

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

Direttore: Ch.mo Prof. Federico Rea

Anatomia Patologica Cardio-Toraco-Vascolare

Direttore: Ch.ma Prof. Cristina Basso

Clinica cardiologica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova

Direttore: Ch.mo Prof. Sabino Iliceto

TESI DI LAUREA

**Amiloidosi sistemica e danno miocardico:
un'analisi clinico-patologica**

RELATORE: Prof.ssa Cristina Basso

CORRELATORE: Dott.ssa Laura De Michieli

Dott. Alberto Cipriani

Laureanda: Elisa Barbieri

Matricola: 1145088

Anno accademico 2021-2022

Indice

1.	Riassunto.....	1
2.	Introduzione.....	5
2.1	Amiloidosi come entità clinica	5
2.1.1	Definizione e classificazione	5
2.1.2	Epidemiologia	7
2.1.3	Fisiopatologia.....	9
2.1.4	Diagnosi.....	11
2.1.5	Clinica.....	24
2.1.6	Trattamento.....	27
2.2	Biomarcatori cardiaci	33
2.3	La biopsia endomiocardica (BEM).....	38
3.	Scopo dello studio.....	41
4.	Materiali e metodi	42
4.1	Popolazione dello studio	42
4.2	Criteri di inclusione	42
4.3	Raccolta dati clinico-strumentali.....	43
4.4	Raccolta dati di patologia	45
4.4.1	Processazione della BEM	45
4.4.2	Analisi morfometrica della BEM	46
4.4.3	Tipizzazione dell'amiloide mediante immunoelettromicroscopia	48
4.4	Analisi statistica.....	48
5.	Risultati	49
5.1	Caratteristiche della popolazione	49
5.1.1	Caratteristiche generali.....	49
5.1.2	Comorbidità	51
5.1.3	Terapia domiciliare.....	52
5.2	Caratteristiche ecocardiografiche	53
5.3	Caratteristiche di laboratorio.....	54
5.4	Caratteristiche clinico-strumentali in base ai valori di hs-cTnI nei pazienti con ATTR-AC.....	55
5.4.1	Differenze cliniche	56

5.4.2	Differenze nella terapia	56
5.4.3	Differenze all'ecocardiografia	57
5.4.4	Differenze nel laboratorio	58
5.4.5	Follow-up e outcome.....	59
5.5	Caratteristiche clinico-strumentali in base ai valori di hs-cTnI nei pazienti con amiloidosi AL.....	60
5.5.1	Differenze cliniche	61
5.5.2	Differenze nella terapia	61
5.5.3	Differenze all'ecocardiografia	62
5.5.4	Differenze nel laboratorio	63
5.5.5	Follow-up e outcome.....	64
5.6	Valutazione istopatologica.....	66
5.6.1	Analisi delle biopsie endomiocardiche (BEM).....	66
5.6.2	Correlazioni tra dati istologici, ecocardiografici e biumorali	67
6.	Discussione.....	75
6.1	Caratteristiche clinico-strumentali della popolazione di studio.....	75
6.2	Correlazione clinico-strumentale con hs-cTnI	77
6.2.1	Correlazione clinico-strumentale con hs-cTnI nei pazienti affetti da amiloidosi da transtiretina (ATTR)	77
6.2.2	Correlazione clinico-strumentale con hs-cTnI nei pazienti affetti da amiloidosi da catene leggere (AL)	78
6.3	Follow-up e outcome	79
6.4	Biopsie endomiocardiche	80
6.4.1	Valutazione delle biopsie endomiocardiche	80
6.4.2	Correlazioni tra dati delle BEM, dati ecocardiografici e hs-cTnI	81
6.5	Limiti dello studio.....	84
7.	Conclusioni	85
8.	Bibliografia	87

1. Riassunto

Introduzione

L'amiloidosi rappresenta un gruppo di malattie causate dal deposito di aggregati proteici nello spazio extracellulare di diversi tessuti, con compromissione della funzione d'organo. Le due forme che più frequentemente interessano il cuore (amiloidosi cardiaca, AC) sono quella da transtiretina (ATTR, nella forma wild type, ATTRwt, e nella forma ereditaria, ATTRv) e da catene leggere (AL). Generalmente, la forma ATTR ha un decorso meno aggressivo ma, in entrambe le forme, il più importante determinante della prognosi dei pazienti è la severità dell'interessamento cardiaco.

