un range interquartile tra 15 e 21 millimetri. 31 pazienti su 167 investigati (19%) hanno presentato una valvulopatia di grado almeno moderato, mentre 43 pazienti su 162 investigati (27%) hanno presentato un versamento pericardico di grado lieve: solo in 4 pazienti (2.5%) si è osservato un quadro di versamento pericardico moderato ed in nessun paziente si è osservato un quadro di versamento pericardico severo.

Considerando ora l'analisi delle sottopopolazioni, si è potuto evidenziare come sussista una differenza statisticamente significativa (con $P < 0.001$) nelle mediane dei valori di spessore del setto interventricolare in riferimento alla popolazione affetta da ATTR-AC (18mm con IQR 16-20 mm) e affetta da AL-AC (15mm con IQR 14-18mm). Si è inoltre evidenziata una differenza statisticamente significativa, tra la mediana dei valori di spessore di parete posteriore nel sottogruppo affetto da ATTR-AC (15mm, IQR 14-17 mm), e Amiloidosi AL (14mm, IQR 12-17). La mediana dei valori di frazione di eiezione nei pazienti con ATTR-AC è risultata 54% (IQR 45-59%), mentre nel gruppo di pazienti con AL-AC è risultata di 55% (IQR 50-60%). Valutando l'indice di massa ventricolare sinistra si è potuto apprezzare come, nella popolazione affetta da ATTR-AC, esso abbia avuto una mediana dei valori di 168 g/m^2 (IQR 143-201 g/m^2), mentre per la popolazione affetta da AL-AC detta mediana sia risultata 135 g/m^2 (IQR 112-172 g/m^2), $p < 0.001$. La mediana dei valori di indice volumetrico dell'atrio sinistro per la sottopopolazione con ATTR-AC è risultata di 49 ml/mq, con un range interquartile compreso tra 42 e 58. La mediana dei valori di indice volumetrico dell'atrio sinistro per la sottopopolazione con AL-AC è risultata di 40 ml/mq, con un range interquartile compreso tra 32 e 51, $p < 0.001$. Non sono state evidenziate, tra le due sottopopolazioni poste a confronto, differenze statisticamente significative per i valori di LVEF, GLS e E/e'. Lo stesso dicasi per i valori di TAPSE e PAPs.

20 pazienti (20%) con ATTR-AC hanno presentato pattern di riempimento restrittivo, mentre sono stati 19 i pazienti (28%) con AL-AC che lo hanno manifestato. Detta differenza non è risultata statisticamente significativa, con un P value di 0.224.

20 pazienti (20%) con ATTR-AC hanno presentato valvulopatia almeno moderata, mentre sono stati 11 i pazienti (16%) con AL-AC che la hanno manifestata. Detta differenza non è risultata statisticamente significativa, con un P value di 0.51.

È stato infine possibile evidenziare la sussistenza di una differenza statisticamente significativa (P value 0.021), tra le frequenze percentuali di versamento pericardico lieve nei pazienti con ATTR-AC (19%, 18 pazienti), e nei pazienti con AL-AC (38%, 25 pazienti).

4.4 Caratteristiche laboratoristiche

Le caratteristiche relative alle caratteristiche laboratoristiche della popolazione oggetto di studio sono riassunte nella tabella sottostante:

Variabile	N disponibile (ATTR, AL)	Overall	ATTR (wt+v)	AL	P value
Hb g/dL, mediana (IQR)	158 (88, 70)	13.25 (11.8, 14.6)	13.9 (12.5, 15.2)	12.9 (11.2, 13.8)	<0.001
Creatinina umol/L, mediana (IQR)	156 (86, 70)	102.5 (78.25, 122.25)	101 (84, 116)	106 (77, 140)	0.72
eGFR calcolata, mediana (IQR)	156 (86, 70)	58.5 (48.3, 75.5)	60.1 (52, 74)	56.9 (39, 76)	0.31
Hs-cTnI ng/L, mediana (IQR)	152 (82, 70)	84 (41,158)	76 (41, 139)	87 (41, 178)	0.39
Hs-cTnI ng/L Abbott assay, mediana (IQR)	135 (65, 70)	82 (42, 158)	71 (42, 150)	87 (41, 178)	0.51
NTproBNP ng/L, mediana (IQR)	106 (45, 61)	3325 (1548, 6601)	2817 (1180, 6056)	3737 (1932, 7006)	0.15
BNP ng/L, mediana (IQR)	99 (63, 36)	464 (217, 815)	374 (187, 655)	713 (391, 1807)	<0.001

Tabella XII: caratteristiche laboratoristiche della popolazione studiata

La mediana dei valori di emoglobina nella popolazione generale, ottenuta a partire da 158 parametri disponibili, è risultata di 13.25, con IQR di 11.8-14.6. Tra le due sottopopolazioni si è evidenziata una differenza statisticamente significativa, con una mediana di valori per la popolazione ATTR-AC di 13.9 (IQR 12.5-15.2) e per la popolazione AL-AC di 12.9 (IQR 11.2-13.8).

Il biomarcatore hs-cTnI, indipendentemente dal tipo di test utilizzato, espresso in ng/L ed ottenuto in 152 pazienti, ha presentato una mediana complessiva di 84 ng/L (IQR 41, 158 ng/L), 76 ng/L nel sottogruppo con ATTR-AC e 87 ng/L nel sottogruppo con AL-AC. Anche considerando solo il sottogruppo di pazienti per cui alla diagnosi il valore di hs-TnI è stato definito con metodica Abbott assay non si riscontrano differenze statisticamente significative tra pazienti AL-AC e ATTR-AC (p value=0.51).

Per quanto riguarda i valori di BNP ed NTproBNP, questi sono stati calcolati in ng/L e definiti rispettivamente per 99 e 106 pazienti. Si è potuto evidenziare come i soggetti presentanti Amiloidosi AL avessero mediamente valori più elevati di BNP

e NTproBNP rispetto a pazienti affetti da Amiloidosi TTR. Questa distinzione non è risultata statisticamente significativa per il valore di NTproBNP, ma lo è stato per il valore di BNP, con $P < 0.001$. La mediana dei valori di BNP nella popolazione con ATTR-AC è stata 374 ng/L (range interquartile 187-655 ng/L). Per i soggetti con Amiloidosi da catene leggere è stata 713 ng/L (IQR 391-1807 ng/L).

Un'ulteriore analisi laboratoristica è stata condotta solo in riferimento alla sottopopolazione affetta da Amiloidosi da catene leggere, che ha prodotto i seguenti risultati, presenti in tabella XIII:

Variabile	N disponibile	AL N=70
Albumina g/l, mediana (IQR)	47	35 (28, 39)
Componente monoclonale g/L, mediana (IQR)	51	1.88 (0, 8.3)
dFLC mg/L, mediana (IQR)	69	270 (113, 603)
BJ proteinuria, n (%)	64	54 (84)
Plasmacellule midollo in %	59	16 (10, 30)

Tabella XIII: caratteristiche laboratoristiche dei pazienti affetti da AL-AC

Di 70 pazienti affetti, è stato possibile reperire 47 dati di laboratorio riguardanti la concentrazione di albumina sierica, 51 dati riguardanti la presenza di componente monoclonale all'esame elettroforetico delle proteine plasmatiche, 69 dati relativi alla differenza tra le free light chains, 64 dati circa la presenza di proteinuria di Bence-Jones e 59 dati relativi alla percentuale di plasmacellule presenti in sede midollare, documentati con biopsia osteo-midollare. La mediana dei valori di albumina nella popolazione analizzata è risultata 35 g/L, con un IQR compreso tra 28 e 39 g/L. 54 dei pazienti valutati (84%) ha presentato proteinuria di Bence-Jones all'immunofissazione urinaria. Dei soggetti analizzati, il valore mediano della differenza di FLC, è risultato 270 mg/L, con un IQR compreso tra 113 e 603 mg/L. La componente monoclonale ha invece avuto valore mediano 1.88 g/L (IQR 0-8.3 g/L).

16% è invece il valore della mediana di distribuzione delle percentuali di plasmacellule ritrovate alla biopsia osteo-midollare nei pazienti analizzati. Il primo quartile ha corrisposto a 10%, il terzo a 30%.

4.5 Follow up ed outcomes

La mediana di follow up nella popolazione totale è stata di 14 mesi, con un primo quartile a 5 mesi ed un terzo quartile a 31 mesi. Si è inoltre registrata una differenza statisticamente significativa ($p=0.063$) tra i valori di follow up in riferimento alla sottopopolazione con AL e alla sottopopolazione con TTR; nel primo caso la mediana è risultata di 21 mesi, con IQR 5-45 mesi, nel secondo caso è risultata di 12 mesi, con un IQR di 5-28 mesi.

Durante il follow up, 38 pazienti sono deceduti, ovvero il 23% della popolazione totale. Di questi, 12 erano affetti da ATTR-AC e rappresentavano il 12% di detta sottopopolazione, e 26 erano affetti da AL-AC e rappresentavano il 37% della loro sottopopolazione.

Altro endpoint valutato è stato l'eventuale ricovero per scompenso cardiaco; per ogni paziente si è considerato solo il primo ricovero. 43 pazienti della popolazione overall oggetto di studio (ovvero il 25%) sono stati ricoverati almeno una volta per scompenso cardiaco; 20 di questi erano soggetti con ATTR-AC (20%) e 23 erano soggetti con AL-AC (33%).

Valutando infine un endpoint combinato, composto da decesso o ricovero per scompenso cardiaco, durante il follow up della popolazione overall 62 pazienti (37%) hanno manifestato detto endpoint. 26 pazienti (26%) presentanti l'endpoint erano soggetti con ATTR-AC, 36 pazienti (51%) erano soggetti con AL-AC.

La seguente tabella riassume quanto appena espresso circa gli outcomes della popolazione overall e delle due sottopopolazioni con Amiloidosi AL e TTR:

Variabile	Overall N=169	ATTR (wt+v) N= 99	AL N=70	P value
Follow up: mesi tra diagnosi e morte od ultimo contatto, mediana (IQR)	14 (5,31)	12 (5,28)	21 (5,45)	0.063
Decesso, n (%)	38 (23)	12 (12)	26 (37)	<0.001
Ricovero per scompenso, n (%)	43 (25)	20 (20)	23 (33)	0.063
Endpoint combinato: ricovero per scompenso o decesso, n (%)	62 (37)	26 (26)	36 (51)	<0.001

Tabella XIV: follow up ed outcomes

4.6 Caratteristiche associate a maggiore frequenza di decesso

4.6.1 Caratteristiche associate a maggiore frequenza di decesso (AL-AC)

Nella tabella XV qui riportata è possibile apprezzare la distribuzione di alcuni parametri clinici, elettrocardiografici, ecocardiografici e biumorali nella popolazione di soggetti con Amiloidosi AL deceduti durante il follow up e nella popolazione con AL-AC ancora in vita al termine della raccolta dati:

Variabile	AL SOPRAVVISSUTI (n=44)	AL DECEDUTI (n=26)	P value
Età alla diagnosi, mediana (IQR)	67 (60, 76)	73 (61, 77)	0.39
Fibrillazione Atriale o Flutter Atriale, n (%)	5 (11%)	10 (40%)	0.006
HF sintomatico, n (%)	14 (32%)	14 (56%)	0.049
NYHA strettamente maggiore di 2, n (%)	11 (28%)	14 (70%)	0.002
LVEF %, mediana (IQR)	57 (52,62)	52 (46,55)	0.007
TAPSE mm, mediana (IQR)	20 (15,24)	17(13,19)	0.017
Creatinina $\mu\text{mol/L}$, mediana (IQR)	90 (73, 129)	120 (83,187)	0.019
eGFR calcolata ml/min, mediana (IQR)	65.8 (42.8, 86.5)	49.6 (29.2, 64.3)	0.019
dFLC mg7L, mediana (IQR)	181 (100, 581)	473 (130, 1196)	0.12
hs-cTnI ng/L, mediana (IQR)	58 (32, 152)	134 (82, 225)	0.006
hs-cTnI Abbott assay ng/L, mediana (IQR)	58 (32, 152)	134 (82, 225)	0.006
NTproBNP ng/L, mediana (IQR)	3026 (1307, 5585)	5551 (2603, 10064)	0.044

Tabella XV: caratteristiche associate a maggior frequenza di decesso (AL-AC)

Si può notare come il 40% dei soggetti con AL-AC presentassero in vita fibrillazione-flutter atriale, mentre solo il 5% dei soggetti con AL-AC in vita presenta dette aritmie sopra-ventricolari, $p=0.006$. 14 pazienti deceduti per AL-AC, ovvero il 56% del totale, alla diagnosi avevano presentato scompenso cardiaco; solo il 32% dei pazienti con AL-AC ancora in vita ha ricevuto la propria diagnosi a seguito di ospedalizzazione per scompenso cardiaco. Detta differenza risulta essere statisticamente significativa, con $P=0.049$. Il 70% dei soggetti

deceduti per AL-AC presentava alla diagnosi una classe funzionale NYHA alternativamente pari a 3 o 4, ma solo il 28% dei soggetti affetti ancora in vita aveva alla diagnosi detta categorizzazione; il risultato è statisticamente significativo, con $P=0.002$.

All'esame ecocardiografico, la popolazione di soggetti con Amiloidosi AL deceduta durante il follow up presentava una mediana dei valori per la LVEF di 52% (IQR 46-55 %) e per il TAPSE di 17mm (IQR 13-19 mm). Contrariamente, i soggetti ad oggi ancora in vita con Amiloidosi AL alla prima ecografia dal momento della diagnosi presentavano una mediana di LVEF di 57% (IQR 52-62 %) e per il TAPSE di 20mm (IQR 15-24 mm). Queste differenze si sono rivelate statisticamente significative, con $P=0.007$ e $P=0.0017$ rispettivamente.

Per quanto concerne i pazienti affetti da AL-AC che sono giunti all'*exitus* durante il follow up, la mediana della creatinina è risultata 120 $\mu\text{mol/L}$, con un 1° quartile a 83 $\mu\text{mol/L}$ e un 3° quartile a 187 $\mu\text{mol/L}$. Nel caso di pazienti con Amiloidosi AL ancora in vita al termine della raccolta dati, la mediana è risultata 90 $\mu\text{mol/L}$ e l'IQR compreso tra 73 $\mu\text{mol/L}$ e 129 $\mu\text{mol/L}$. La differenza è risultata statisticamente significativa, con una $P=0.019$. La mediana dei valori di eGFR nella popolazione deceduta è 49.6 ml/min (IQR 29.2-64.3 ml/min) e nella popolazione ancora in vita è 65.8 ml/min (IQR 42.8- 86.5 ml/min). Il P value di questa differenza statisticamente significativa è risultato 0.019.

Si è evidenziata una differenza statisticamente significativa ($P=0.006$) tra le mediane delle distribuzioni di hs-cTnI nelle due popolazioni osservate: 134 ng/L corrisponde alla mediana dei valori di troponina I ad alta sensibilità nella popolazione deceduta durante il follow up (IQR 82-225 ng/L), 58 ng/L corrisponde invece alla mediana dei valori di troponina I ad alta sensibilità nella popolazione non deceduta durante il follow up (32-152 ng/L). I risultati sono sovrapponibili se si considera le sole hs-cTnI ottenute con metodica Abbott.

Si è inoltre definita una differenza statisticamente significativa ($P=0.044$) per i valori di NT-proBNP nelle popolazioni studiate; i soggetti deceduti alla diagnosi avevano valori di NTproBNP la cui mediana è risultata essere 5551 ng/L (IQR 2603-10064 ng/L), i soggetti ancora in vita avevano alla diagnosi valori decisamente inferiori, poiché la mediana corrispondeva a 3026 ng/L (1307-5585 ng/L).

In figura 16 è possibile apprezzare la distribuzione hs-cTnI log-trasformata nei pazienti sopravvissuti e deceduti per AL-AC.

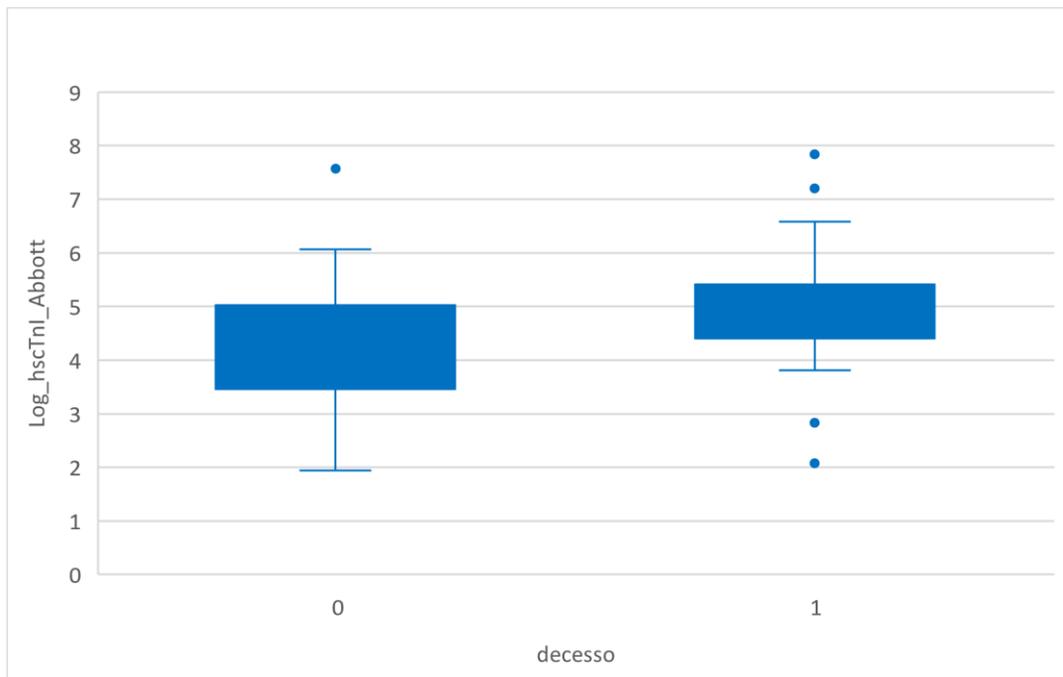


Figura 16: Distribuzione hs-cTnI log-trasformata in pazienti sopravvissuti (decesso 0) e deceduti (decesso 1) per AL-CA.

4.6.2 Caratteristiche associate a maggiore frequenza di decesso (ATTR-AC)

Nella tabella XVI qui riportata è possibile apprezzare la distribuzione di alcuni parametri clinici, elettrocardiografici, ecocardiografici e biumorali nella popolazione di soggetti con ATTR-AC deceduti durante il follow up e nella popolazione di soggetti con ATTR-AC ancora in vita al termine della raccolta dati:

Variabile	ATTR SOPRAVVISSUTI (n=87)	ATTR DECEDUTI (n=12)	P value
Età alla diagnosi, mediana (IQR)	78 (72, 82)	78 (73, 83)	0.57
NYHA strettamente maggiore di 2, n (%)	15 (21)	5(56)	0.021
LVEF %, mediana (IQR)	54 (46,60)	42 (37,53)	0.017
TAPSE mm, mediana (IQR)	18 (15,20)	15 (12, 16)	0.042
E/e', mediana (IQR)	15.4 (11.9, 19.1)	20.2 (18, 29)	0.010
eGFR, mediana (IQR)	60 (52, 74)	55 (37, 78)	0.24
hs-cTnI ng/L, mediana (IQR)	59 (37, 127)	174 (92, 310)	0.002
hs-cTnI Abbott assay ng/L, mediana (IQR)	62 (41, 129)	179 (88, 518)	0.006
BNP ng/L, mediana (IQR)	349 (182, 620)	890 (509, 1879)	0.007

Tabella XVI: caratteristiche associate a maggior frequenza di decesso (ATTR-AC)

È possibile apprezzare come il 56% dei pazienti affetti da ATTR-AC, deceduti durante il follow up, presentassero alla diagnosi una classe NYHA strettamente superiore a 2, aspetto manifestato solo dal 21% dei pazienti con ATTR-AC ancora in vita al termine della raccolta dati. Questa differenza è risultata statisticamente significativa, con un valore di P=0.021.

Per quanto concerne le caratteristiche ecocardiografiche, si è potuto osservare come la mediana dei valori di LVEF nei pazienti con ATTR-AC deceduti durante lo studio fosse del 42% (IQR 37-53%), e per i pazienti non deceduti fosse 54% (IQR 46-60%). Per quanto riguarda la mediana dei valori di TAPSE in mm, nel caso della popolazione con ATTR-AC deceduta durante il follow up essa è risultata 15 mm (IQR 12-16 mm), nell'ambito dei soggetti in vita essa è risultata superiore, 18 mm (IQR 15-20 mm). Valutando il parametro ecocardiografico E/e', la distribuzione dei

valori nella popolazione di soggetti affetti da ATTR-AC giunti ad *exitus* durante lo studio ha presentato una mediana di 20.2 (IQR 18-29); nel caso di soggetti affetti dalla medesima condizione morbosa di cui non si è registrato il decesso durante il follow up, la mediana dei valori di E/e' è corrisposta a 15.4 (IQR 11.9-19.1).

La mediana dei valori di hs-cTnI nel gruppo di pazienti ATTR-AC deceduti è risultata 174 ng/L (IQR 92-310 ng/L), mentre nel caso dei pazienti ATTR-AC non giunti ad *exitus* è stata di 59 ng/L (37-127 ng/L), una differenza statisticamente significativa con $P=0.002$. Anche considerando il sottogruppo di pazienti che aveva eseguito valutazione della hs-cTnI alla diagnosi con test "Abbott", si è potuta definire una differenza significativa dal punto di vista statistico tra le mediane relative alla popolazione di soggetti deceduti e non deceduti: 179 ng/L (IQR 88-518 ng/L) versus 62 ng/L (IQR 41-129 ng/L). Il valore di P è stato uguale a 0.006.

Ulteriore differenza statisticamente significativa si è evidenziata per i valori di peptide natriuretico di tipo B: la distribuzione dei valori di BNP nella popolazione affetta da Amiloidosi da transtiretina deceduta durante il follow up ha presentato mediana pari a 890 ng/L (IQR 509-1879 ng/L). Nel caso dei soggetti non deceduti la mediana dei valori è invece risultata pari a 349 ng/L (IQR 182-620 ng/L).

In figura 17 è possibile apprezzare la distribuzione hs-cTnI log-trasformata nei pazienti sopravvissuti e deceduti per ATTR-AC.

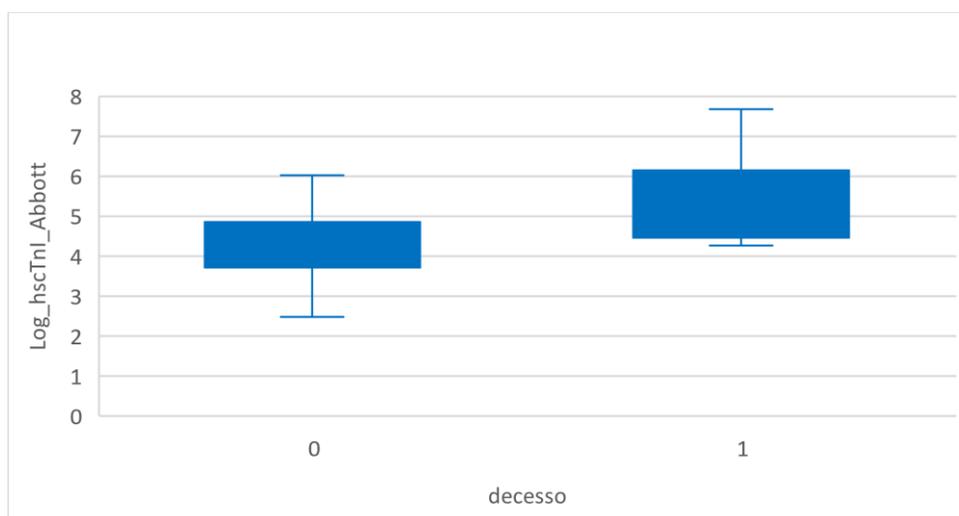


Figura 17: Distribuzione hs-cTnI log-trasformata in pazienti sopravvissuti (decesso 0) e deceduti (decesso 1) per ATTR-CA.

4.7 hs-cTnI nella stratificazione del rischio dell'AL-AC

La curva ROC presentata in figura 18 descrive la sensibilità e specificità del biomarcatore hs-cTnI *Abbott assay* nella predizione di decesso in paziente con Amiloidosi Cardiaca AL:

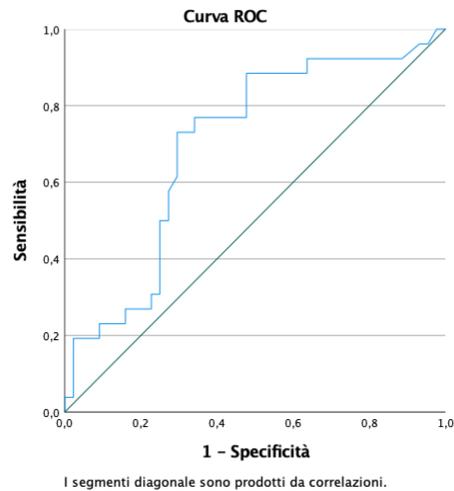
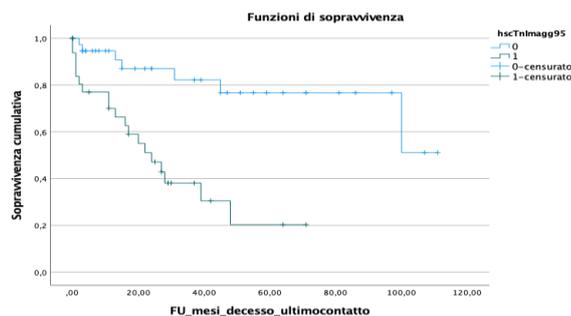


Figura 18: curva ROC per hs-cTnI in AL-AC

L'area sotto la curva calcolata per detta curva ROC risulta essere pari a 0.699, con un intervallo di confidenza compreso tra 0.572 e 0.827. Il P value calcolato in riferimento alla curva è risultato eguale a 0.006. Per le analisi di sopravvivenza mediante curve di Kaplan-Meier si è utilizzato un cut-off di hs-cTnI *Abbott assay* pari a 95 ng/L, che ha presentato una sensibilità eguale a 73% ed una specificità di 70.5%. In figura 19 è possibile apprezzare la curva di Kaplan Meier in riferimento alla popolazione affetta da Amiloidosi Cardiaca da catene leggere raggruppata in soggetti presentanti valori di hs-cTnI *Abbott assay* oltre il cut-off di 95 ng/L ed entro lo stesso:



Hs-cTnI ≤ 95 ng/L	38	20	15	9	5	2
Hs-cTnI > 95 ng/L	32	14	3	1	0	0

Figura 19: curve KM nei pazienti con AL-AC categorizzati a seconda dei valori di hs-cTnI

È dunque possibile notare come sussista una differenza di outcome tra i due sottogruppi, di natura statisticamente significativa; con la curva blu si è indicato il sottogruppo di soggetti con livelli di hs-cTnI *Abbott assay* inferiori a 95 ng/L, con la curva verde il sottogruppo di soggetti con livelli di hs-cTnI *Abbott assay* superiori a 95 ng/L (log rank $p < 0.001$).

Impiegando il biomarcatore cardiaco hs-cTnI *Abbott assay* ed i peptidi natriuretici NT-pro-BNP e BNP si sono costruite le curve di Kaplan-Meier riferite alla sopravvivenza dei soggetti affetti da AL-AC, raggruppandoli secondo il Mayo staging system 2004, utilizzando tuttavia la troponina I anziché la troponina T. Dette curve sono visualizzabili in figura 20: come cut-off si è utilizzato 95 ng/L per hs-cTnI, 1800 ng/L per NTproBNP o 250 ng/L per BNP.

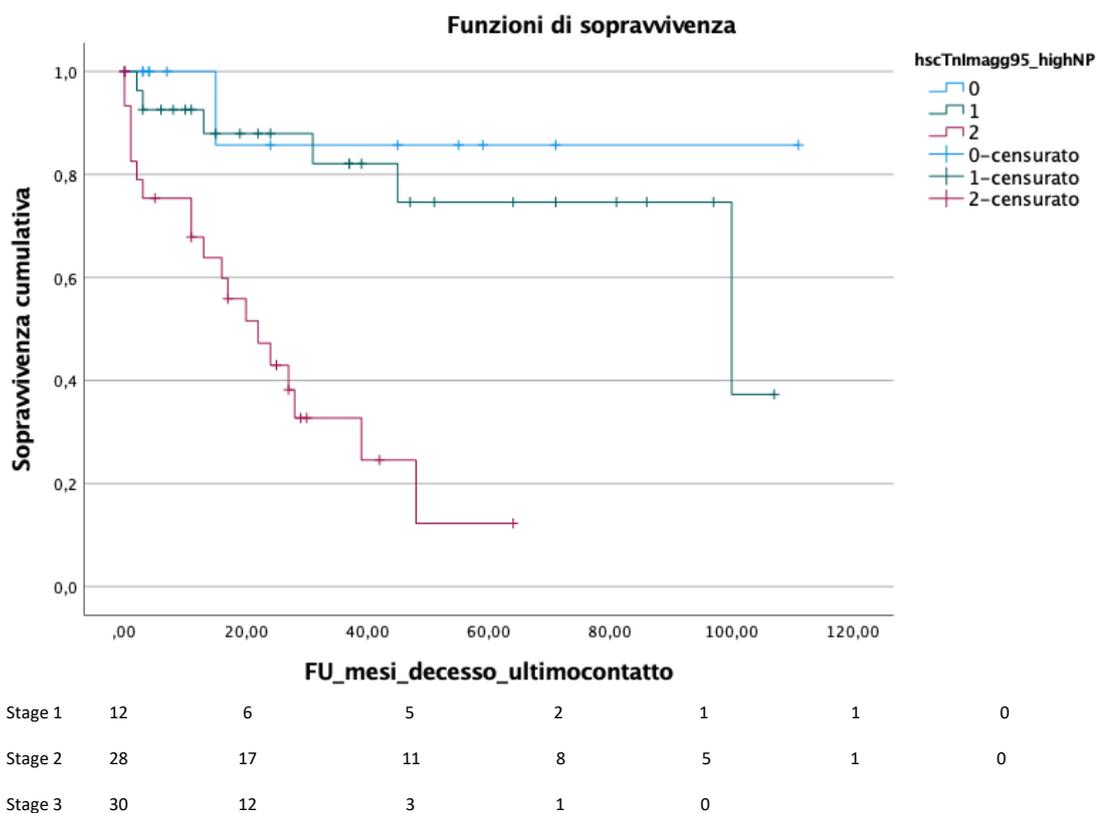


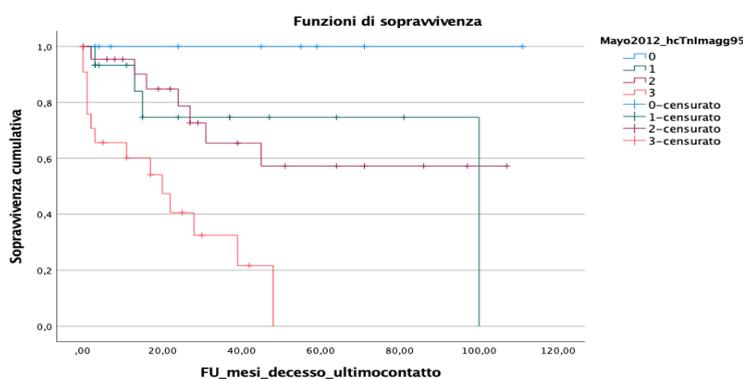
Figura 20: curve KM nei pazienti con AL-AC stratificati secondo il modello Mayo 2004

È possibile apprezzare quindi tre differenti sottogruppi:

- Primo sottogruppo: pazienti non presentanti alcuna alterazione dei biomarcatori cardiaci considerati, corrispondenti allo stadio 1 (curva blu);

- Secondo sottogruppo: pazienti presentanti alternativamente livelli di hs-cTnI o di peptidi natriuretici oltre il valore di cut-off considerato, corrispondenti allo stadio 2 (curva verde);
- Terzo sottogruppo: pazienti presentanti concomitaneamente livelli di hs-cTnI e peptidi natriuretici oltre i valori di cut-off considerati, corrispondenti allo stadio 3 (curva viola).

In merito al confronto globale, il Log Rank survival test (Mantel-Cox) ha descritto un P value inferiore a 0.001. Per quanto concerne i confronti pairwise, il valore di P circa la differenza tra il primo ed il secondo sottogruppo, ottenuto con Log Rank survival test, è risultato non significativo, pari a 0.383; i valori di P circa la differenza tra primo e terzo sottogruppo, nonché secondo e terzo sottogruppo, sono invece risultati statisticamente significativi, pari rispettivamente a 0.004 e <0.001. Impiegando il biomarcatore cardiaco hs-cTnI *Abbott assay* ed i peptidi natriuretici NT-pro-BNP e BNP, nonché la differenza tra i valori di catene leggere libere espressa come dFLC, si sono costruite le curve di Kaplan-Meier riferite alla sopravvivenza dei soggetti affetti da AL-AC, raggruppandoli secondo il Mayo staging system 2012, utilizzando tuttavia la troponina I anziché la troponina T. Utilizzando detto modello per la stratificazione del rischio, 9 (13%) pazienti sono stati collocati allo stadio 1, 16 (23%) allo stadio 2, 22 (31%) allo stadio 3 e 22 (31%) allo stadio 4. Dette curve sono visualizzabili in figura 21: come cut-off si è utilizzato 95 ng/L per hs-cTnI, 1800 ng/L per NTproBNP, 250 ng/L per BNP e 180 ng/L per dFLC.



Stage 1	9	6	5	2	1	1
Stage 2	16	7	4	3	2	0
Stage 3	22	15	8	6	3	1
Stage 4	22	7	2	0		

Figura 21: curve KM nei pazienti con AL-AC stratificati secondo il modello Mayo 2012

È possibile apprezzare quindi quattro differenti sottogruppi:

- Primo sottogruppo: pazienti non presentanti alcuna alterazione dei biomarcatori cardiaci considerati, né dFLC anomala, corrispondenti allo stadio 1 (curva blu);
- Secondo sottogruppo: pazienti presentanti una ed una sola alterazione, compresa tra valore di hs-cTnI oltre il cut-off, valori dei peptidi natriuretici oltre il cut-off, valore di dFLC oltre il cut-off, corrispondenti allo stadio 2 (curva verde);
- Terzo sottogruppo: pazienti presentanti due differenti alterazioni, compresa tra valori di hs-cTnI oltre il cut-off, valori dei peptidi natriuretici oltre il cut-off, valore di dFLC oltre il cut-off, corrispondenti allo stadio 3 (curva viola);
- Quarto sottogruppo: pazienti presentanti sia alterazione dei livelli di hs-cTnI, che alterazione dei livelli di dFLC nonché di NTproBNP o BNP, corrispondenti allo stadio 4 (curva rossa).

In merito al confronto globale, il Log Rank survival test (Mantel-Cox) ha descritto un P value inferiore a 0.001. Per quanto concerne i confronti pairwise, il valore di P circa la differenza tra il primo ed il secondo sottogruppo, ottenuto con Log Rank survival test, è risultato non significativo, pari a 0.92; il valore di P circa la differenza di survival per i pazienti del primo e del terzo sottogruppo è risultato anch'esso non statisticamente significativo, pari a 0.82, come pure quello riferito alla differenza tra secondo e terzo sottogruppo, eguale a 0.984.

Diversamente, il P value calcolato in riferimento alla differente sopravvivenza dei pazienti del primo sottogruppo con il quarto sottogruppo ha mostrato valore statisticamente significativo, in quanto inferiore a 0.001; considerando i valori di P (calcolati mediante Log Rank survival test) riferiti alla differenza di sopravvivenza tra secondo e quarto sottogruppo e terzo e quarto sottogruppo, si nota come essi siano statisticamente significativi, pari a 0.002 e 0.007.

Ricorrendo alla Regressione di Cox per validare hs-cTnI *Abbott assay* come predittore di mortalità nell'ambito dell'Amiloidosi Cardiaca da catene leggere, si è

potuto descrivere come l'hazard ratio relativo a pazienti con valori di hs-cTnI superiori al cut-off di 95 ng/L fosse pari a 5.309 (risultato di un'analisi univariata). L'intervallo di confidenza al 95% ha presentato per estremi 2.085 e 13.517; il p value è risultato inferiore a 0.001.

Incorporando nel modello di Regressione di Cox sia il valore di hs-cTnI *Abbott assay* (cutoff 95 ng/L) che l'età alla diagnosi, si è potuto evidenziare come l'hazard ratio per una hs-cTnI superiore a 95 ng/L fosse pari a 5,591 con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 2.171 e 14.401, ed una $P < 0.001$, e che l'hazard ratio riferito all'età presentata alla diagnosi fosse di 1.031 con intervallo di confidenza al 95% compreso tra 0.992 e 1.071 con P value pari a 0.126.

Inserendo invece nel modello di Regressione di Cox il parametro di laboratorio hs-cTnI *Abbott assay* (cutoff 95 ng/L) ed la classe funzionale NYHA (dicotomizzandola a minore uguale a 2 o maggiore a 2), l'hazard ratio riferito a valori di hs-cTnI superiori al cut-off è risultato 3.44 (IC 95% 1.169-10.144, p value=0.025) mentre riferito ad una classe NYHA strettamente superiore a 2 è risultato 3.467 (IC 95% 1.261-9.531, p value=0.016).

Producendo invece una Regressione di Cox considerando il livello di hs-cTnI *Abbott assay* ed il valore di frazione d'eiezione ventricolare sinistra espressa in percentuale, si descrive un hazard ratio per una hs-cTnI superiore a 95 ng/L di 3.716 (IC 95% 1.361-10.141, p value=0.01) ed un hazard ratio riferito alla LVEF di 0.954 (IC 95% 0.912-0.999, p value=0.046).

Nelle tabelle XVII, XVIII e XIX si possono apprezzare le analisi multivariate secondo il modello di Regressione di Cox riferite alla hs-cTnI *Abbott assay* (come variabile dicotomica, $> o \leq 95\text{ng/L}$) con età alla diagnosi, classe funzione NYHA e frazione di eiezione del ventricolo sinistro come covariate:

Variabile	Hazard Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P value
hs-cTnI>95 ng/L	5.591	2.171	14.401	<0.001
Età alla diagnosi	1.031	0.992	1.071	0.126

Tabella XVII: modello di Regressione di Cox calcolato per hs-cTnI ed età alla diagnosi

Variabile	Hazard Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P value
hs-cTnI>95 ng/L	3.444	1.169	10.144	0.025
NYHA strettamente maggiore di 2	3.467	1.261	9.531	0.016

Tabella XVIII: modello di Regressione di Cox calcolato per hs-cTnI ed classe funzionale NYHA

Variabile	Hazard Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P value
hs-cTnI>95 ng/L	3.716	1.361	10.141	0.01
LVEF %	0.954	0.912	0.999	0.046

Tabella XIX: Modello di Regressione di Cox calcolato per hs-cTnI ed frazione di eiezione

4.8 hs-cTnI nella stratificazione del rischio dell'ATTR-AC

La curva ROC presentata in figura 22 descrive la sensibilità e specificità del biomarcatore hs-cTnI *Abbott assay* nella predizione di decesso in paziente con Amiloidosi Cardiaca TTR:

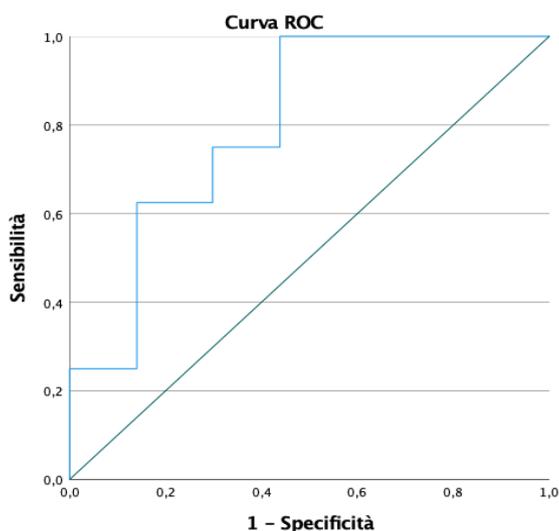
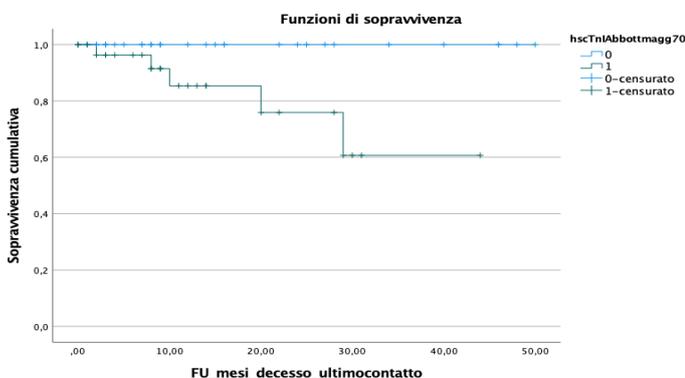


Figura 22: curva ROC per hs-cTnI in AL-AC

L'area sotto la curva calcolata per detta curva ROC risulta essere pari a 0.800, con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 0.666 e 0.935. Il P value calcolato in riferimento alla curva è risultato eguale a 0.006. Per le analisi di sopravvivenza mediante curve di Kaplan-Meier si è utilizzato un cut-off di hs-cTnI *Abbott assay* pari a 70 ng/L, che ha presentato una sensibilità eguale a 100% ed una specificità di 56%. In figura 23 è possibile apprezzare la curva di Kaplan Meier in riferimento alla popolazione affetta da Amiloidosi Cardiaca da transtiretina raggruppata in soggetti presentanti valori di hs-cTnI *Abbott assay* oltre il cut-off di 70 ng/L ed entro lo stesso:



Hs-cTnI ≤ 70 ng/L	32	22	11	7	5	1
Hs-cTnI > 70 ng/L	33	17	10	5	4	3

Figura 23: curve KM nei pazienti con ATTR-AC categorizzati a seconda dei valori di hs-cTnI

Si può quindi apprezzare una differenza statisticamente significativa (il Log Rank survival test ha descritto un P value pari a 0.018) tra i due sottogruppi in termini di outcome: con la curva blu si è indicato il sottogruppo di soggetti con livelli di hs-cTn inferiori a 70 ng/L, con la curva verde il sottogruppo di soggetti con livelli di hs-cTn superiori a 70 ng/L.