Scopo dello studio

Gli scopi di questo studio sono stati quelli di indagare la correlazione tra dati clinico-strumentali (ecocardiografici) e danno miocardico, valutato con troponina I ad alta sensibilità (hs-cTnI); abbiamo indagato inoltre la correlazione tra dati istologici di biopsie endomiocardiche (BEM), dati strumentali ecocardiografici e i valori di hs-cTnI.

Materiali e metodi

Studio osservazionale-retrospettivo che include i pazienti afferenti all'Ambulatorio Specialistico dell'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova. Abbiamo inoltre individuato i pazienti sottoposti a BEM nel periodo compreso tra il 2012 e il 2022 e i cui campioni fossero disponibili presso l'Unità di Patologia Cardiovascolare per revisione con valutazione di diversi parametri, tra cui la percentuale di amiloide e fibrosi sostitutiva, la presenza di edema, necrosi, infiammazione e infiltrazione perivascolare.

Risultati

Per la parte clinico-strumentale, 114 pazienti sono stati inclusi nello studio (81% maschi, età media alla diagnosi 74 anni, IQR 66,79), di cui 67 (59%) affetti da ATTR-

AC e 47 (41%) affetti da AL-AC. Tra i pazienti con ATTR-AC, coloro che presentavano valori di hs-cTnI > alla mediana (pari a 88 ng/L) erano più anziani, e presentavano una maggiore massa ventricolare sinistra (VS), una maggiore dilatazione atriale sinistra, valori di E/e' più elevati, una maggiore alterazione dello strain longitudinale globale (GLS) e della funzionalità ventricolare destra (VD). Tra i pazienti con AL-AC, coloro con valori di hs-cTnI > alla mediana (pari a 64 ng/L), presentavano maggiori spessori del VS e VD, nonché una maggior alterazione dei parametri di GLS. Per la parte istologica, sono state analizzate 40 BEM, 26 AL-AC e 14 ATTR-AC. La vacuolizzazione era presente nel 60% dei campioni, la fibrosi nel 40%, mentre necrosi, edema ed infiammazione erano rari. La quantità di amiloide media è risultata pari al 25.9% (range 3% – 85%). Il coinvolgimento perivascolare era presente nel 50%, più frequentemente in AL-CA (16, 62% vs 4, 29%, p=0.047). Sono emerse correlazioni significative tra un maggior diametro dei cardiomiociti e peggiori parametri morfo-funzionali bi-ventricolari e valori di hs-cTnI più elevati. Inoltre, anche una maggiore percentuale di amiloide correlava con peggiori parametri morfo-funzionali ecocardiografici (in particolare con una maggiore massa VS in AL-AC, R 0.633, p=0.006) e con valori più elevati di hs-cTnI (R 0.537, p=0.026). In AL-CA, l'interessamento perivascolare si associava ad un più alterato GLS, una ridotta frazione di eiezione e a valori di hs-cTnI più elevati.

Conclusioni

Il presente studio ha mostrato peculiari correlazioni tra danno miocardico e parametri ecocardiografici, coinvolgenti anche parametri di tipo emodinamico in ATTR-CA e ispessimento bi-ventricolare in AL-CA. Dal punto di vista istologico, il diametro dei cardiomiociti, la percentuale di infiltrazione amiloide e l'interessamento perivascolare in AL-CA, hanno dimostrato una correlazione importante con le alterazioni morfo-funzionali ecocardiografiche e con il danno miocardico.

Introduction

Amyloidosis represents a group of conditions characterized by the abnormal deposition of protein aggregates in the extracellular matrix of several tissues, possibly leading to organ failure. The two forms that most frequently affect the heart (cardiac amyloidosis, CA) are: (i) transthyretin CA (ATTR, either wild-type, ATTRwt, or hereditary, ATTRv), and (ii) light-chain CA (AL). Although ATTR-CA has usually a less aggressive clinical course, the extent of cardiac involvement is the most important prognostic factor in both conditions.

Scope of the study

This study aimed at analysing the correlation between clinical and laboratory data and myocardial injury, evaluated by high-sensitivity cardiac troponin I (hs-cTnI). Furthermore, the study investigated the correlation between histological endomyocardial biopsies (EMB) data, echocardiographic data and hs-cTnI levels.