Ulteriore analisi di sopravvivenza per i pazienti affetti da ATTR-AC è stata condotta mediante la definizione di curve Kaplan Meier costruite raggruppando i pazienti sulla base dei seguenti biomarcatori: hs-cTn *Abbott assay* (cut-off 70 ng/L), BNP (cut-off 250 ng/L) e NTproBNP (1800 ng/L). La stadiazione dei pazienti ha quindi seguito il modello Mayo modificato per ATTR-AC (193). Utilizzando detto modello per la stratificazione del rischio, in coloro in cui i biomarcatori erano disponibili alla diagnosi (n=64), 24 pazienti (38%) sono stati collocati allo stadio 1, 14 (22%) allo stadio 2 e 26 (41%) allo stadio 3. I risultati di detta analisi sono osservabili in figura 24:

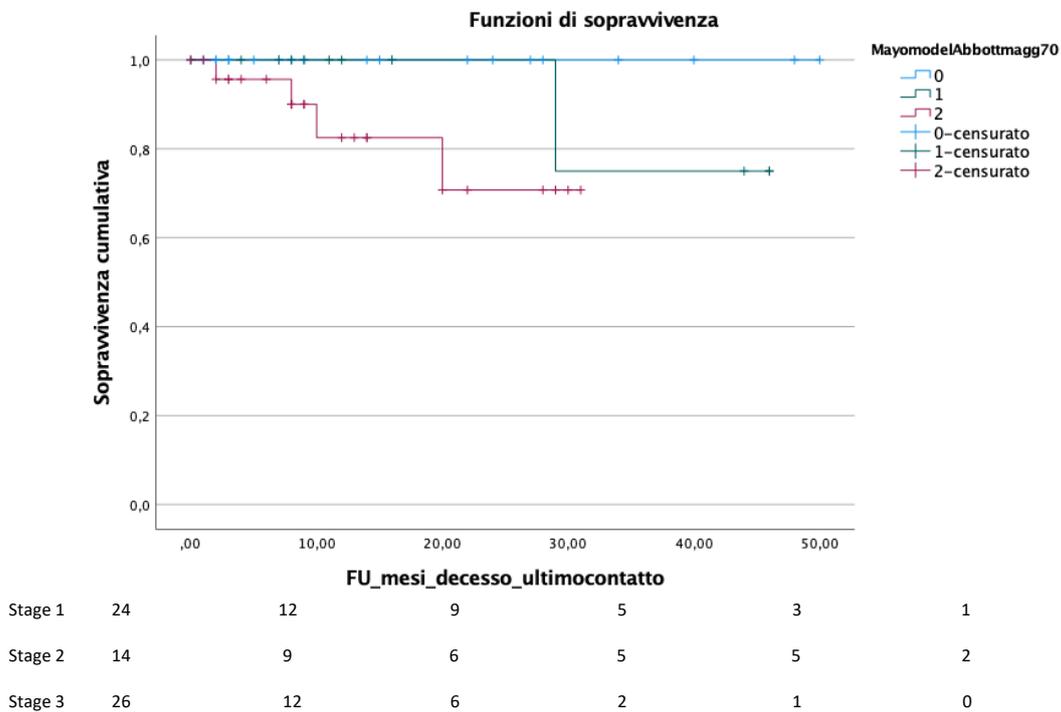


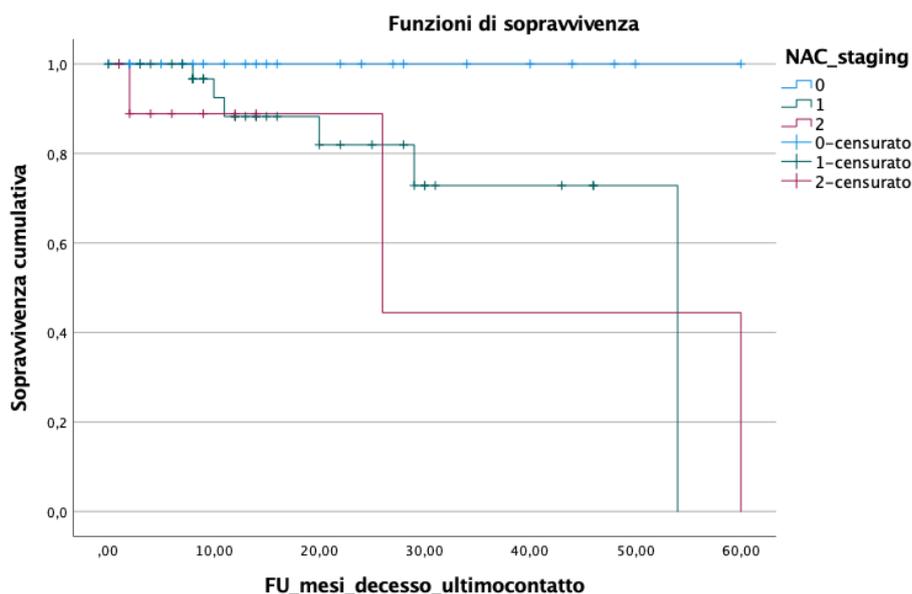
Figura 24: curve KM nei pazienti con ATTR-AC stratificati secondo il modello Mayo modificato per ATTR-AC

È quindi possibile apprezzare quindi tre differenti sottogruppi:

- Primo sottogruppo: pazienti senza alcuna alterazione oltre il cut-off dei biomarcatori cardiaci considerati, corrispondenti allo stadio 1 (curva blu);

- Secondo sottogruppo: pazienti che alternativamente presentano livelli di hs-cTnI o di peptidi natriuretici oltre il valore di cut-off considerato, corrispondenti allo stadio 2 (curva verde);
- Terzo sottogruppo: pazienti presentanti contemporaneamente livelli di hs-cTnI e peptidi natriuretici oltre i valori di cut-off considerati, corrispondenti allo stadio 3 (curva viola).

In merito al confronto globale, il Log Rank survival test (Mantel-Cox) ha descritto un P value pari a 0.035. Per quanto concerne i confronti pairwise, il valore di P circa la differenza tra il primo ed il secondo sottogruppo, ottenuto con Log Rank survival test, è risultato non significativo, pari a 0.361; il valore di P circa la differenza tra primo e terzo sottogruppo è risultato statisticamente significativo, pari a 0.029. contrariamente, la differenza tra la survival del secondo sottogruppo e del terzo sottogruppo non è risultata statisticamente significativa, con una P eguale a 0.123. Classificando i pazienti in base allo staging system del National Amyloidosis Centre, impiegando i valori di eGFR (in ml/min) e NTproBNP (in ng/L), è stato possibile descrivere le curve di Kaplan Meier in riferimento ai 3 sottogruppi di pazienti. Dette curve sono presenti in figura 25:



Stage 1	30	17	12	8	6	3	2
Stage 2	38	22	12	6	4	1	0
Stage 3	10	4	2	1	1	1	0

Figura 25: curve KM nei pazienti con ATTR-AC stratificati secondo il modello NAC

È quindi possibile apprezzare quindi le curve riferite ai tre differenti sottogruppi:

- Primo sottogruppo: pazienti presentanti eGFR>45 ml/min e contemporaneamente NTproBNP<3000 ng/L , corrispondenti allo stadio 1 (curva blu);
- Secondo sottogruppo: pazienti che alternativamente presentano eGFR<45 ml/min o NTproBNP>3000 ng/L, corrispondenti allo stadio 2 (curva verde);
- Terzo sottogruppo: pazienti presentanti contemporaneamente eGFR>45 ml/min e NTproBNP>3000 ng/L, corrispondenti allo stadio 3 (curva viola).

In merito al confronto globale, il Log Rank survival test ha evidenziato un valore di P statisticamente significativo, pari a 0.01. Considerando invece i confronti pairwise, non è stata riscontrata differenza statisticamente significativa in termini di outcomes tra secondo e terzo sottogruppo (P value=0.666). Contrariamente, si sono apprezzate differenze statisticamente significative tra primo e secondo sottogruppo, nonché secondo e terzo sottogruppo (P values rispettivamente pari a 0.014 e 0.001). Eseguendo poi un'analisi di sopravvivenza mediante regressione logistica univariata per hs-cTnI *Abbott assay* come predittore della mortalità nell'ambito dell'Amiloidosi Cardiaca da transtiretina (considerando essa come variabile continua), è stato possibile descrivere un odds ratio pari a 3.703, con un IC al 95% compreso tra 1.409 e 9.728 (P value 0.008). Andando poi a condurre una regressione logistica univariata con hs-cTnI *Abbott assay* (come variabile continua) in riferimento ad un endpoint combinato di mortalità od ospedalizzazione per scompenso cardiaco nel contesto di soggetti con ATTR-AC si è potuto indicare un odds ratio di 1.998, con IC al 95% compreso tra 1.067 e 3.742 (P value 0.031). Descrivendo un modello di regressione logistica multivariata impiegando come variabili hs-cTnI *Abbott assay* (intesa come continua) ed il TAPSE in mm ottenuto alla prima ecografia, e considerando come endpoint combinato il decesso od il ricovero per scompenso cardiaco, è stato possibile evidenziare un odds ratio per dette variabili rispettivamente di 2.272 (IC 95% 1.024-4.042, P value 0.044) e 1.017 (IC 95% 0.896-1.154, P value 0.798). Nel modello di regressione logistica multivariata che ha utilizzato come variabili hs-cTnI *Abbott assay* e la LVEF in % ottenuta alla prima ecografia, in riferimento all'endpoint combinato decesso o ricovero per scompenso cardiaco, si è descritto un odds ratio di 1.720 per la Troponina I (IC 95% 0.873-3.388, P value 0.117) e di 0.961 per la frazione di eiezione (IC 95% 0.909-1.016, P value 0.159).

Il modello di regressione logistica multivariata eseguito con le variabili hs-cTnI *Abbott assay* e E/e' calcolato alla prima ecografia, considerando come endpoint combinato il decesso od il ricovero per scompenso cardiaco, ha prodotto un odds ratio che per la Troponina I è risultato pari a 1.856 (IC 0.893-3.860, P value 0.098) e per E/e' eguale a 1.024 (IC 0.934-1.124, P value 0.610). In ultima analisi, si consideri la regressione logistica multivariata riferita all'endpoint combinato di decesso o ricovero per insufficienza cardiaca, e sfruttante come variabili la hs-cTnI *Abbott assay* e la classe funzionale NYHA, dicotomizzandola come strettamente maggiore o minore/uguale a 2: l'odds ratio riferito alla Troponina I è di 1.967 (IC 0.964-4.011 P value 0.063), riferito alla classe funzionale NYHA è di 1.643 (IC 0.429-6.287 P value 0.469). Nelle tabelle XX,XXI,XXII e XXIII si possono apprezzare le analisi multivariate secondo il modello di Regressione logistica riferite alla hs-cTnI *Abbott assay* (come variabile continua) considerante come co-variate il TAPSE, il rapporto E/e', la frazione di eiezione del ventricolo sinistro e la classe funzione NYHA:

Variabile	Odds Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P value
hs-cTnI	2.272	1.024	5.042	0.044
TAPSE	1.017	0.896	1.154	0.798

Tabella XX: modello di Regressione logistica calcolato per hs-cTnI ed TAPSE

Variabile	Odds Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P value
hs-cTnI	1.856	0.893	3.860	0.098
E/e'	1.024	0.934	1.124	0.610

Tabella XXI: modello di Regressione logistica calcolato per hs-cTnI ed rapporto E/e'

Variabile	Odds Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P value
hs-cTnI	1.720	0.873	3.388	0.117
LVEF %	0.961	0.909	1.016	0.159

Tabella XXII: modello di Regressione logistica calcolato per hs-cTnI ed LVEF %

Variabile	Odds Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P value
hs-cTnI	1.967	0.964	4.011	0.063
NYHA strettamente maggiore di 2	1.643	0.429	6.287	0.469

Tabella XXIII: modello di Regressione logistica calcolato per hs-cTnI e classe funzionale NYHA

Capitolo 5: Discussione

L'Amiloidosi Cardiaca è una condizione patologica caratterizzata dall'accumulo in sede extracellulare di proteine scorrettamente ripiegate, comportanti un danno a livello miocardico e cagionanti in ultima analisi una disfunzione cardiaca. Le principali tipologie di Amiloidosi Cardiaca dipendono dal tipo di elemento proteico che viene a depositarsi e, per il 95% dei casi, fanno alternativamente riferimento alla forma da transtiretina (wild type od ereditaria) o da catene leggere (patologia a su volta secondaria a discrasie plasmacellulari). Il percorso diagnostico per l'Amiloidosi Cardiaca è di tipo multidisciplinare, richiede integrazione di dati laboratoristici, clinici, elettrocardiografici, ecocardiografici, istopatologici e riferenti a esami diagnostici di 2°-3° livello.

Lo studio esposto in questa Tesi si è proposto di considerare i pazienti afferenti all'Ambulatorio Specialistico dell'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedale-Università di Padova (nonché del Servizio Ambulatoriale di Ematologia) al fine di evidenziare le principali caratteristiche cliniche e gli aspetti diagnostici di pazienti affetti da Amiloidosi Cardiaca da catene leggere, da transtiretina (wild type ed ereditaria). Inoltre, si è analizzato il ruolo del biomarcatore hs-cTnI come possibile predittore prognostico per il decesso od ospedalizzazione nel medio-breve termine di pazienti affetti da Amiloidosi Cardiaca.

5.1.1 Caratteristiche demografiche della popolazione

Valutando i dati raccolti nel presente studio, si considerino innanzitutto le caratteristiche della popolazione. Di 169 pazienti totali analizzati nello studio, più dell'80% era di sesso maschile; ciò suggerisce una maggiore incidenza di Amiloidosi Cardiaca nel sesso maschile, in linea con i dati epidemiologici disponibili in letteratura (62)(65). Valutando il sottogruppo di soggetti affetti da ATTR-AC, quasi il 95% era di sesso maschile; contrariamente, nel sottogruppo di soggetti affetti da AL-AC, la distribuzione per sesso era più omogenea, con un interessamento nel sesso maschile solo del 64%. Detta acquisizione suggerisce come l'AC, sia essa conseguenza della deposizione di transtiretina o di catene

leggere, sia più frequente nel sesso maschile, un'informazione coerente con i dati di letteratura ad oggi disponibili (65)(70).

Altro dato tuttavia fondamentale da segnalare riguarda il rapporto di coinvolgimento tra sesso maschile e sesso femminile nelle due forme di Amiloidosi Cardiaca: mentre il rapporto uomo/donna nell'Amiloidosi da catene leggere è quasi approssimabile a 2:1, nel caso dell'Amiloidosi da transtiretina esso è maggiore di 13:1; ergo l'ATTRwt-AC si esprime con una frequenza marcatamente più elevata nel sesso maschile. Detto risultato è perfettamente coerente con studi di letteratura; difatti nel 2008 Tanskanen et al. (63) hanno evidenziato come l'ATTRwt-AC sia circa 9 volte più frequente nel sesso maschile rispetto al sesso femminile.

Ulteriore riflessione deve essere posta in riferimento alla distribuzione dell'età nella popolazione oggetto di studio e nelle sottopopolazioni in cui quest'ultima si articola: si è osservato come la mediana delle età alla diagnosi dei pazienti appartenenti alla popolazione generale fosse 74 anni ma nel contesto dei soggetti affetti da ATTR-AC tuttavia detto dato di mediana si modificava, incrementando fino ai 78 anni. Per quanto concerne invece la popolazione affetta da AL-AC, la mediana delle età era di 69 anni e mezzo. Da questa analisi si può quindi evidenziare una differenza statisticamente significativa dell'età media alla diagnosi tra i due sottogruppi valutati: i soggetti affetti da Amiloidosi TTR tendono ad essere più anziani rispetto ai soggetti affetti da Amiloidosi AL, e questo dato risulta essere in linea con le acquisizioni della letteratura; nel già citato studio di Tanskanen et al. (63) si è appurato come la prevalenza di ATTRwt possa raggiungere il 25% dei soggetti con più di 85 anni. Per contro, uno studio di Merlini et al. (316) suggerisce come l'età media alla diagnosi sia di 63 anni, nonché che vi sia una lieve predominanza nel sesso maschile (55-60%). In ultima analisi, il dato circa la percentuale di soggetti affetti da ATTRv rispetto al totale dei pazienti con Amiloidosi da transtiretina (11%) non si è marcatamente discostato dai dati disponibili in letteratura; difatti in uno studio di Damy et al. questa percentuale è risultata del 5% (317).

5.1.2 Modalità di diagnosi della popolazione

Valutando poi le modalità con le quali si è giunti ad una diagnosi di Amiloidosi Cardiaca, alcuni elementi sono particolarmente degni di riflessione, in quanto possono presentare riscontri pratici particolarmente significativi. Considerando i soggetti affetti da AL-AC, si nota come una percentuale molto elevata di pazienti abbia eseguito un esame di tipo invasivo nel proprio iter diagnostico, sia esso stato una biopsia del grasso periombelicale, una biopsia extracardiaca od una biopsia endomiocardica. Contrariamente, nel caso di pazienti affetti da ATTR-AC, la percentuale di pazienti sottoposta ad una diagnostica invasiva è stata molto limitata. Questa marcata disparità potrebbe essere spiegata dal fatto che, per la diagnosi di ATTR-AC esiste una metodica non invasiva, ovvero la scintigrafia con traccianti osteotropi, che nel caso della sottopopolazione in esame è stata eseguita nel 90% dei casi; contrariamente, nell'iter diagnostico dei pazienti con AL-AC, non è disponibile una metodica non invasiva ed è necessario ricorrere a valutazioni di tipo bioptico affinché una diagnosi di AL-AC possa essere suffragata.

In ultima analisi, dette differenze in termini di modalità di diagnosi sono utili a definire quanto la scintigrafia con traccianti osteofili sia cruciale nel percorso diagnostico del paziente con Amiloidosi TTR, dato assolutamente concorde con la letteratura (178), e come ad oggi non vi sia una metodica non invasiva altrettanto consolidata per la diagnosi dell'Amiloidosi AL. L'importanza della scintigrafia con traccianti ossei nella diagnosi di Amiloidosi TTR era già stata evidenziata da Perugini et. al nel 2005 (165), mostrando come vi fosse elevata ritenzione cardiaca di ^{99m}Tc -DPD nella ATTR-AC.

Per quanto concerne il dato di risonanza magnetica, si nota come non vi siano differenze statisticamente significative tra le due sottopopolazioni analizzate in termini di numero di pazienti sottoposti ad RMC; questo perché la possibilità di eseguire un imaging di 2° livello disponibile in un centro HUB come quello dell'Azienda Ospedale-Università di Padova permette di suffragare sia la diagnosi di ATTR-AC che di AL-AC. Ciò è coerente con il position statement del "Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases" della Società Europea di Cardiologia, il quale descrive come rilevante l'esecuzione di una RMC nella diagnosi di Amiloidosi Cardiaca (178).

5.1.3 Comorbidità della popolazione

Ulteriori riflessioni possono essere prodotte considerando la distribuzione delle comorbidità di interesse cardiologico e non nell'ambito dei due sottogruppi analizzati, con ATTR-AC e AL-AC rispettivamente. Si noti difatti come una quota molto più significativa di pazienti AL-AC presentasse alla diagnosi una classe NYHA superiore a 2, rispetto ai soggetti della popolazione con ATTR-AC; questa differenza, statisticamente significativa, potrebbe essere spiegata, oltre che da una intrinseca maggiore aggressività nella presentazione clinica della malattia da catene leggere, anche dal fatto che spesso per l'AL-AC si realizzi una diagnosi tardiva. Lousada et al. hanno evidenziato difatti come quasi il 40% dei pazienti AL-AC arrivi alla diagnosi in modo tardivo, spesso anche dopo un anno dalla comparsa dei sintomi (318).

Altra differenza statisticamente significativa è stata evidenziata raffrontando le percentuali di fibrillazione atriale o flutter atriale nelle due popolazioni oggetto di studio: si nota come la prevalenza di fibrillazione atriale nella popolazione ATTR-AC sia del 60%, mentre nel caso della popolazione con AL-AC fosse sia del 15%. Questa analisi si trova assolutamente in linea con le informazioni provenienti dalla letteratura: Murtagh et. al (104) hanno descritto una presenza di FA nel 20% dei pazienti con Amiloidosi da catene leggere, mentre Mints et. al (122) hanno dimostrato come detta aritmia possa arrivare ad essere presente sino al 67% dei pazienti ATTR-AC. Tale differenza potrebbe essere giustificata dal fatto che i pazienti con Amiloidosi Cardiaca da transtiretina *wild-type* sono in genere più anziani rispetto ai corrispettivi AL; ragione per la quale nei pazienti con amiloidosi senile potrebbero partecipare all'aritmogenesi fattori di rischio quali ipertensione arteriosa, pregressa coronaropatia, diabete mellito ed infine l'età stessa. A riprova di quanto affermato, si nota come la prevalenza di IPA, DM e CAD nella popolazione ATTR-AC considerata nello studio sia largamente superiore a quella della popolazione AL-AC. La marcata differenza nella distribuzione di comorbidità di interesse cardiologico nei due sottogruppi analizzati potrebbe essere alla base del motivo per il quale quasi il 60% dei pazienti con ATTR-AC (e solo il 40% dei pazienti con AL-AC) tende a presentare un quadro di scompenso cardiaco al momento della diagnosi.

Oltre alle già citate differenze in termini di distribuzione delle comorbidità di tipo cardiovascolare nei due gruppi di pazienti con Amiloidosi Cardiaca, è opportuno sottolineare come i soggetti affetti da ATTR-AC presentino, mediamente, più patologie di natura osteoarticolare rispetto ai pazienti AL-AC, quali sindrome del tunnel carpale (spesso bilaterale), stenosi del canale lombare spinale e segno di Popeye. Difatti più della metà dei pazienti con ATTR-AC presentava sindrome del tunnel carpale, alternativamente monolaterale o bilaterale, patologia presentata solo dal 10% dei pazienti con AL-AC; stenosi spinale lombare e segno di Popeye (mono o bilaterale) erano di frequente presenti all'esame obiettivo dei pazienti con ATTR-AC, mentre nel caso dei pazienti con AL-AC non venivano riscontrati. Il motivo di questa marcata differenza tra i due sottogruppi è verosimilmente imputabile al significativo tropismo che le forme mal ripiegate di transtiretina posseggono nei confronti dei tessuti osteotendinei. Ciascuno di questi raffronti ha presentato una significatività statistica ed ha definito prevalenze di comorbidità non cardiovascolari nelle popolazioni indagate coerenti con quelle della letteratura, salvo quella che riguarda la sindrome del tunnel carpale bilaterale negli ATTRwt: Gonzalez-Lopez et al. (319), indagando una popolazione di ATTRwt di 108 pazienti, hanno riportato una prevalenza di detta condizione morbosa solo del 33%.

Ultimo dato da segnalare è la maggiore prevalenza di macroglossia nei pazienti con Amiloidosi AL-AC rispetto ai pazienti con ATTR-AC, in quanto questa è una tipica caratteristica riscontrata all'esame obiettivo dei soggetti con amiloidosi da catene leggere, e meno presente nei soggetti con ATTR-AC, come si evidenzia anche nella letteratura (320).

5.2 Caratteristiche elettrocardiografiche

Due risultati salienti sono emersi dalla comparazione dei tracciati elettrocardiografici appartenenti a soggetti affetti da ATTR-AC ed AL-AC, la differente prevalenza di casi di aritmie atriali (fibrillazione atriale e flutter atriale) e la differente prevalenza di bassi voltaggi nelle derivazioni periferiche.

Dalla valutazione degli ECG disponibili, si è osservato come il 43% dei pazienti con ATTR-AC presentassero alternativamente aritmia da fibrillazione atriale o da

flutter atriale, caratteristica presente solo nel 10% dei soggetti con AL-AC; questo perché, come già precedentemente discusso nel *Capitolo 5, paragrafo 1.3* il primo gruppo di pazienti ha mediamente un'età più avanzata ed una serie di comorbidità in più rispetto al secondo gruppo, e ciò rende conto della loro maggiore predisposizione ad eventi aritmici, in linea con quanto asserito in letteratura (104)(122).

La prevalenza di bassi voltaggi a livello delle derivazioni periferiche è risultata marcatamente superiore nei soggetti affetti da AL-AC rispetto a coloro affetti da ATTR-AC: la differenza è risultata statisticamente significativa. Per quanto riguarda i dati di letteratura Dubrey et al. hanno descritto una prevalenza del 70,7% di bassi voltaggi nelle derivazioni periferiche agli ECG di una popolazione con Amiloidosi AL(105); Sattinayagam et al. (313) hanno invece riportato una prevalenza del 16% nei pazienti con ATTRv con mutazione Thr60Ala; Dungu et al. hanno evidenziato una prevalenza del 55,7% nei pazienti con ATTRv, presentanti la mutazione Val122Iso; curiosamente, nella stessa popolazione l'11,5% e il 23,4% dei pazienti soddisfacevano rispettivamente i criteri di Sokolov-Lyon ed i criteri di Cornell per la diagnosi di ipertrofia ventricolare sinistra(117).

In un'indagine più completa, che ha analizzato i principali sottotipi di Amiloidosi Cardiaca, Rapezzi et al.(314) hanno riportato una prevalenza di bassi voltaggi di circa il 45% nel complesso, un dato coerente con quello riportato in questo studio, del 35%. Più nello specifico, lo studio di Rapezzi et al. ha descritto una prevalenza di bassi voltaggi del 25% per i soggetti con ATTRv-AC, del 40% con ATTRwt-AC, del 60% con AL-AC. I meccanismi fisiopatologici ed eziopatogenetici alla base dello sviluppo di bassi voltaggi dei complessi ventricolari nelle derivazioni periferiche di tracciati ECG di pazienti con Amiloidosi cardiaca solo parzialmente compresi. Risultati coerenti a quelli di questo studio e delle analisi disponibili in letteratura sono stati prodotti anche da uno studio condotto da Cyrille et al. (321).

Taluni studi hanno attribuito la maggiore presenza di bassi voltaggi dei QRS nell'amiloidosi AL ad una maggiore citotossicità delle fibrille amiloidi originate dalle catene leggere (96)(95)(312) e alla loro minore presenza nei pazienti con ATTRwt-AC perché, data la cinetica di deposizione più progressiva delle fibrille di

transtiretina, viene meno frequentemente raggiunto il carico di malattia necessario per cagionare questa alterazione elettrocardiografica.

5.3 Caratteristiche ecocardiografiche

L'amiloidosi cardiaca è da considerarsi il paradigma delle cardiomiopatie infiltrative ed è caratterizzata da un incremento degli spessori parietali con fisiopatologia restrittiva, ed aumentata rigidità strutturale, la quale cagiona rapido aumento delle pressioni di riempimento ventricolari (5)(42). Sia nel caso dei pazienti con AL-AC che nel caso di soggetti con ATTR-AC, si è evidenziato un abnorme incremento dello spessore del setto interventricolare e della parete posteriore: questo dato è perfettamente in linea con le acquisizioni della letteratura. Difatti sia studi condotti da Pozo et. al (123) che da Gertz et al. (125) evidenziano come l'aumento dello spessore del setto interventricolare sia una caratteristica saliente della presentazione ecocardiografica di amiloidosi cardiaca. Si è inoltre messo in luce come il fenomeno di pseudoipertrofia sia maggiormente marcato, con una differenza statisticamente significativa, nel caso di ATTR-AC. Detto incremento degli spessori parietali si traduce anche in una modifica dell'indice di massa ventricolare sinistra: nello studio si è difatti osservato come la mediana dei valori LVMI sia superiore all'intervallo di riferimento nella popolazione generale, sia per i soggetti con ATTR-AC che per i pazienti con AL-AC.

Altro risultato rilevante riguarda i volumi atriali: nello studio di questa tesi si è osservato come il volume dell'atrio sinistro nei pazienti con Amiloidosi Cardiaca sia particolarmente dilatato; la mediana dei valori di *volume index* atriale sinistro dei pazienti con AL-AC è di 40, e di 49 nei pazienti con ATTR-AC. Il motivo di detto incremento è da ricercarsi in primis nella disfunzione diastolica e nelle aumentate pressioni di riempimento, ed in seconda istanza nel deficit di contrattilità conseguente all'infiltrazione di proteine amiloidogeniche. Detta caratteristica è ben conosciuta e messa in evidenza nella letteratura di detto argomento (126)(127)(128).

Non sono risultate differenze statisticamente significative per i valori di frazione di eiezione nelle due sottopopolazioni esaminate; interessante notare come l'Amiloidosi Cardiaca, comportando una deficit principalmente di riempimento

ventricolare più che di contrattilità ventricolare, definisca un quadro ecocardiografico in cui la frazione di eiezione è preservata. Detto dato è in linea con quanto descritto in letteratura; difatti, González-López et al. hanno dimostrato come fino al 13% dei casi di scompenso cardiaco a frazione di eiezione preservata (HFpEF) siano imputabili a ATTRwt (64).

La valutazione dello strain longitudinale globale non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i due sottogruppi, tuttavia è apparso indubbio come i soggetti con Amiloidosi Cardiaca oggetto dello studio presentassero una riduzione del GLS (mediana della popolazione totale -11%). Detti risultati sono coerenti con quelli disponibili in letteratura: la diminuzione dello strain longitudinale globale con una alterazione della cinesi dei segmenti medio basali del ventricolo sinistro e concomitante risparmio del distretto apicale è ad oggi divenuto un punto cruciale per l'inquadramento e la diagnostica differenziale dell'Amiloidosi Cardiaca (129)(131)(132).

Non ci sono state differenze di rilevante significatività statistica nella valutazione della pressione sistolica stimata in arteria polmonare a livello dei due sottogruppi oggetto di studio; dalla letteratura è possibile definire come detto parametro nell'Amiloidosi Cardiaca sia spesso pari o superiore a 35mmHg (128), dato in linea con i risultati di questo studio (mediana della PAPs nella popolazione generale uguale a 34 mmHg).

L'interessamento valvolare nell'Amiloidosi Cardiaca non è raro e spesso può concernere tutte le valvole, ma la disfunzione che ne consegue è frequentemente lieve, e partecipa in minima parte allo scompenso cardiaco, il quale è maggiormente associato a disfunzione diastolica. Nello studio condotto si è registrata una prevalenza consistente di valvulopatia almeno moderata in entrambi i sottogruppi investigati, senza particolari differenze tra questi.

Bellavia et. al (201) hanno dimostrato come il versamento pericardico, sia esso di lieve o moderata entità, può essere presente sino al 50% dei casi di Amiloidosi Cardiaca; questo studio ha rilevato una prevalenza di versamento pericardico del 29.5% nella popolazione generale, con una differenza statisticamente significativa tra i pazienti AL (41%) e ATTR (21.1%); i casi di versamento pericardico severo, impattante sull'emodinamica cardiaca, sono stati descritti in letteratura, ma sono

molto rari (201). Nella valutazione della nostra popolazione oggetto di studio non se ne sono evidenziati.

5.4 Caratteristiche laboratoristiche

I principali dati di laboratorio investigati nel corso dello studio sono stati l'emoglobina plasmatica, la creatinina sierica (con associata stima della eGFR), ed i biomarcatori di interessamento cardiaco hs-cTnI, BNP e NTproBNP.

Considerazione a parte deve essere fatta sui peptidi natriuretici quali NTproBNP e BNP; questi sono componenti essenziali dell'algoritmo diagnostico dello scompenso cardiaco, nonché risultano elevati in numerose patologie di interesse cardiovascolare, compresa l'AC. Il valore mediano di NTproBNP, sia nei soggetti con AL-AC che nei soggetti con ATTR-AC, si è marcatamente discostato dall'intervallo di riferimento per questo marcatore. Un dato assolutamente coerente con la letteratura; Palladini et al. (322) hanno potuto definire come una popolazione di 152 pazienti con AL-AC presentasse in media valori di NTproBNP superiori al 97.5° percentile dei soggetti sani, proponendo come cut-off diagnostico il valore di 1285 ng/L (con sensibilità del 93% e specificità del 90%). Anche i pazienti con amiloidosi ATTR-AC possono presentare incremento dei livelli di peptidi natriuretici, ma tuttavia questo aumento risulta sensibilmente inferiore a quello rilevato nella AL-AC, come dimostrato da Cappelli et al. (323); il motivo di ciò è verosimilmente imputabile ad una minore cardiotossicità dei precursori amiloidogenici nell'ATTR-AC. Nello studio condotto, la mediana dei valori di BNP nella popolazione AL-AC e nella popolazione ATTR-AC sono risultate perfettamente coerenti a quanto descritto da Cappelli et al. (323). Una possibile giustificazione al marcato incremento dei valori di peptidi natriuretici che si riscontra nella AL-AC riguarda l'attivazione della via p38 MAPK: come dimostrato da Merlini et al. (316) le catene leggere amiloidogeniche possono indurre la segnalazione della p38-MAPK (protein chinasi attivata da mitogeni) con conseguente produzione di ROS, alterazione dell'omeostasi del calcio, disfunzione cellulare ed altresì aumento della trascrizione del peptide natriuretico di tipo B (biomarcatore di stiramento e danno miocardiocitico); v'è quindi una verosimile correlazione tra gli effetti cardiotossici della catena leggera e l'incremento di detto biomarcatore, che dipende, tra altri fattori, dalla segnalazione p38 MAPK (95)(96).

La mediana dei valori di hs-cTnI nella popolazione con AL-AC è risultata superiore allo stesso valore riferito per la popolazione con ATTR-AC. Detto risultato non si discosta da quanto descritto nello studio di Cappelli et al (323): nell'amiloidosi cardiaca si riscontra di sovente un incremento di hs-cTnI e hs-cTnT, che mediamente risulta più significativo nella forma AL rispetto alla forma ATTR, nonostante spesso non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra le due condizioni.

Detto incremento delle troponine ad alta sensibilità può essere giustificato dai differenti meccanismi di danno miocardico che la deposizione di fibrille amiloidogeniche è in grado di generare. Difatti, oltre all'alterazione cito-isto-architettuale dovuta all'ingombro delle fibrille di amiloide nello spazio extracellulare, il danno miocardico (ed il conseguente incremento delle troponine ad alta sensibilità) dipende anche dall'intrinseca cardio-tossicità delle fibrille amiloidogeniche: è stato difatti dimostrato che la deposizione in sede cardiaca delle catene leggere causa un incremento dello stress ossidoriduttivo dei cardiomiociti, nonché un'alterazione dell'omeostasi del calcio e un aumento della cardiomiocitolisi (da qui un innalzamento dei livelli di hs-cTn) (95)(96). Inoltre, è stata provata la cardiotossicità di monomeri ed oligomeri di transtiretina attraverso clivaggio della caspasi 3/7 e la concomitante formazione di anione superossido (99).

In ultima istanza, è da segnalare come per la sola popolazione con AL-AC siano state valutate ulteriori variabili, quali la concentrazione plasmatica di albumina, la presenza di componente monoclonale all'elettroforesi sierica, i livelli di free light chains e la loro differenza (dFLC), nonché la sussistenza o meno di proteinuria di Bence-Jones: questo perché nell'inquadramento dell'Amiloidosi AL è fondamentale definire detti parametri, in quanto la combinazione di SPIE, UPIE e quantificazione delle FLC sieriche possiede una sensibilità del 99% per l'identificazione di precursori pro-amiloidotici anormali, presenti in detta patologia (101). I risultati ottenuti in questo studio sono in larga parte sovrapponibili a quelli presenti in letteratura (100).

5.5 Follow up ed outcomes

Per quanto riguarda gli outcomes indagati, in questo studio si è posto particolare focus sull'eventuale decesso dei pazienti considerati o sulla loro possibile ospedalizzazione per scompenso cardiaco dopo la data di diagnosi. Il follow up mediano post diagnosi per i pazienti AL-AC è risultato di 21 mesi, per i pazienti ATTR-AC di 12 mesi; detta differenza, statisticamente significativa, può essere giustificata dal fatto che, mediamente, le date di diagnosi dei pazienti ATTR-AC considerati in questo studio fossero successive (temporalmente parlando) a quelle dei pazienti con AL-AC.

Per quanto riguarda l'outcome di *exitus*, si può apprezzare come durante il follow up il 37% dei pazienti con AL-AC sono deceduti, percentuale marcatamente inferiore se riferita alla popolazione ATTR-AC. La differenza è stata statisticamente significativa. Questo dato non fa altro che rimarcare la maggiore aggressività della malattia da catene leggere rispetto alla forma di Amiloidosi da transtiretina. Considerando la letteratura, si evidenzia come la sopravvivenza mediana delle forme ATTRwt sia circa 47 mesi (238), mentre nel caso dell'Amiloidosi AL, se non viene operato trattamento ematologico, questa può essere di 6 mesi (318). Complessivamente, la sopravvivenza mediana è di gran lunga superiore nella forma ATTR rispetto alla AL. Detta differenza può essere giustificata dall'elevatissimo effetto cardiотossico delle fibrille di catene leggere amiloidogeniche e dalla compresenza di patologie ematologiche che concorrono a definire il decesso di questi pazienti. Ulteriore dato interessante da considerare è la differenza in termini di ospedalizzazioni per scompenso cardiaco: un terzo dei soggetti AL-AC ha presentato almeno un ricovero per insufficienza cardiaca dopo la diagnosi, una percentuale superiore a quella dei soggetti con ATTR-AC; questa differenza può essere ancora una volta ascritta alla maggiore aggressività in termini di presentazione e decorso clinico della prima patologia rispetto la seconda.

5.6 Caratteristiche cliniche associate a maggior rischio di decesso

Tra i parametri clinici, elettrocardiografici, ecocardiografici e laboratoristici indagati nel corso di questo studio, taluni si sono rivelati più significativamente

correlati all'outcome di decesso. Per quanto concerne la sottopopolazione affetta da Amiloidosi da catene leggere, è stato possibile evidenziare come la presenza di fibrillazione atriale (o flutter atriale), all'analisi uni-variata, fosse un predittore prognostico negativo per la sopravvivenza; ciò è coerente con quanto dimostrato da Longhi et. al (220), ovvero che la sussistenza di aritmie sopraventricolari modifichi negativamente il decorso di questi pazienti. Aspetti clinici che correlano con maggiore mortalità nei pazienti con Amiloidosi AL sono la presenza di una classe NYHA strettamente superiore a 2 o la sussistenza di un HF sintomatico; come indicato da Muchtar et. al in plurime occasioni (190)(191), il coinvolgimento cardiaco è il più significativo predittore a lungo termine della sopravvivenza dei soggetti affetti da Amiloidosi da catene leggere, ergo una presentazione clinica associata ad un interessamento cardiaco più significativo ha chiaramente un impatto negativo sulla prognosi di questi pazienti. Considerando aspetti ecocardiografici, è possibile apprezzare come le mediane dei valori di LVEF e TAPSE negli individui AL deceduti siano inferiori, in modo statisticamente significativo, alle mediane dei medesimi valori riferiti però a soggetti AL ancora in vita: nonostante la cardiomiopatia amiloidotica sia di sovente caratterizzata da una FE conservata (127), essa tende a ridursi con il decorso di patologia (128), e con essa la dimensione della ventricolare ed il suo stroke volume. Ergo, la riduzione della frazione di eiezione può considerarsi un valido fattore prognostico negativo nei pazienti con AL-AC, come già dimostrato da Milani et al. (200). Per quanto riguarda la differente distribuzione dei valori di TAPSE nei soggetti deceduti per AL-AC, è importante ricordare come la disfunzione ventricolare destra costituisca un elemento prognostico negativo per detta patologia: Boldrini et al. recentemente hanno infatti dimostrato come un valore anomalo di TAPSE sia uno dei parametri in grado di riflettere al meglio il carico di infiltrazione amiloide a livello cardiaco (326).

Ruolo prognostico di primo rilievo nell'ambito dell'Amiloidosi Cardiaca è rivestito dai biomarcatori hs-cTnI e NTproBNP; lo studio evidenzia chiaramente come le mediane dei valori di detti biomarcatori nella popolazione di soggetti AL-AC deceduti siano superiori in modo statisticamente significativo alle mediane calcolate a partire dai medesimi valori riferiti ai soggetti AL ancora in vita; la funzione di predittore prognostico della troponina cardiaca e dei peptidi

natriuretici nell'Amiloidosi Cardiaca da catene leggere è oramai ampiamente riconosciuto, ed ha permesso di descrivere inoltre uno staging system introdotto dalla Mayo Clinic nel 2004 e poi modificato nel 2012 (193)(194)(195)(196)(197).

Considerando ora il contesto dei pazienti affetti da Amiloidosi Cardiaca da transtiretina, si evidenzia da subito come la classe funzionale NYHA strettamente superiore a 2 rivesta un ruolo fondamentale come predittore negativo per la sopravvivenza: in letteratura c'è ampio consensus circa la forza della correlazione con l'outcome di decesso (203). Esaminando aspetti di natura squisitamente ecocardiografica, si può apprezzare come la popolazione di soggetti ATTR-AC deceduti presentasse, in modo statisticamente significativo, valori di LVEF ridotti rispetto a quelli dei pazienti con ATTR-AC ancora in vita alla fine dello studio, nonché valori di E/e' aumentati: questi due parametri ecocardiografici sono a tutti gli effetti predittori prognostici per l'outcome di sopravvivenza, dato assolutamente coerente con quanto evidenziato da Chacko et. al (324) che, in uno studio prospettico durato circa 19 anni, hanno comprovato come E/e' e LVEF siano fattori prognostici indipendenti (ad una analisi multivariata) nella Amiloidosi Cardiaca da transtiretina. Il peptide natriuretico di tipo B e la troponina I ad alta sensibilità sono stati identificati, all'analisi uni-variata del presente studio, come fattori prognostici negativi nell'ambito della Amiloidosi Cardiaca da transtiretina, correlando con una riduzione della sopravvivenza in maniera statisticamente significativa; le mediane dei valori di hs-cTnI e BNP sono effettivamente più elevate nel sottogruppo di soggetti con ATTR-AC deceduti, rispetto al sottogruppo dei sopravvissuti, in accordo con la letteratura (202)(203).

5.7 Ruolo della Troponina I nella stratificazione del rischio per l'Amiloidosi Cardiaca

Nel corso di questo studio si è proceduto a verificare il ruolo della hs-cTnI misurato con test Abbott Architect Stat High Sensitive Troponin I assay come possibile predittore di mortalità e stratificatore del rischio nei pazienti affetti da Amiloidosi Cardiaca. Per quanto concerne l'Amiloidosi Cardiaca da catene leggere, impiegando un cut-off di 95 ng/L per detto marcatore, il quale ha presentato la miglior combinazione di sensibilità e specificità, è stato possibile evidenziare come i soggetti affetti da AL-AC, il cui valore di hs-cTnI alla diagnosi risultava superiore

al cut-off considerato avessero una curva di sopravvivenza peggiore rispetto a quella dei pazienti con AL-AC che, alla diagnosi, presentavano valore di hs-cTnI < 95 ng/L. La stessa analisi uni-variata per la Troponina I mediante Regressione di Cox ha potuto descrivere come i soggetti con AL-AC e hs-cTnI superiore al cut-off alla diagnosi presentassero un rischio di decesso 5 volte superiore a coloro il cui valore di hs-cTnI fosse < 95 ng/L. L'efficacia della troponina I ad alta sensibilità nel predire la mortalità dei pazienti con AL-AC può essere giustificata dal fatto che essa indaga un'eventuale sofferenza miocardica, e poiché il coinvolgimento cardiaco risulta essere di gran lunga il principale fattore prognostico nell'AC (190)(191), l'affidabilità di detto biomarcatore è ben comprensibile. Impiegando la hs-cTnI alternativamente alla cTnT nella stratificazione dei pazienti secondo lo staging system della Mayo Clinic 2004 (193) è stato possibile osservare come soggetti con elevati valori di troponina I e peptidi natriuretici (stadio III) alla diagnosi avessero una più alta probabilità di decesso rispetto a soggetti categorizzati come stadio I o stadio II; detto modello di staging tuttavia non è stato in grado di differenziare in maniera altrettanto attendibile gli esiti dei soggetti appartenenti a stadi intermedi: questa minore precisione responsabile della sovrapposizione soltanto parziale rispetto ai dati ottenuti da Dispenzieri et. al (193) è verosimilmente da attribuirsi ad una scarsa numerosità campionaria. Ci si auspica che studi futuri possano incorporare un maggior numero di pazienti al fine di evidenziare il differente outcome di mortalità tra soggetti in stadio I e stadio II. Risultati sostanzialmente simili sono stati ottenuti incorporando nel Mayo staging system 2012 (197)(198) il valore di hs-cTnI (cut-off 95 ng/L) alternativamente a quello di cTnT: il ruolo prognostico di detto biomarcatore è evidente nel differenziare soggetti appartenenti allo stadio I, II o III rispetto allo stadio IV, mentre si riduce sensibilmente nella differenziazione di soggetti appartenenti a stadi intermedi (come stadio II e stadio III). Ancora una volta, i risultati della stadiazione proposti in questo studio sono parzialmente sovrapponibili a quelli ottenuti da Kumar et al. (198), verosimilmente per una numerosità campionaria insufficiente. Per quanto riguarda le analisi multivariate eseguite mediante modello di Regressione di Cox, si è potuto evidenziare come la hs-cTnI rimanga un fattore prognostico indipendente in un modello che considera l'età alla diagnosi (HR 5.59), in un modello che presenta come covariata la frazione di eiezione del ventricolo (HR

3.72) ed altresì in un modello incorporante lo stadio funzionale NYHA (HR 3.44). Inoltre, si è evidenziato come l'aver alla diagnosi una classe funzionale NYHA strettamente superiore a 2 è fattore prognostico negativo indipendente dal livello di hs-cTnI nell'ambito della AL-AC. Dette acquisizioni sono perfettamente in linea con quanto descritto in letteratura circa il ruolo del coinvolgimento cardiaco nella prognosi dell'AL-AC.

Per quanto concerne l'Amiloidosi Cardiaca da transtiretina (*wild type* ed ereditaria), impiegando un cut-off di 70 ng/L per detto marcatore, è stato possibile evidenziare come i soggetti affetti da ATTR-AC, il cui valore di hs-cTnI alla diagnosi risultava superiore al cut-off considerato avessero una curva di sopravvivenza peggiore rispetto a quella dei pazienti con ATTR-AC che, alla diagnosi, presentavano valore di hs-cTnI < 70 ng/L. Eseguendo poi una regressione logistica univariata per hs-cTnI (considerata variabile continua) come predittore della mortalità nell'ATTR-AC, si è potuto evidenziare come questa riesca, in maniera statisticamente significativa, a correlare con una riduzione della sopravvivenza. Lo stesso risultato si è ottenuto effettuando una regressione logistica univariata per hs-cTnI (considerata variabile continua) valutando tuttavia un endpoint combinato di decesso od ospedalizzazione per scompenso cardiaco. Questi dati sono assolutamente consistenti con quanto già presente in letteratura, in particolare con quanto affermato da Kristen et al. (326) circa il ruolo prognostico (per la riduzione della sopravvivenza) delle troponine ad alta sensibilità nel contesto della ATTR-AC. Impiegando la hs-cTnI in sostituzione alla cTnT nella stratificazione dei pazienti secondo il Mayo staging system è stato possibile osservare come soggetti con elevati valori di troponina I e peptidi natriuretici (stadio III) alla diagnosi avessero una più alta probabilità di decesso rispetto a soggetti categorizzati come stadio I. Tramite detto raggruppamento non si è tuttavia riusciti a segnalare una differenza statisticamente significativa in termini di mortalità tra i pazienti appartenenti allo stadio I ed allo stadio II e tra i pazienti appartenenti allo stadio II e allo stadio III. Detta impossibilità è verosimilmente da attribuirsi, come anche già considerato per la AL-AC, ad una bassa numerosità campionaria: ci si auspica che futuri studi, utilizzando popolazioni ATTR-AC più consistenti rispetto a quella presentata nel seguente studio, riescano ad evidenziare il ruolo prognostico della hs-cTnI nella stratificazione dei pazienti con ATTR-AC, anche per quanto concerne

gli stadi intermedi. Stratificando i pazienti con ATTR-AC mediante NAC staging system (202) si è potuto constatare come coloro che appartengono allo stadio III con alterazione dei livelli sia NTproBNP che di eGFR presentano maggior probabilità di decesso rispetto a coloro che, in stadio I, non manifestano alterazioni né del primo, né del secondo marcatore, meritatamente ai cut-off previsti da Gillmore et. al (45 ml/min per eGFR, 3000 ng/L per NTproBNP). L'assenza di risultati statisticamente significativi nel confronto dei pazienti appartenenti allo stadio I ed allo stadio II è, ancora una volta, da attribuirsi alla ridotta numerosità del campione studiato.

Per quanto riguarda le analisi multivariate eseguite mediante il modello di Regressione logistica, considerando la hs-cTnI come variabile continua e come endpoint la combinazione di decesso o ricovero per scompenso cardiaco, si è potuto evidenziare come hs-cTnI permanga fattore prognostico di mortalità indipendente dal TAPSE per l'ATTR-AC, mentre non rimanga indipendente se considerata all'interno di un modello con E/e' od ancora in un modello con LVEF. In ultima analisi, considerando il modello di regressione logistica multivariata incorporante come variabili hs-cTnI e la classe funzionale NYHA, si osserva come la Troponina I rimanga indipendente come fattore prognostico di mortalità, ai limiti della significatività statistica. Detti risultati sono in parte concordi con quanto descritto da Kristen et al. (326), per i quali il ruolo predittivo delle troponine ad alta sensibilità nell'ATTR-AC non si manteneva indipendente all'analisi multivariata.

In ultima analisi, pur essendo indubbio che la ridotta numerosità campionaria (in riferimento alla popolazione oggetto di studio) non abbia permesso di identificare l'eventuale ruolo prognostico della hs-cTnI nei soggetti a rischio intermedio di mortalità (secondo il Modello Mayo 2004 e 2012) è possibile che la hs-cTnI presenti una cinetica di rilascio tale per la quale essa non sia in grado di predire al meglio l'outcome di alcune categorie di pazienti affetti da AC: è plausibile quindi che la hs-cTnT e la hs-cTnI abbiano, limitatamente a queste categorie, un comportamento diverso, sia nella AL-AC che nella ATTR-AC. Questa possibilità è stata già contemplata in studi presenti in letteratura (193).

5.8 Limiti dello studio

Lo studio proposto nella presente tesi mostra alcuni limiti che vanno considerati nell'analisi finale dei risultati.

In primo luogo, si tratta di uno studio retrospettivo; di conseguenza, la qualità dei dati raccolti dipende dalla disponibilità delle fonti utilizzate e dalla loro completezza. Da sottolineare il fatto che non si è riusciti ad ottenere per tutti i pazienti i parametri clinici, laboratoristici, elettrocardiografici ed ecocardiografici elencati nel *Capitolo 3*.

Inoltre, lo studio retrospettivo ha limitato anche la capacità di follow-up, in quanto non è stato possibile raccogliere in maniera accurata per tutti i pazienti informazioni relative ad un eventuale ricovero per scompenso cardiaco od ancora ad un possibile decesso sebbene si siano utilizzati diversi strumenti, incluso il contatto telefonico con il paziente.

In secondo luogo, l'analisi delle caratteristiche dei pazienti è limitata ad un sottoinsieme di individui per cui è stato possibile reperire un dato attendibile di hs-cTnI coerente con il periodo di diagnosi.

In terzo luogo, per quanto riguarda la sottopopolazione affetta da Amiloidosi Cardiaca da transtiretina, non si è eseguita alcuna forma di distinzione tra soggetti ATTRwt e ATTRv; questo in ragion del fatto che i pazienti con ATTRv presentavano una numerosità molto limitata.

Ulteriore limitazione dello studio concerne le analisi di sopravvivenza dei pazienti affetti da Amiloidosi Cardiaca, per la definizione delle quali ci si è solamente serviti di pazienti che, al momento della diagnosi, avessero presentato un valore di hs-cTnI ottenuto mediante test Abbott Architect Stat High Sensitive Troponin I assay.

Ulteriori studi prospettici sono in programma, in grado di categorizzare i pazienti affetti da Amiloidosi Cardiaca in tre sottopopolazioni e per ciascuna di esse definire parametri clinici, elettrocardiografici, ecocardiografici e laboratoristici (inclusa la hs-cTnI), al fine di distinguere, durante la compilazione, quali siano i fattori prognostici maggiormente impattanti la sopravvivenza globale di questa patologia.

Capitolo 6: Conclusione

L'amiloidosi cardiaca (AC) è una particolare cardiomiopatia infiltrativa correlata al deposito di fibrille amiloidi a livello della matrice extracellulare, la cui prognosi dipende dalla gravità del coinvolgimento cardiaco. I principali biomarcatori con funzione predittiva sulla mortalità in riferimento a detta patologia sono la troponina cardiaca ed i peptidi natriuretici.

Questo studio ha analizzato le caratteristiche clinico-anamnestiche, elettrocardiografiche, ecocardiografiche e laboratoristiche dei pazienti affetti da AC. Abbiamo evidenziato differenze significative tra i due sottogruppi investigati, costituiti da pazienti affetti da ATTR-AC e AL-AC, sia in termini di presentazione clinica, che in termini di comorbidità descritte, di caratteristiche elettrocardiografiche, di caratteristiche ecocardiografiche e laboratoristiche.

La troponina I ad alta sensibilità, misurata con test Abbott Architect Stat High Sensitive Troponin I assay, è risultata un rilevante determinante prognostico. In particolare, nei pazienti con AL-AC, un valore di hs-cTnI superiore 95 ng/L era associato ad una maggiore mortalità, rimanendo un determinante indipendente di outcome sfavorevole anche in modelli contemplanti età, classe NYHA alla diagnosi e FE ventricolare sinistra come co-variate. Quando integrata nei sistemi di stadiazione Mayo 2004 e Mayo 2012 alternativamente alla hs-cTnT, hs-cTnI con un cut-off di 95 ng/L ha permesso di differenziare in maniera significativa i soggetti a basso rischio e a rischio intermedio da quelli ad alto rischio di morte durante il follow up.

Per i pazienti con ATTR-AC, un valore di hs-cTnI superiore a 70 ng/L era associato ad un aumentato rischio di decesso. Quando integrata al sistema di stadiazione Mayo alternativamente alla hs-cTnT, hs-cTnI con un cut-off di 70 ng/L ha permesso di differenziare in maniera significativa i soggetti a basso rischio da quelli ad alto rischio di morte durante il follow up.

Ulteriori studi saranno con una numerosità campionare più ampia saranno necessari per valutare il ruolo prognostico di hs-cTnI nei gruppi a rischio intermedio delle due forme di AC.

Bibliografia

1. Mativ AB, Trubitsina NP, Matveenko AG, Barbitoff YA, Zhouravleva GA, Bondarev SA. Amyloid and Amyloid-Like Aggregates: Diversity and the Term Crisis. *Biochem.* 2020;85(9):1011–34.
2. Thomas RH. Historical Review. *Ger Life Lett.* 1951;5(1):66–8.
3. Jun EE. Ueber die Condensation der Hippursäure mit Phtalsäureanhydrid und mit Benzaldehyd. *Justus Liebigs Ann Chem.* 1893;275(1):1–8.
4. Eberth CJ. Zur Amyloidfrage. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med.* 1881;84(1):111–8.
5. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, et al. Amyloid nomenclature 2020 : update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid [Internet].* 2020;0(0):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>
6. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG. Congo Red and amyloids: History and relationship. *Biosci Rep.* 2019;39(1).
7. Elghetany MT, Saleem A. Methods for staining amyloid in tissues: A review. *Biotech Histochem.* 1988;63(4):201–12.
8. Sipe JD, Cohen AS. Review: History of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* 2000;130(2–3):88–98.
9. Steensma DP. “Congo” red: out of Africa? *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125(2):250–2.
10. PUCHTLER H, SWEAT F, LEVINE M. on the Binding of Congo Red By Amyloid. *J Histochem Cytochem.* 1962;10(3):355–64.
11. Frid P, Anisimov S V., Popovic N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 2007;53(1):135–60.
12. Revesz T, Ghiso J, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Frangione B, et al. Cerebral amyloid angiopathies: A pathologic, biochemical, and genetic view. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62(9):885–98.
13. COHEN AS, CALKINS E. THE ISOLATION OF AMYLOID FIBRILS AND A STUDY OF THE EFFECT OF COLLAGENASE AND HYALURONIDASE. *J Cell Biol [Internet].* 1964 Jun;21(3):481–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14189915>
14. Glenner GG, Bladen HA. Purification and reconstitution of the periodic fibril and unit structure of human amyloid. *Science (80-).* 1966;154(3746):271–2.
15. Selkoe DJ, Abraham CR. [37] Isolation of Paired Helical Filaments and Amyloid Fibers from Human Brain. *Methods Enzymol.* 1986;134(C):388–404.
16. Prusiner SB, DeArmond SJ. Prion diseases of the central nervous system. *Monogr Pathol.* 1990;(32):86–122.
17. Astbury WT, Dickinson S, Bailey K. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochem J.* 1935;29(10):2351-2360.1.

18. Cohen AS, Skinner M. the Amyloid Fibril. (34110):1373–5.
19. Eanes ED, Glenner GG. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem.* 1968;16(11):673–7.
20. Maji SK, Wang L, Greenwald J, Riek R. Structure-activity relationship of amyloid fibrils. *FEBS Lett [Internet].* 2009;583(16):2610–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.003>
21. © 1959 Nature Publishing Group. 1959;
22. Jiménez JL, Guijarro JI, Orlova E, Zurdo J, Dobson CM, Sunde M, et al. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* 1999;18(4):815–21.
23. Jiménez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson C V., Dobson CM, Saibil HR. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(14):9196–201.
24. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, et al. A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):16742–7.
25. Jaroniec CP, MacPhee CE, Bajaj VS, McMahon MT, Dobson CM, Griffin RG. High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(3):711–6.
26. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT. Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol.* 1997;4(2):119–25.
27. Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, et al. Amyloid β -protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem.* 1999;274(36):25945–52.
28. Huang THJ, Yang DS, Fraser PE, Chakrabartty A. Alternate aggregation pathways of the Alzheimer β -amyloid peptide: An in vitro model of preamyloid. *J Biol Chem.* 2000;275(46):36436–40.
29. Goldsbury CS, Wirtz S, Müller SA, Sunderji S, Wicki P, Aebi U, et al. Studies on the in vitro assembly of A β 1-40: Implications for the search for A β fibril formation inhibitors. *J Struct Biol.* 2000;130(2–3):217–31.
30. Kumar S, Sharma P, Arora K, Raje M, Guptasarma P. Calcium binding to beta-2-microglobulin at physiological Ph drives the occurrence of conformational changes which cause the protein to precipitate into amorphous forms that subsequently transform into amyloid aggregates. *PLoS One.* 2014;9(4).
31. Berthelot K, Lecomte S, Estevez Y, Couлары-Salin B, Bentaleb A, Cullin C, et al. Rubber Elongation Factor (REF), a Major Allergen Component in *Hevea brasiliensis* Latex Has Amyloid Properties. *PLoS One.* 2012;7(10):1–12.
32. Schmidt M, Wiese S, Adak V, Engler J, Agarwal S, Fritz G, et al. Cryo-EM structure of a transthyretin-derived amyloid fibril from a patient with hereditary ATTR amyloidosis. *Nat Commun [Internet].* 2019;10(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13038-z>
33. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding , Functional Amyloid , and Human Disease. 2006;

34. Uversky VN. Biochimica et Biophysica Acta Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins ☆. BBA - Proteins Proteomics [Internet]. 2013;1834(5):932–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.12.008>
35. Dobson CM. Protein folding and misfolding. 2003;426(December).
36. Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, et al. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of a α -Synuclein. Cell [Internet]. 2012;149(5):1048–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.037>
37. Serio TR, Cashikarn AG, Kowal A. Nucleated Conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant. 2000;289(August):23–7.
38. Lee J, Culyba EK, Powers ET, Kelly JW. Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. Nat Chem Biol. 2011 Jul;7(9):602–9.
39. Modler AJ, Gast K, Lutsch G, Damaschun G. Assembly of Amyloid Protofibrils via Critical Oligomers — A Novel Pathway of Amyloid Formation. 2003;2836(02):135–48.
40. Östner G, Lindström V, Christensen PH, Kozak M, Abrahamson M, Grubb A. Stabilization , Characterization , and Selective Removal of Cystatin C Amyloid Oligomers *. 2013;288(23):16438–50.
41. Bleiholder C, Dupuis NF, Wyttenbach T, Bowers MT. Ion mobility-mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to β -sheet in amyloid fibril formation. Nat Chem. 2011 Feb;3(2):172–7.
42. Merlini G, Bellotti V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. N Engl J Med. 2003;349(6):583–96.
43. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. Cell. 2012 Mar;148(6):1188–203.
44. Khurana R, Gillespie JR, Talapatra A, Minert LJ, Ionescu-Zanetti C, Millett I, et al. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. Biochemistry. 2001;40(12):3525–35.
45. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2019;20(7):421–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
46. Herbert J, Hutton T, Dwek RA. Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure. 1994;91(June):5602–6.
47. Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB, Unit IM, Postgraduate R, Hospital H, et al. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. 1995;92(May):4299–303.
48. Chem P, Phys C. On the lag phase in amyloid fibril formation. 2015;7606–18.
49. Saelices L, Johnson LM, Liang WY, Sawaya MR, Cascio D, Ruchala P, et al. Uncovering the Mechanism of Aggregation of Human. 2015;290(48):28932–43.
50. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective.
51. Stevens FJ, Kisilevsky R. Immunoglobulin light chains , glycosaminoglycans , and amyloid. 2000;57:441–9.

52. Merlini G. AL amyloidosis : from molecular mechanisms to targeted therapies. 2017;1–12.
53. Perfetti V, Palladini G, Casarini S, Navazza V, Rognoni P, Obici L, et al. The repertoire of κ light chains causing predominant amyloid heart involvement and identification of a preferentially involved germline gene , IGLV1-44. 2012;119(1):144–50.
54. Ihse E, Ybo A, Suhr OB, Lindqvist P, Backman C, Westermark P. Amyloid fibril composition is related to the phenotype of hereditary transthyretin V30M amyloidosis. 2008;(July):253–61.
55. Hellman U, Sletten K, Murphy CL, Weiss DT, Bergstr J. Amyloid deposits in transthyretin-derived amyloidosis : cleaved transthyretin is associated with distinct amyloid morphology. 2005;(April):224–32.
56. Kyle RA, Linos A, Beard CM, Linke RP, Gertz MA, Fallon WMO, et al. Incidence and Natural History of Primary Systemic Amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 Through 1989. *Blood* [Internet]. 1992;79(7):1817–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V79.7.1817.1817>
57. Pinney JH, Smith CJ, Taube JB, Lachmann HJ, Venner CP, Simon DJ, et al. Systemic amyloidosis in England : an epidemiological study. 2014;(March 2013):525–32.
58. Hemminki K, Li X, Försti A, Sundquist J, Sundquist K. Incidence and survival in non-hereditary amyloidosis in Sweden. 2012;
59. Quock TP, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder MS. Epidemiology of AL amyloidosis : a real-world study using US claims data. 2018;2(10):1046–53.
60. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2018;378(3):241–9.
61. Kyle RA. Treatment of chain amyloidosis (AL). *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1998;28:383–99.
62. Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10038):2641–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01274-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X)
63. Tanskanen M, Peuralinna T, Polvikoski T, Sulkava R, Hardy J, Singleton A, et al. Senile systemic amyloidosis affects 25 % of the very aged and associates with genetic variation in alpha2-macroglobulin and tau : A population- based autopsy study. 2008;3(December 2007):232–9.
64. González-López E, Gallego-Delgado M, Guzzo-Merello G, De Haro-Del Moral FJ, Cobo-Marcos M, Robles C, et al. Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2015;36(38):2585–94.
65. Maurizi N, Rella V, Fumagalli C, Salerno S, Castelletti S, Dagradi F, et al. Prevalence of cardiac amyloidosis among adult patients referred to tertiary centres with an initial diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* [Internet]. 2020;300(xxxx):191–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.07.051>
66. Abouezzeddine OF, Davies DR, Scott CG, Fayyaz AU, Askew JW, McKie PM, et al. Prevalence of Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *JAMA Cardiol*. 2021;6(11):1267–74.

67. AbouEzzedine OF, Davies DR, Scott CG, Fayyaz AU, Askew JW, McKie PM, et al. Prevalence of Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JAMA Cardiol* [Internet]. 2021;6(11):1267–74. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.3070>
68. Nativi-Nicolau J, Siu A, Dispenzieri A, Maurer MS, Rapezzi C, Kristen A V., et al. Temporal Trends of Wild-Type Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy in the Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey. *JACC CardioOncology*. 2021;3(4):537–46.
69. Gilstrap LG, Dominici F, Wang Y, El-Sady MS, Singh A, Di Carli MF, et al. Epidemiology of cardiac amyloidosis–associated heart failure hospitalizations among fee-for-service medicare beneficiaries in the United States. *Circ Hear Fail*. 2019;12(6):1–9.
70. Zampieri M, Nardi G, Del Monaco G, Allinovi M, Gabriele M, Zocchi C, et al. Changes in the perceived epidemiology of amyloidosis: 20 year-experience from a Tertiary Referral Centre in Tuscany. *Int J Cardiol* [Internet]. 2021;335:123–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.04.023>
71. Poterucha TJ, Elias P, Bokhari S, Einstein AJ, DeLuca A, Kinkhabwala M, et al. Diagnosing Transthyretin Cardiac Amyloidosis by Technetium Tc 99m Pyrophosphate: A Test in Evolution. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021;14(6):1221–31.
72. Nietlispach F, Webb JG, Ye J, Cheung A, Thompson CR, Ostry AJ, et al. Pathology of Transcatheter Valve Therapy. 2012;5(5).
73. Cavalcante JL, Rijal S, Abdelkarim I, Althouse AD, Sharbaugh MS, Fridman Y, et al. Cardiac amyloidosis is prevalent in older patients with aortic stenosis and carries worse prognosis. 2017;1–12.
74. Stenosis CA, Treibel TA, Fontana M, Gilbertson JA, Castelletti S, White SK, et al. Cardiomyopathies Occult Transthyretin Cardiac Amyloid in Severe. 2016;1–10.
75. Koschutnik M, Dona C, Wollenweber T, Ahmed N, Ozkor M, Kennon S, et al. Prevalence and Outcomes of Concomitant Aortic Stenosis and Cardiac Amyloidosis. 2021;77(2).
76. Study AP. Concomitant Transthyretin Amyloidosis and Severe Aortic Stenosis in Elderly Indian Population. 2021;3(4).
77. Murphy CL, Wang S, Kestler D, Larsen C, Benson D, Weiss DT, et al. Leukocyte chemotactic factor 2 (LECT2)-associated renal amyloidosis: a case series. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2010/10/16. 2010 Dec;56(6):1100–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20951486>
78. Sousa A, Coelho T, Barros J, Sequeiros J. Genetic Epidemiology of Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP) -Type I in Povoá do Varzim and Vila do Conde (North of Portugal). 1995;521.
79. Holmgren G, Costa PMP, Andersson C, Asplund K, Steen L, Beckman L, et al. Original articles Geographical distribution of TTR met30 carriers in northern Sweden : discrepancy between carrier frequency and prevalence rate. 1994;351–4.
80. Reilly MM, Staunton H, Harding AE. Familial amyloid polyneuropathy (TTR ala 60) in north west Ireland : a clinical , genetic , and epidemiological study. 1995;45–9.

81. Angeles L. Variant-sequence transthyretin (isoleucine 122) in late-onset cardiac amyloidosis in black americans. 2021;(Isoleucine 122).
82. Muchtar E, Dispenzieri A, Magen H, Grogan M, Mauermann M, Mcphail ED, et al. Systemic amyloidosis from A (AA) to T (ATTR): a review. 2020;
83. Muchtar E, Dispenzieri A, Magen H, Grogan M, Mauermann M, McPhail ED, et al. Systemic amyloidosis from A (AA) to T (ATTR): a review. *J Intern Med* [Internet]. 2021;289(3):268–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/joim.13169>
84. Buxbaum JN, Reixach N. Transthyretin: The servant of many masters. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(19):3095–101.
85. Sekijima Y, Wiseman RL, Matteson J, Hammarström P, Miller SR, Sawkar AR, et al. The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease. *Cell*. 2005;121(1):73–85.
86. Misra P, Blancas-Mejia LM, Ramirez-Alvarado M. Mechanistic Insights into the Early Events in the Aggregation of Immunoglobulin Light Chains. *Biochemistry*. 2019 Jul;58(29):3155–68.
87. Bellotti V, Mangione P, Merlini G. Review: Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis—The Archetype of Structural and Pathogenic Variability. *J Struct Biol* [Internet]. 2000;130(2):280–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847700942485>
88. Obici L, Merlini G. Autoimmunity Reviews Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. 2012;12:14–7.
89. Morris AD, Smith RN, Stone JR. The pathology and changing epidemiology of dialysis-related cardiac beta-2 microglobulin amyloidosis. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2019;42:30–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2019.05.002>
90. Poddaturi V, Armstrong DR, Hitchcock MA, Roberts WC, Guileyardo JM. Isolated atrial amyloidosis and the importance of molecular classification. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2013 Oct;26(4):387–9.
91. Larsen BT, Mereuta OM, Dasari S, Fayyaz AU, Theis JD, Vrana JA, et al. Correlation of histomorphological pattern of cardiac amyloid deposition with amyloid type : a histological and proteomic analysis of 108 cases. 2016;648–56.
92. Griffin JM, Rosenblum H, Maurer MS. Pathophysiology and Therapeutic Approaches to Cardiac Amyloidosis. 2021;1554–75.
93. Quarta CC, Solomon SD, Uraze I, Kruger J, Longhi S, Ferlito M, et al. Left ventricular structure and function in transthyretin-related versus light-chain cardiac amyloidosis. *Circulation*. 2014 May;129(18):1840–9.
94. Imperlini E, Gneccchi M, Rognoni P, Sabidò E, Chiara M, Palladini G, et al. Proteotoxicity in cardiac amyloidosis : amyloidogenic light chains affect the levels of intracellular proteins in human heart cells. 2017;(January):1–19.
95. Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, Wang B, Connors LH, Skinner M, et al. Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress. *Circ Res*. 2004 Apr;94(8):1008–10.
96. Shi J, Guan J, Jiang B, Brenner DA, Ward JE. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38 α

MAPK pathway. 2010;107(9).

97. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Colby C, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Revised Prognostic Staging System for Light Chain Amyloidosis Incorporating Cardiac Biomarkers and Serum Free Light Chain Measurements. 2012;30(9):989–95.
98. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, Perlini S, Perfetti V, Bosoni T, et al. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. 2006;107(10):3854–8.
99. Deechongkit S, Jiang X, Kelly JW, Buxbaum JN. Tissue damage in the amyloidoses : Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. 2004;101(9):2817–22.
100. Gillmore JD, Maurer MS, Falk RH, Merlini G, Damy T, Dispenzieri A, et al. Nonbiopsy Diagnosis of Cardiac Transthyretin Amyloidosis. Circulation. 2016 Jun;133(24):2404–12.
101. Palladini G, Russo P, Bosoni T, Verga L, Sarais G, Lavatelli F, et al. Identification of Amyloidogenic Light Chains Requires the Combination of Serum-Free Light Chain Assay with Immunofixation of Serum and Urine METHODS : 2009;504:499–504.
102. Kristian Thygesen Joseph S. Alpert Allan S. Jaffe et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction. Circulation. 018 Nov 13;138(20):e618–e651.
103. Sperry BW, Vranian MN, Hachamovitch R, Joshi H, McCarthy M, Ikram A, et al. Are classic predictors of voltage valid in cardiac amyloidosis? A contemporary analysis of electrocardiographic findings. Int J Cardiol [Internet]. 2016;214:477–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.030>
104. Murtagh B, Hammill SC, Gertz MA, Kyle RA, Tajik AJ, Grogan M. Electrocardiographic findings in primary systemic amyloidosis and biopsy-proven cardiac involvement. Am J Cardiol. 2005;95(4):535–7.
105. Dubrey SW, Cha K, Anderson J, Chamarthi B, Reisinger J, Skinner M, et al. The clinical features of immunoglobulin light-chain (AL) amyloidosis with heart involvement. QJM. 1998 Feb;91(2):141–57.
106. Habib G, Bucciarelli-Ducci C, Caforio ALP, Cardim N, Charron P, Cosyns B, et al. Multimodality Imaging in Restrictive Cardiomyopathies: An EACVI expert consensus document In collaboration with the “Working Group on myocardial and pericardial diseases” of the European Society of Cardiology Endorsed by The Indian Academy of Echocardiogr. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2017;18(10):1090–1.
107. Rahman JE, Helou EF, Gelzer-Bell R, Thompson RE, Kuo C, Rodriguez ER, et al. Noninvasive Diagnosis of Biopsy-Proven Cardiac Amyloidosis. J Am Coll Cardiol [Internet]. 2004;43(3):410–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2003.08.043>
108. Madias JE. Low QRS voltage and its causes. J Electrocardiol. 2008;41(6):498–500.
109. Cheng Z, Kang L, Tian Z, Chen W, Guo W, Xu J, et al. Utility of combined indexes of electrocardiography and echocardiography in the diagnosis of biopsy proven primary cardiac amyloidosis. Ann Noninvasive Electrocardiol. 2011;16(1):25–9.
110. Carroll JD, Gaasch WH, McAdam KPWJ. Amyloid cardiomyopathy:

- Characterization by a distinctive voltage/mass relation. *Am J Cardiol.* 1982;49(1):9–13.
111. Falk RH, Plehn JF, Deering T, Schick EC, Boinay P, Rubinow A, et al. Sensitivity and specificity of the echocardiographic features of cardiac amyloidosis. *Am J Cardiol.* 1987;59(5):418–22.
 112. CUETO-GARCIA L, TAJIK AJ, KYLE RA, EDWARDS WD, GREIPP PR, CALLAHAN JA, et al. Serial Echocardiographic Observations in Patients With Primary Systemic Amyloidosis: An Introduction to the Concept of Early (Asymptomatic) Amyloid Infiltration of the Heart. *Mayo Clin Proc.* 1984;59(9):589–97.
 113. Kristen A V., Perz JB, Schonland SO, Hegenbart U, Schnabel PA, Kristen JH, et al. Non-invasive predictors of survival in cardiac amyloidosis. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(6–7):617–24.
 114. Mussinelli R, Salinaro F, Alogna A, Boldrini M, Raimondi A, Musca F, et al. Diagnostic and Prognostic Value of Low QRS Voltages in Cardiac AL Amyloidosis. 2013;9–11.
 115. Cyrille NB, Goldsmith J, Alvarez J, Maurer MS. Prevalence and prognostic significance of low QRS voltage among the three main types of cardiac amyloidosis. *Am J Cardiol [Internet].* 2014;114(7):1089–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2014.07.026>
 116. Slivnick JA, Wallner AL, Vallakati A, Truong VT, Mazur W, Elamin MB, et al. Indexed left ventricular mass to QRS voltage ratio is associated with heart failure hospitalizations in patients with cardiac amyloidosis. *Int J Cardiovasc Imaging [Internet].* 2021;37(3):1043–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10554-020-02059-1>
 117. Dungu J, Sattianayagam PT, Whelan CJ, Gibbs SDJ, Pinney JH, Banypersad SM, et al. The electrocardiographic features associated with cardiac amyloidosis of variant transthyretin isoleucine 122 type in Afro-Caribbean patients. *Am Heart J.* 2012 Jul;164(1):72–9.
 118. Namdar M, Steffel J, Jetzer S, Schmied C, Hrlimann D, Camici GG, et al. Value of electrocardiogram in the differentiation of hypertensive heart disease, hypertrophic cardiomyopathy, aortic stenosis, amyloidosis, and fabry disease. *Am J Cardiol [Internet].* 2012;109(4):587–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.09.052>
 119. Hongo M, Yamamoto H, Kohda T, Takeda M, Kinoshita O, Uchikawa S, et al. Comparison of Electrocardiographic Findings in Patients With AL (Primary) Amyloidosis and in Familial Amyloid Polyneuropathy and Anginal Pain and Their Relation to. 9149(99):849–53.
 120. Cheng Z, Zhu K, Tian Z, Zhao D, Cui Q, Fang Q. The findings of electrocardiography in patients with cardiac amyloidosis. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2013;18(2):157–62.
 121. Zhao L, Li J, Tian Z, Fang Q. Clinical correlates and prognostic values of pseudoinfarction in cardiac light-chain amyloidosis. *J Cardiol [Internet].* 2016;68(5):426–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.11.004>
 122. Mints YY, Doros G, Berk JL, Connors LH, Ruberg FL. Features of atrial fibrillation in wild-type transthyretin cardiac amyloidosis : a systematic review and clinical experience. 2018;(June):772–9.

123. Pozo E, Kanwar A, Deochand R, Castellano JM, Naib T, Pazos-López P, et al. Cardiac magnetic resonance evaluation of left ventricular remodelling distribution in cardiac amyloidosis. *Heart*. 2014;100(21):1688–95.
124. Falk RH. Diagnosis and management of the cardiac amyloidoses. *Circulation*. 2005;112(13):2047–60.
125. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, Fermand JP, Hazenberg BP, Hawkins PN, et al. 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(4):319–28.
126. Knight DS, Zumbo G, Barcella W, Steeden JA, Muthurangu V, Martinez-Naharro A, et al. Cardiac Structural and Functional Consequences of Amyloid Deposition by Cardiac Magnetic Resonance and Echocardiography and Their Prognostic Roles. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2019;12(5):823–33.
127. Austin BA, Duffy B, Tan C, Rodriguez ER, Starling RC, Desai MY. Comparison of Functional Status, Electrocardiographic, and Echocardiographic Parameters to Mortality in Endomyocardial-Biopsy Proven Cardiac Amyloidosis. *Am J Cardiol* [Internet]. 2009;103(10):1429–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.01.361>
128. Tsang W, Lang RM. Echocardiographic evaluation of cardiac amyloid. *Curr Cardiol Rep*. 2010;12(3):272–6.
129. Pagourelas ED, Mirea O, Duchenne J, Van Cleemput J, Delforge M, Bogaert J, et al. Echo Parameters for Differential Diagnosis in Cardiac Amyloidosis: A Head-to-Head Comparison of Deformation and Nondeformation Parameters. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(3):1–11.
130. Klein AL, Hatle LK, Burstow DJ, Seward JB, Kyle RA, Bailey KR, et al. Doppler characterization of left ventricular diastolic function in cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1989;13(5):1017–26. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90254-4](http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097(89)90254-4)
131. Phelan D, Collier P, Thavendiranathan P, Popović ZB, Hanna M, Plana JC, et al. Relative apical sparing of longitudinal strain using two-dimensional speckle-tracking echocardiography is both sensitive and specific for the diagnosis of cardiac amyloidosis. *Heart*. 2012;98(19):1442–8.
132. Senapati A, Sperry BW, Grodin JL, Kusunose K, Thavendiranathan P, Jaber W, et al. Prognostic implication of relative regional strain ratio in cardiac amyloidosis. *Heart*. 2016;102(10):748–54.
133. Rapezzi C, Fontana M. Relative Left Ventricular Apical Sparing of Longitudinal Strain in Cardiac Amyloidosis: Is it Just Amyloid Infiltration? *JACC Cardiovasc Imaging*. 2019;12(7):1174–6.
134. Moon JC, Hawkins PN, Fontana M, D PH, Page SEE. Magnetic Resonance in Transthyretin Cardiac Amyloidosis. 2017;70(4).
135. Banypersad SM, Sci BMED, Mbc HB, Maestrini V, Hawkins PN, Ci FMEDS, et al. T1 Mapping for Myocardial Extracellular Volume Measurement by CMR. 2013;6(9):955–62.
136. Rehwald WG, Fieno DS, Chen E, Kim RJ, Judd RM. Myocardial Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Concentrations After Reversible and Irreversible Ischemic Injury. 2002;224–9.

137. Maceira AM, Joshi J, Prasad SK, Moon JC, Perugini E, Harding I, et al. Cardiovascular Magnetic Resonance in Cardiac Amyloidosis. 2005;186–93.
138. Fontana M, Chung R, Hawkins PN, Moon JC. Cardiovascular magnetic resonance for amyloidosis. 2015;133–44.
139. Kwong RY, Falk RH. Cardiovascular Magnetic Resonance in Cardiac Amyloidosis. :122–4.
140. Kellman P, Arai AE, McVeigh ER, Aletras AH. Phase-sensitive inversion recovery for detecting myocardial infarction using gadolinium-delayed hyperenhancement. *Magn Reson Med*. 2002 Feb;47(2):372–83.
141. Fontana M, Pica S, Reant P, Abdel-gadir A, Treibel TA, Banypersad SM, et al. Prognostic Value of Late Gadolinium Enhancement Cardiovascular Magnetic Resonance in Cardiac Amyloidosis. 2015;16–8.
142. Bolle G, Guery B, Joly D, Snanoudj R, Terrier B, Allouache M, et al. Presentation and Outcome of Patients with Systemic Amyloidosis Undergoing Dialysis. :375–81.
143. On Y. Renal amyloidosis. 2010;71(2):111–4.
144. Banypersad SM, Mbc HB, Fontana M, Ntusi NB, Mbc HB, Ferreira VM, et al. Noncontrast T1 Mapping for the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis. 2014;6(4).
145. White SK, Bs C, Mb CHB, Pica S, Castelletti S, Piechnik SK, et al. Native T1 Mapping in Transthyretin Amyloidosis. 2014;7(2):157–65.
146. Mapping MT, Sado DM, White SK, Piechnik SK, Banypersad SM, Treibel T, et al. Identification and Assessment of Anderson-Fabry Disease by Cardiovascular Magnetic Resonance Noncontrast. 2013;16–8.
147. Noncontrast Magnetic Resonance for. 2020;13(1).
148. Maceira AM, Joshi J, Prasad SK, Moon JC, Perugini E, Harding I, et al. Cardiovascular magnetic resonance in cardiac amyloidosis. *Circulation*. 2005;111(2):186–93.
149. Moon JC, Hawkins PN, Fontana M, D PH. Native T1 and Extracellular Volume in Transthyretin Amyloidosis. 2019;12(5).
150. Banypersad SM, Fontana M, Maestrini V, Sado DM, Captur G, Petrie A, et al. T1 mapping and survival in systemic light-chain amyloidosis. 2015;244–51.
151. Karamitsos TD, Piechnik SK, Banypersad SM, Fontana M, Ntusi NB, Ferreira VM, et al. Noncontrast T1 mapping for the diagnosis of cardiac amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013 Apr;6(4):488–97.
152. Baggiano A, Boldrini M, Martinez-Naharro A, Kotecha T, Petrie A, Rezk T, et al. Noncontrast Magnetic Resonance for the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020 Jan;13(1 Pt 1):69–80.
153. Amyloidosis T, Fontana M, Banypersad SM, Treibel TA, Abdel-gadir A, Lane T, et al. Differential Myocyte Responses in Patients with Cardiac Light-Chain Amyloidosis : A Cardiac MR Imaging Study 1. 2015;277(2).
154. Martinez-Naharro A, Kotecha T, Norrington K, Boldrini M, Rezk T, Quarta C, et al. Native T1 and Extracellular Volume in Transthyretin Amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2019 May;12(5):810–9.

155. Street S. CMR-Verified Regression of Cardiac AL Amyloid After Chemotherapy. *JACC Cardiovasc Imaging* [Internet]. 2018;11(1):152–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2017.02.012>
156. Amyloidosis AL, Banypersad SM, Sado DM, Flett AS, Gibbs SDJ, Pinney JH, et al. Quantification of Myocardial Extracellular Volume Fraction An Equilibrium Contrast Cardiovascular Magnetic Resonance Study. 2012;16–8.
157. Gillmore JD, Moon JC, Hawkins PN, Fontana M, D PH. Myocardial Edema and Prognosis in Amyloidosis. 2018;71(25).
158. Shirahama T, Cohen AS. High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J Cell Biol.* 1967 Jun;33(3):679–708.
159. Martinez-Naharro A, Knight DS, Kotecha T, Francis R, Zumbo G, Treibel TA, et al. 028 Routine identification of hypoperfusion in cardiac amyloidosis by myocardial blood flow mapping. *Heart* [Internet]. 2017;103(Suppl 1):A24--A24. Available from: https://heart.bmj.com/content/103/Suppl_1/A24
160. Kellman P, Hansen MS, Nielles-vallespin S, Nickander J, Themudo R, Ugander M, et al. Myocardial perfusion cardiovascular magnetic resonance : optimized dual sequence and reconstruction for quantification. 2017;1–14.
161. Wizenberg TA, Muz J, Sohn YH, Samlowski W, Weissler AM. Value of positive myocardial technetium-99m-pyrophosphate scintigraphy in the noninvasive diagnosis of cardiac amyloidosis. *Am Heart J.* 1982 Apr;103(4 Pt 1):468–73.
162. Puille M, Altland K, Linke RP, Steen-Müller MK, Kiett R, Steiner D, et al. 99mTc-DPD scintigraphy in transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2002 Mar;29(3):376–9.
163. Bokhari S, Shahzad R, Castaño A, Maurer MS. Nuclear imaging modalities for cardiac amyloidosis. *J Nucl Cardiol Off Publ Am Soc Nucl Cardiol.* 2014 Feb;21(1):175–84.
164. Castano A, Haq M, Narotsky DL, Goldsmith J, Weinberg RL, Morgenstern R, et al. Multicenter Study of Planar Technetium 99m Pyrophosphate Cardiac Imaging Predicting Survival for Patients With ATTR Cardiac Amyloidosis. 2021;10032.
165. Perugini E, Guidalotti PL, Salvi F, Cooke RMT, Pettinato C, Riva L, et al. Noninvasive Etiologic Diagnosis of Cardiac 1 , 2-Propanodicarboxylic Acid Scintigraphy. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2005;46(6):1076–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.05.073>
166. Rapezzi C, Quarta CC, Guidalotti PL, Pettinato C, Fanti S, Leone O, et al. Role of (99m)Tc-DPD scintigraphy in diagnosis and prognosis of hereditary transthyretin-related cardiac amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011 Jun;4(6):659–70.
167. Papantoniou V, Valsamaki P, Kastiris S, Tsiouris S, Delichas Z, Papantoniou Y, et al. Imaging of cardiac amyloidosis by (99m)Tc-PYP scintigraphy. *Hell J Nucl Med.* 2015;18 Suppl 1:42–50.
168. Galat A, Rosso J, Guellich A, Gucht A Van Der, Bodez D, Guendouz S, et al. Usefulness of Tc-HMDP scintigraphy for the etiologic diagnosis and prognosis of cardiac amyloidosis Usefulness of 99m Tc-HMDP scintigraphy for the etiologic diagnosis and prognosis of cardiac amyloidosis. 2015;6129(October).
169. Glaudemans AWJM, Rheenen RWJ Van, Noordzij W, Koole M, Blokzijl H, Dierckx RAJO, et al. Bone scintigraphy with. 2014;6129(1):35–44.

170. Rapezzi C, Gagliardi C, Milandri A. Analogies and disparities among scintigraphic bone tracers in the diagnosis of cardiac and non- cardiac ATTR amyloidosis. *J Nucl Cardiol* [Internet]. 2019;26(5):1638–41. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12350-018-1235-6>
171. Suhr OB, Na U. Tc-DPD uptake reflects amyloid fibril composition in hereditary transthyretin amyloidosis. 2016;121(1):17–24.
172. Stats MA, Stone JR. Varying levels of small microcalcifications and macrophages in ATTR and AL cardiac amyloidosis : implications for utilizing nuclear medicine studies to subtype amyloidosis. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 2016;25(5):413–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carpath.2016.07.001>
173. Falk RH, Utkin M, Lee VW, Rubinow A, Hood WB, Cohen AS. Sensitivity of Technetium-99m-Pyrophosphate Scintigraphy In Diagnosing Cardiac Amyloidosis. 1982;826–30.
174. Martinez-Naharro A, Baksi AJ, Hawkins PN, Fontana M. Diagnostic imaging of cardiac amyloidosis. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2020;17(7):413–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-020-0334-7>
175. Hutt DF, Quigley A, Page J, Hall ML, Burniston M, Gopaul D, et al. Utility and limitations of ³, ³-diphosphono-1, 2-propanodicarboxylic acid scintigraphy in systemic amyloidosis. 2014;1289–98.
176. Martinez-Naharro A, Treibel TA, Abdel-Gadir A, Bulluck H, Zumbo G, Knight DS, et al. Magnetic Resonance in Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jul;70(4):466–77.
177. Bokhari S, Castaño A, Pozniakoff T, Deslisle S, Latif F, Maurer MS. (99m)Tc-pyrophosphate scintigraphy for differentiating light-chain cardiac amyloidosis from the transthyretin-related familial and senile cardiac amyloidoses. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013 Mar;6(2):195–201.
178. Garcia-Pavia P, Rapezzi C, Adler Y, Arad M, Basso C, Brucato A, et al. Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis: a position statement of the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2021;1554–68.
179. Vandenberghe R, Laere K Van, Ivanoiu A, Salmon E, Bastin C, Triau E, et al. F-Flutemetamol Amyloid Imaging in Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment A Phase 2 Trial. 2010;319–29.
180. Dorbala S, Vangala D, Semer J, Strader C, Jr JRB, Carli MF Di, et al. Imaging cardiac amyloidosis : a pilot study using ¹⁸F-florbetapir positron emission tomography. 2014;1652–62.
181. Osborne DR, Acuff SN, Stuckey A, Wall JS. A routine PET / CT protocol with streamlined calculations for assessing cardiac amyloidosis using F-Florbetapir. 2015;2(May):1–9.
182. Antoni G, Lubberink M, Estrada S, Axelsson J, Carlson K, Lindsj L, et al. In Vivo Visualization of Amyloid Deposits in the Heart with ¹¹C-PIB and PET. :213–20.
183. Lee M, Cheon GJ, Seo J, Sohn D, Lee S. C-Pittsburgh B PET Imaging in Cardiac Amyloidosis. 2015;8(1).
184. Law WP, Wang WYS, Moore PT, Mollee PN, Ng ACT. Cardiac Amyloid Imaging with ¹⁸F-Florbetaben PET: A Pilot Study. *J Nucl Med*. 2016 Nov;57(11):1733–9.
185. Bishop E, Brown EE, Fajardo J, Barouch LA, Judge DP, Halushka MK, et al. Seven

- factors predict a delayed diagnosis of cardiac amyloidosis. *Amyloid* [Internet]. 2018;0(0):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1498782>
186. Vrana JA, Gamez JD, Madden BJ, Theis JD, Iii HRB, Dogan A. Brief report Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry – based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. 2009;114(24):4957–9.
 187. Dasari S, Theis JD, Vrana JA, Rech KL, Dao LN, Howard MT, et al. Amyloid Typing by Mass Spectrometry in. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2020;95(9):1852–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.06.029>
 188. Scho SO, Hegenbart U, Bochtler T, Mangatter A, Hansberg M, Ho AD, et al. Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis : a systematic investigation of 117 patients. 2012;119(2):488–93.
 189. Fern C, Larrea D, Verga L, Morbini P, Klersy C, Lavatelli F, et al. LYMPHOID NEOPLASIA A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidoses. 2015;125(14):2239–44.
 190. Muchtar E, Gertz MA, Kumar SK, Lacy MQ, Dingli D, Buadi FK, et al. Improved outcomes for newly diagnosed AL amyloidosis between 2000 and 2014 : cracking the glass ceiling of early death. 2017;129(15):2111–9.
 191. Muchtar E, Gertz MA, Lacy MQ, Go RS, Buadi FK, Dingli D, et al. Ten-year survivors in AL amyloidosis: characteristics and treatment pattern. *Br J Haematol*. 2019 Dec;187(5):588–94.
 192. Kyle A, Fallon O. Primary Systemic Amyloidosis: Multivariate Analysis for Prognostic Factors in 168 Cases. *Blood* [Internet]. 1986;68(1):220–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V68.1.220.220>
 193. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, Lacy MQ, Burritt MF, Therneau TM, et al. Serum Cardiac Troponins and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide: A Staging System for Primary Systemic Amyloidosis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2004;22(18):3751–7. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.03.029>
 194. Palladini G, Sachchithanantham S, Milani P, Gillmore J, Foli A, Lachmann H, et al. A European collaborative study of cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone in upfront treatment of systemic AL amyloidosis. *Blood* [Internet]. 2015;126(5):612–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120313793>
 195. Muchtar E, Therneau TM, Larson DR, Gertz MA, Lacy MQ, Buadi FK, et al. Comparative analysis of staging systems in AL amyloidosis. *Leukemia* [Internet]. 2019;811–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0370-z>
 196. Dittrich T, Benner A, Kimmich C, Veelken K, Kristen A V, Bochtler T, et al. Performance analysis of AL amyloidosis cardiac biomarker staging systems with. 2019;104(7):1451–9.
 197. Dispenzieri A, Lacy MQ, Katzmann JA, Rajkumar SV, Abraham RS, Hayman SR, et al. Absolute values of immunoglobulin free light chains are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. 2006;107(8):3378–83.
 198. Kumar S, Dispenzieri A, Katzmann JA, Larson DR, Colby CL, Lacy MQ, et al. Serum immunoglobulin free light-chain measurement in primary amyloidosis : prognostic value and correlations with clinical features. 2010;116(24):5126–9.
 199. Wechalekar A, Wassef N, Gibbs S, Gillmore J, Dike F, Lachmann H, et al. A New

- Staging System for AL Amyloidosis Incorporating Serum Free Light Chains, cardiac Troponin-T and NT-ProBNP. *Blood*. 2009 Nov 20;114:2796.
200. Milani P, Dispenzieri A, Scott CG, Gertz MA, Perlino S, Mussinelli R, et al. Independent Prognostic Value of Stroke Volume Index in Patients With Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2018 May;11(5):e006588.
 201. Bellavia D, Pellikka PA, Al-Zahrani GB, Abraham TP, Dispenzieri A, Miyazaki C, et al. Independent predictors of survival in primary systemic (AL) amyloidosis, including cardiac biomarkers and left ventricular strain imaging: an observational cohort study. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr*. 2010 Jun;23(6):643–52.
 202. Gillmore JD, Damy T, Fontana M, Hutchinson M, Lachmann HJ, Martinez-Naharro A, et al. A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur Heart J* [Internet]. 2018 Aug 7;39(30):2799–806. Available from: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx589>
 203. Diuretic Dose and NYHA Functional Class Are Independent Predictors of Mortality in Patients With Transthyretin Cardiac Amyloidosis. 2020;2(3).
 204. Vaishnav J, Hubbard A, Chasler JE, Lepley D. Management of heart failure in cardiac amyloidosis using an ambulatory diuresis clinic. *Am Heart J* [Internet]. 233:122–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2020.12.009>
 205. Freeman R, Ch B. Neurogenic Orthostatic Hypotension. 2021;615–24.
 206. Alberto J, Alejandra P, Duarte G, Kaufmann H. Orthostatic hypotension in hereditary transthyretin amyloidosis : epidemiology , diagnosis and management. *Clin Auton Res* [Internet]. 2019;29(s1):33–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10286-019-00623-x>
 207. Hein S, Bauer R, Katus HA, Arnt V, Hein S, Bauer R, et al. Standard heart failure medication in cardiac transthyretin amyloidosis : useful or harmful ? Standard heart failure medication in cardiac transthyretin amyloidosis : useful or harmful ? 2017;6129(April).
 208. Tini G, Cappelli F, Biagini E, Musumeci B, Merlo M, Crotti L, et al. Current patterns of beta-blocker prescription in cardiac amyloidosis : an Italian nationwide survey. 2021;(January):3369–74.
 209. Clemmensen TS, Mølgaard H, Sørensen J, Eiskjaer H, Andersen NF, Mellekjær S, et al. Inotropic myocardial reserve deficiency is the predominant feature of exercise haemodynamics in cardiac amyloidosis. (Lv).
 210. Clemmensen TS, Eiskjær H, Mølgaard H, Larsen AH, Soerensen J, Andersen NF. Abnormal Coronary Flow Velocity Reserve and Decreased Myocardial Contractile Reserve Are Main Factors in Relation to Physical Exercise Capacity in Cardiac Amyloidosis. *J Am Soc Echocardiogr* [Internet]. :1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.echo.2017.09.007>
 211. Fard D, Damy T, Roubille F, Galat A, Doan H, Squara P, et al. Outcome of patients with cardiac amyloidosis admitted to an intensive care unit for acute heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* [Internet]. 2018;111(10):582–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2018.03.004>
 212. Davis MK, Lee PHU, Witteles RM. Changing outcomes after heart transplantation in patients with amyloid cardiomyopathy. *J Hear Lung Transplant* [Internet].

2015;34(5):658–66. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2014.09.006>

213. Witteles RM. Cardiac Transplantation and Mechanical Circulatory Support in Amyloidosis. *JACC CardioOncology* [Internet]. 2021;3(4):516–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.05.007>
214. Grupper A, Park SJ, Pereira NL, Schettle SD, Gerber Y, Topilsky Y, et al. Role of ventricular assist therapy for patients with heart failure and restrictive physiology : Improving outcomes for a lethal disease. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2015;34(8):1042–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2015.03.012>
215. Kittleson MM, Cole RM, Patel J, Ramzy D, Passano E, Chang DH, et al. Mechanical circulatory support for cardiac amyloidosis. *Clin Transplant*. 2019 Oct;33(10):e13663.
216. Michelis KC, Zhong L, Tang WHW, Young JB, Peltz M, Drazner MH, et al. Durable Mechanical Circulatory Support in Patients With Amyloid Cardiomyopathy: Insights From INTERMACS. *Circ Heart Fail*. 2020 Dec;13(12):e007931.
217. Feng D, Edwards WD, Oh JK, Chandrasekaran K, Grogan M, Martinez MW, et al. Intracardiac Thrombosis and Embolism in Patients With Cardiac Amyloidosis. 2007;2420–6.
218. Feng D, Syed IS, Martinez M, Oh JK, Jaffe AS, Grogan M, et al. Intracardiac Thrombosis and Anticoagulation Therapy in Cardiac Amyloidosis. 2009;2490–7.
219. Giancaterino S, Urey MA, Darden D, Hsu JC. Management of Arrhythmias in Cardiac Amyloidosis. *JACC Clin Electrophysiol*. 2020 Apr;6(4):351–61.
220. Longhi S, Quarta CC, Milandri A, Lorenzini M, Gagliardi C, Manuzzi L, et al. Atrial fibrillation in amyloidotic cardiomyopathy: prevalence, incidence, risk factors and prognostic role. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis*. 2015;22(3):147–55.
221. Sanchis K, Cariou E, Colombat M, Ribes D, Huart A, Cintas P, et al. Atrial fibrillation and subtype of atrial fibrillation in cardiac amyloidosis: clinical and echocardiographic features, impact on mortality. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis*. 2019 Sep;26(3):128–38.
222. El-Am EA, Dispenzieri A, Melduni RM, Ammash NM, White RD, Hodge DO, et al. Direct Current Cardioversion of Atrial Arrhythmias in Adults With Cardiac Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Feb;73(5):589–97.
223. Gertz MA, Falk RH, Skinner M, Cohen AS, Kyle RA. Worsening of Congestive Heart Failure in Amyloid Heart Disease Treated by Calcium Channel-Blocking Agents. 1985;1985.
224. Rubinow A, Skinner M, Cohen AS. Digoxin sensitivity in amyloid cardiomyopathy. *Circulation*. 1981 Jun;63(6):1285–8.
225. Muchtar E, Gertz MA, Kumar SK, Lin G, Boilson B, Clavell A, et al. Digoxin use in systemic light-chain (AL) amyloidosis: contra-indicated or cautious use? *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis*. 2018 Jun;25(2):86–92.
226. Martinez-naharro A, Gonzalez-lopez E, Corovic A, Mirelis JG, Baksi AJ, Moon JC, et al. High Prevalence of Intracardiac Thrombi in Cardiac Amyloidosis Rassi Score. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2019;73(13):1733–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.035>

227. Donnellan E, Elshazly MB, Vakamudi S, Wazni OM, Cohen JA, Kanj M, et al. No Association Between CHADS-VASc Score and Left Atrial Appendage Thrombus in Patients With Transthyretin Amyloidosis. Vol. 5, JACC. Clinical electrophysiology. United States; 2019. p. 1473–4.
228. Tan NY, Mohsin Y, Hodge DO, Lacy MQ, Packer DL, Dispenzieri A, et al. Catheter Ablation for Atrial Arrhythmias in Patients With Cardiac Amyloidosis. 2015;(1):1167–73.
229. Algalarrondo V, Dinanian S, Juin C, Chemla D, Bennani SL, Sebag C, et al. Prophylactic pacemaker implantation in familial amyloid polyneuropathy. *Hear Rhythm*. 2012 Jul;9(7):1069–75.
230. Donnellan E, Wazni OM, Saliba WI, Baranowski B, Hanna M, Martyn M, et al. Cardiac devices in patients with transthyretin amyloidosis: Impact on functional class, left ventricular function, mitral regurgitation, and mortality. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2019 Nov;30(11):2427–32.
231. John RM, Stern DL. Use of Implantable Electronic Devices in Patients With Cardiac Amyloidosis. *Can J Cardiol [Internet]*. 2020;36(3):408–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.12.002>
232. Scully PR, Treibel TA, Fontana M, Lloyd G, Mullen M, Pugliese F, et al. Prevalence of Cardiac Amyloidosis in Patients Referred for Transcatheter Aortic Valve Replacement. Vol. 71, *Journal of the American College of Cardiology*. 2018. p. 463–4.
233. Rosenblum H, Masri AM, Narotsky D, Jeff G, Hamid N, Hahn RT, et al. UNVEILING OUTCOMES IN COEXISTING SEVERE AORTIC STENOSIS AND TRANSTHYRETIN CARDIAC AMYLOIDOSIS. *J Am Coll Cardiol [Internet]*. 2020;75(11):2118. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(20\)32745-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(20)32745-5)
234. Narotsky DL, Hamid N, Khaliq OK, Casta A, Morgenstern R, Deluca A, et al. Unveiling transthyretin cardiac amyloidosis and its predictors among elderly patients with severe aortic stenosis undergoing transcatheter aortic valve replacement. 2017;2879–87.
235. Treibel TA, Fontana M, Gilbertson JA, Castelletti S, White SK, Scully PR, et al. Occult Transthyretin Cardiac Amyloid in Severe Calcific Aortic Stenosis: Prevalence and Prognosis in Patients Undergoing Surgical Aortic Valve Replacement. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2016 Aug;9(8).
236. Longhi S, Lorenzini M, Gagliardi C, Milandri A, Marzocchi A, Marrozzini C, et al. Coexistence of Degenerative Aortic Stenosis and Wild-Type Transthyretin-Related Cardiac Amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2016;9(3):325–7.
237. Kumar SK, Gertz MA, Dispenzieri A. Validation of Mayo Clinic staging system for light chain amyloidosis with high-sensitivity troponin. *J Clin Oncol*. 2019;37(2):171–3.
238. Grogan M, Scott CG, Kyle RA, Zeldenrust SR, Gertz MA, Lin G, et al. Natural History of Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis and Risk Stratification Using a Novel Staging System. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(10):1014–20.
239. Scully PR, Patel KP, Treibel TA, Thornton GD, Hughes RK, Chadalavada S, et al. Prevalence and outcome of dual aortic stenosis and cardiac amyloid pathology in patients referred for transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J*. 2020;41(29):2759–67.

240. Xu B, Godoy Rivas C, Rodriguez ER, Tan C, Gillinov AM, Harb S, et al. Unrecognized Cardiac Amyloidosis at the Time of Mitral Valve Surgery: Incidence and Outcomes. *Cardiol.* 2019;142(4):253–8.
241. Volz MJ, Pleger ST, Weber A, Geis NA, Hamed S, Mereles D, et al. Initial experience with percutaneous mitral valve repair in patients with cardiac amyloidosis. *Eur J Clin Invest.* 2021;51(6):1–13.
242. Giannini F, Colombo A. Percutaneous treatment of tricuspid valve in refractory right heart failure. *Eur Hear Journal, Suppl.* 2019;21:B43–7.
243. Berk JL, Suhr OB, Obici L, Sekijima Y, Zeldenrust SR, Yamashita T, et al. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2013;310(24):2658–67.
244. Lohrmann G, Pipilas A, Mussinelli R, Gopal DM, Berk JL, Connors LH, et al. Stabilization of Cardiac Function With Diflunisal in Transthyretin (ATTR) Cardiac Amyloidosis. *J Card Fail.* 2020 Sep;26(9):753–9.
245. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, Elliott PM, Merlini G, Waddington-Cruz M, et al. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2018;379(11):1007–16.
246. Damy T, Garcia-Pavia P, Hanna M, Judge DP, Merlini G, Gundapaneni B, et al. Efficacy and safety of tafamidis doses in the Tafamidis in Transthyretin Cardiomyopathy Clinical Trial (ATTR-ACT) and long-term extension study. *Eur J Heart Fail.* 2021;23(2):277–85.
247. Lockwood PA, Le VH, O’Gorman MT, Patterson TA, Sultan MB, Tankisheva E, et al. The Bioequivalence of Tafamidis 61-mg Free Acid Capsules and Tafamidis Meglumine 4 × 20-mg Capsules in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2020;9(7):849–54.
248. Hammarström P, Schneider F, Kelly JW. Trans-suppression of misfolding in an amyloid disease. *Science (80-).* 2001;293(5539):2459–62.
249. Hammarström P, Jiang X, Hurshman AR, Powers ET, Kelly JW. Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(SUPPL. 4):16427–32.
250. Penchala SC, Connelly S, Wang Y, Park MS, Zhao L, Baranczak A, et al. AG10 inhibits amyloidogenesis and cellular toxicity of the familial amyloid cardiomyopathy-associated V122I transthyretin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(24):9992–7.
251. Judge DP, Heitner SB, Falk RH, Maurer MS, Shah SJ, Witteles RM, et al. Transthyretin Stabilization by AG10 in Symptomatic Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(3):285–95.
252. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metab.* 2018 Apr 3;27(4):714–39.
253. Crooke ST, Wang S, Vickers TA, Shen W, Liang XH. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2017 Mar 1;35(3):230–7.
254. Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, Polydefkis M, Dyck PJ, Wang AK, et al. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2018;379(1):22–31.
255. Dasgupta NR, Rissing SM, Smith J, Jung J, Benson MD. Inotersen therapy of

- transthyretin amyloid cardiomyopathy. *Amyloid*. 2020 Jan 2;27(1):52–8.
256. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O’Riordan WD, Yang C-C, Ueda M, Kristen A V., et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018 Jul 5;379(1):11–21.
 257. Solomon SD, Adams D, Kristen A, Grogan M, González-Duarte A, Maurer MS, et al. Effects of Patisiran, an RNA Interference Therapeutic, on Cardiac Parameters in Patients with Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis: Analysis of the APOLLO Study. *Circulation*. 2019 Jan 22;139(4):431–43.
 258. Fontana M, Martinez-Naharro A, Chacko L, Rowczenio D, Gilbertson JA, Whelan CJ, et al. Reduction in CMR Derived Extracellular Volume With Patisiran Indicates Cardiac Amyloid Regression. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021 Jan 1;14(1):189–99.
 259. Viney NJ, Guo S, Tai LJ, Baker BF, Aghajan M, Jung SW, et al. Ligand conjugated antisense oligonucleotide for the treatment of transthyretin amyloidosis: preclinical and phase 1 data. *ESC Hear Fail*. 2021;8(1):652–61.
 260. Finn JD, Smith AR, Patel MC, Shaw L, Youniss MR, van Heteren J, et al. A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep*. 2018 Feb 27;22(9):2227–35.
 261. Bodin K, Ellmerich S, Kahan MC, Tennent GA, Loesch A, Gilbertson JA, et al. Antibodies to human serum amyloid P component eliminate visceral amyloid deposits. *Nature*. 2010 Nov 4;468(7320):93–7.
 262. Richards DB, Cookson LM, Berges AC, Barton S V., Lane T, Ritter JM, et al. Therapeutic Clearance of Amyloid by Antibodies to Serum Amyloid P Component. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1106–14.
 263. Saelices L, Nguyen BA, Chung K, Wang Y, Ortega A, Lee JH, et al. A pair of peptides inhibits seeding of the hormone transporter transthyretin into amyloid fibrils. *J Biol Chem*. 2019 Apr 12;294(15):6130–41.
 264. Karlstedt E, Jimenez-Zepeda V, Howlett JG, White JA, Fine NM. Clinical Experience With the Use of Doxycycline and Ursodeoxycholic Acid for the Treatment of Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *J Card Fail*. 2019 Mar 1;25(3):147–53.
 265. Wixner J, Pilebro B, Lundgren HE, Olsson M, Anan I. Effect of doxycycline and ursodeoxycholic acid on transthyretin amyloidosis. *Amyloid*. 2017 Mar 16;24:78–9.
 266. aus dem Siepen F, Bauer R, Aurich M, Buss SJ, Steen H, Altland K, et al. Green tea extract as a treatment for patients with wild-type transthyretin amyloidosis: An observational study. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Dec 4;9:6319–25.
 267. Ferreira N, Saraiva MJ, Almeida MR. Uncovering the neuroprotective mechanisms of curcumin on transthyretin amyloidosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 2;20(6).
 268. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien ML, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2018 Dec 6;132(23):2456–64.
 269. Edwards C V., Bhutani D, Mapara M, Radhakrishnan J, Shames S, Maurer MS, et al. One year follow up analysis of the phase 1a/b study of chimeric fibril-reactive monoclonal antibody 11-1F4 in patients with AL amyloidosis. *Amyloid*. 2019 Mar 29;26(sup1):115–6.
 270. Gertz MA, Cohen AD, Comenzo RL, Du Mond C, Kastritis E, Landau HJ, et al.

- Results of the Phase 3 VITAL Study of NEOD001 (Birtamimab) Plus Standard of Care in Patients with Light Chain (AL) Amyloidosis Suggest Survival Benefit for Mayo Stage IV Patients. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):3166–3166.
271. Palladini G, Paiva B, Wechalekar A, Massa M, Milani P, Lasa M, et al. Minimal residual disease negativity by next-generation flow cytometry is associated with improved organ response in AL amyloidosis. *Blood Cancer J*. 2021 Feb;11(2):34.
 272. Comenzo RL, Kastritis E, Palladini G, Minnema MC, Wechalekar AD, Jaccard A, et al. Reduction in Absolute Involved Free Light Chain and Difference between Involved and Uninvolved Free Light Chain Is Associated with Prolonged Major Organ Deterioration Progression-Free Survival in Patients with Newly Diagnosed AL Amyloidosis Receiving Bortezomib, Cyclophosphamide, and Dexamethasone with or without Daratumumab: Results from Andromeda. *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):48–50.
 273. Muchtar E, Gertz MA, Lacy MQ, Leung N, Buadi FK, Dingli D, et al. Refining amyloid complete hematological response: Quantitative serum free light chains superior to ratio. *Am J Hematol*. 2020 Nov 1;95(11):1280–7.
 274. Kastritis E, Kostopoulos I V., Theodorakakou F, Fotiou D, Gavriatopoulou M, Migkou M, et al. Next generation flow cytometry for MRD detection in patients with AL amyloidosis. *Amyloid*. 2021;28(1):19–23.
 275. Staron A, Burks EJ, Lee JC, Sarosiek S, Sloan JM, Sanchorawala V. Assessment of minimal residual disease using multiparametric flow cytometry in patients with AL amyloidosis. *Blood Adv*. 2020 Mar 10;4(5):880–4.
 276. Palladini G, Milani P, Foli A, Basset M, Russo F, Perlini S, et al. Presentation and outcome with second-line treatment in AL amyloidosis previously sensitive to nontransplant therapies. *Blood*. 2018 Feb 1;131(5):525–32.
 277. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar S, Wechalekar A, Hawkins PN, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Dec;30(36):4541–9.
 278. Venner CP, Lane T, Foard D, Rannigan L, Gibbs SDJ, Pinney JH, et al. Cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone therapy in AL amyloidosis is associated with high clonal response rates and prolonged progression-free survival. *Blood*. 2012 May 10;119(19):4387–90.
 279. Comenzo RL, Gertz MA. Review article Autologous stem cell transplantation for primary systemic amyloidosis. 2002;99(12):4276–82.
 280. Lu X, Ding Z-C, Cao Y, Liu C, Habtetsion T, Yu M, et al. Alkylating Agent Melphalan Augments the Efficacy of Adoptive Immunotherapy Using Tumor-Specific CD4 + T Cells. *J Immunol*. 2015 Feb 15;194(4):2011–21.
 281. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors : from research tools to drug candidates. 2001;8.
 282. Bianchi G, Anderson KC. Contribution of inhibition of protein catabolism in Myeloma. *Cancer J (United States)*. 2019 Jan 1;25(1):11–8.
 283. Bianchi G, Ghobrial IM. Molecular mechanisms of effectiveness of novel therapies in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013 Feb;54(2):229–41.
 284. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH.

- Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4907–16.
285. Bianchi G, Oliva L, Cascio P, Pengo N, Fontana F, Cerruti F, et al. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3040–9.
 286. Oliva L, Orfanelli U, Resnati M, Raimondi A, Orsi A, Milan E, et al. The amyloidogenic light chain is a stressor that sensitizes plasma cells to proteasome inhibitor toxicity. *Blood*. 2017 Apr 13;129(15):2132–42.
 287. Cenci S, Oliva L, Cerruti F, Milan E, Bianchi G, Raule M, et al. Pivotal Advance: Protein synthesis modulates responsiveness of differentiating and malignant plasma cells to proteasome inhibitors. *J Leukoc Biol*. 2012 Nov;92(5):921–31.
 288. Corral LG, Haslett PAJ, Muller GW, Chen R, Wong L, Ocampo CJ, et al. Differential Cytokine Modulation and T Cell Activation by Two Distinct Classes of Thalidomide Analogues That Are Potent Inhibitors of TNF- α . 2021;
 289. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science (80-)*. 2010 Mar 12;327(5971):1345–50.
 290. Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong MV, Ott CJ, Mitsiades CS, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of ikaros proteins. *Science (80-)*. 2014;343(6168):305–9.
 291. Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science (80-)*. 2014;343(6168):301–5.
 292. Palumbo A, Bringhen S, Kumar SK, Lupparelli G, Usmani S, Waage A, et al. Second primary malignancies with lenalidomide therapy for newly diagnosed myeloma : a meta-analysis of individual. 2014;333–42.
 293. Nooka AK, Masszi T, Beksac M, Spicka I, Hungria V, Munder M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. 2021;
 294. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016 Oct 6;375(14):1319–31.
 295. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015 Aug 13;373(7):621–31.
 296. de Weers M, Tai Y-T, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, et al. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *J Immunol*. 2011 Feb 1;186(3):1840–8.
 297. Janmaat ML, Ahmadi T, Sasser AK, Parren PWHL. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. 2016;95–112.
 298. Mateos M, Nahi H, Legiec W, Grosicki S, Vorobyev V, Spicka I, et al. Articles Subcutaneous versus intravenous daratumumab in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (COLUMBA): 2020;7(May).
 299. Minnema MC, Lassen U, Krejcik J, Palumbo A, Donk NWCJ Van De, Brun N, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. 2021;

300. Sanchorawala V, Sarosiek S, Schulman A, Mistark M, Migre ME, Cruz R, et al. Safety, tolerability, and response rates of daratumumab in relapsed AL amyloidosis: Results of a phase 2 study. *Blood*. 2020 Apr 30;135(18):1541–7.
301. Sher T, Fenton B, Akhtar A, Gertz MA. First report of safety and efficacy of daratumumab in 2 cases of advanced immunoglobulin light chain amyloidosis. *Blood*. 2016 Oct 13;128(15):1987–9.
302. Roussel M, Merlini G, Chevret S, Arnulf B, Stoppa AM, Perrot A, et al. A prospective phase 2 trial of daratumumab in patients with previously treated systemic light-chain amyloidosis. *Blood*. 2020 Apr 30;135(18):1531–40.
303. Kastritis E, Palladini G, Minnema MC, Wechalekar AD, Jaccard A, Lee HC, et al. Daratumumab-Based Treatment for Immunoglobulin Light-Chain Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021 Jul 1;385(1):46–58.
304. Renz M, Torres R, Dolan PJ, Tam SJ, Tapia JR, Li L, et al. 2A4 binds soluble and insoluble light chain aggregates from AL amyloidosis patients and promotes clearance of amyloid deposits by phagocytosis[†]. *Amyloid*. 2016 Jul 2;23(3):168–77.
305. Valent J, Silowsky J, Kurman MR, Daniel E, Jobes J, Harnett M, et al. Cael-101 Is Well-Tolerated in AL Amyloidosis Patients Receiving Concomitant Cyclophosphamide-Bortezomib-Dexamethasone (CyborD): A Phase 2 Dose-Finding Study (NCT04304144). *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):26–7.
306. Pasquer H, Belhadj K, Dupuis J, Oghina S, Galat A, Ladaique A, et al. Venetoclax induces profound and sustained responses in patients with relapsed/refractory light-chain amyloidosis. *Br J Haematol*. 2021 May 1;193(3):674–7.
307. Sidiqi MH, Saleh AS Al, Leung N, Jevremovic D, Aljama MA, Gonsalves WI, et al. Venetoclax for the treatment of translocation (11 ; 14) AL amyloidosis. *Blood Cancer J [Internet]*. 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-020-0321-6>
308. Moreau P, Harrison S, Cavo M, De La Rubia J, Popat R, Gasparetto C, et al. Updated Analysis of Bellini, a Phase 3 Study of Venetoclax or Placebo in Combination with Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):1888–1888.
309. Trudel S, Lendvai N, Popat R, Voorhees PM, Reeves B, Libby EN, et al. Targeting B-cell maturation antigen with GSK2857916 antibody-drug conjugate in relapsed or refractory multiple myeloma (BMA117159): a dose escalation and expansion phase 1 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Dec;19(12):1641–53.
310. Godara A, Zhou P, Rosenthal B, Kugelmass A, Toskic D, Fogaren T, et al. B-Cell Maturation Antigen (BCMA) in Systemic Light-Chain Amyloidosis (AL): Association with Disease Activity and Its Modulation with Gamma-Secretase Inhibition. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):4409–4409.
311. Hughes DM, DeMari S, Hassan H, Sanchorawala V, Sloan JM. Safety, Tolerability, and Efficacy of Selinexor in a Patient With Relapsed Light Chain (AL) Amyloidosis. Vol. 21, *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. United States; 2021. p. e460–3.
312. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, et. Al. Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography*.

2015, Vol. 28, pp. 1 - 39.

313. Zoghbi WA, Adams D, Bonow RO, et. Al. Recommendations for Noninvasive Evaluation of Native Valvular Regurgitation A Report from the American Society of Echocardiography Developed in Collaboration with the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2017, Vol. 30, pp. 303 - 371.
314. De Michieli L, Babuin L, et. Al. Using high sensitivity cardiac troponin values in patients with SARS-CoV-2 infection (COVID-19): The Padova experience. *Clinical Biochemistry*. 2021, Vol. 90, pp. 8 - 14.
315. Falk R., Alexander K, Liao R et. Al. AL Cardiac Amyloidosis: A review of diagnosis and Therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Sep 20;68(12):1323-41. doi: 10.1016/j.jacc.2016.06.053.
316. Merlini G., Dispenzieri A et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nature reviews* 2018;4:1-19
317. Damy T, Costes B et al. Prevalence and clinical phenotype of hereditary transthyretin amyloidcardiomyopathy in patients with increased left ventricular wall thickness. *Eur Heart J* 2016; 37:1826-834
318. Lousada I, Comenzo RL, Merlini G. Light chain amyloidosis: patient experience survey from Amyloidosis Research Consortium. *Adv Ther* 2015; 32: 920-28
319. Gonzalez-Lopez E, Gagliardi C, Dominguez F et. al. Clinical characteristics of wild type transthyretin cardiac amyloidosis: disproving myths. *Eur Heart J* 2017; 38 1895-904
320. Kyle RA, Spittel PC et al. The premortem recognition of systemic senile amyloidosis with cardiac involvement. *Am J Med* 1996; 101:395-400
321. Cyrille NB, Goldsmith J, Alvarez J, Maurer MS. Prevalence and Prognostic Significance of Low QRS Voltage Among the Three Main Types of Cardiac Amyloidosis. *The American Journal of Cardiology*. 2014;114(7):1089-1093. doi:10.1016/j.amjcard.2014.07.026
322. Palladini G, Campana C et al. Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis. *Circulation* 2003; 107:2440-445
323. Cappelli F, Baldasseroni et al. Clinical Investigations Echocardiographic and biohumoral Characteristics in Patientd with AL and TTR Amyloidosis at diagnosis. *Clin Cardiol* 2015; 75: 69-75
324. Chacko L, Martone R et al. Echocardiographic phenotype and prognosis in transthyretin cardiac amyloidosis. *Eur Heart J* 2020,41; 1439-447
325. Kristen A V, Maurer MS, Rapezzi C et al. Impact of genotype and phenotype on cardiac biomarkers in patients with transthyretin amyloidosis - Report from the Transthyretin Amyloidosis Outcome Survey (THAOS). *PLoS One* 2017; 12:e0173086
326. Boldrini M, Cappelli F, Chacko L et al. Multiparametric Echocardiography Scores for the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020 Apr;13(4):909-920