Materials and methods

Retrospective-observational study of patients evaluated in the Cardiac Amyloidosis Outpatient Clinic of the University Hospital of Padova. Furthermore, patients who underwent EMB from 2012 to 2022 and whose specimens were present at the Cardiovascular Pathology Institute were included in the study. These specimens were evaluated for several parameters, such as the percentage of amyloid and replacement fibrosis, oedema, inflammation, necrosis and perivascular infiltration.

Results

114 patients were included in the clinical analysis (81% male, mean age at diagnosis of 74 years, IQR 66.79). Of these patients, 67 (59%) had ATTR-CA while 47 (41%) AL-CA. ATTR-CA patients with hs-cTnI levels greater than their group median value (88 ng/L) were also older and with greater left ventricular (LV) mass index, a more pronounced left atrial dilatation, elevated E/e' levels, and a greater alteration of both the global longitudinal strain (GLS) and of the right ventricular

(RV) functionality. On the other hand, AL-CA patients with hs-cTnI levels greater than their group median value (64 ng/L) presented thickened LV and RV walls and a greater alteration of GLS parameters. Regarding the histological analysis, 40 EMB were analysed, 26 AL-CA and 14 ATTR-CA. 60% of samples showed vacuolization and 40% demonstrated a variable degree of fibrosis, while necrosis, oedema and inflammation were rare. Mean amyloid amount resulted to be 25.9% (ranging from 3% to 85%). Perivascular involvement was present in 50% of cases, although more frequently in AL-CA (16.62% vs 4.29%, $p=0.047$). Significant correlations were found between a greater myocytes' diameter and more pronounced morpho-functional alterations at echocardiography and higher hs-cTnI values. Moreover, a greater percentage of amyloid infiltration correlated as well with worse echocardiographic parameters (particularly with a greater LV mass in AL-CA, $R\ 0.633$, $p=0.006$) and with greater hs-cTnI values ($R\ 0.537$, $p=0.026$). In AL-CA cases, perivascular involvement was associated to altered GLS, reduced LV ejection fraction and increased hs-cTnI values.

Conclusions

This study demonstrated peculiar correlations between myocardial injury and echocardiography parameters, involving morphologic and hemodynamic alterations in ATTR-CA and biventricular thickening and worse GLS in AL-CA. Regarding EMB analysis, cardiac myocytes' diameter, the percentage of amyloid infiltration and perivascular involvement in AL-CA, demonstrated important correlations with morpho-functional echocardiographic alterations and with myocardial injury evaluated with hs-cTnI.

2. Introduzione

2.1 Amiloidosi come entità clinica

2.1.1 Definizione e classificazione

L'amiloidosi rappresenta un gruppo di malattie caratterizzate dalla presenza di una proteina che si trova ad essere presente nell'organismo in quantità abnorme rispetto ai livelli fisiologici e che tende ad assumere una conformazione anomala a *beta-sheet*. Queste proprietà conferiscono alla proteina la capacità di formare aggregati insolubili e resistenti alla degradazione che precipitano, accumulandosi nello spazio extracellulare di tessuti e organi, determinandone un'alterazione strutturale che esita progressivamente in perdita di funzione.¹ Sono state finora individuate (2020) 36 diverse proteine con proprietà amiloidogeniche, tutte insolubili e resistenti alla degradazione.¹

Pur non perdendo di vista il fatto che l'amiloidosi è un quadro sistemico, è comune nella pratica medica definirla anche a seconda di quali siano gli organi maggiormente coinvolti. L'amiloidosi cardiaca sarà interesse di questo lavoro di tesi e verrà affrontata nel confronto tra le due forme di maggior rilievo clinico, le quali hanno origine dall'accumulo di due diverse proteine: la transtiretina e le catene leggere delle immunoglobuline. La nomenclatura prevede di definire le diverse forme attraverso la lettera A, che sta appunto per amiloidosi, seguita dalla lettera o sigla rappresentante la proteina che si accumula causando la malattia: da qui quindi ecco la forma ATTR, ovvero l'amiloidosi correlata alla transtiretina (TTR) e la forma AL, dove L rappresenta le *light chains* delle immunoglobuline: nell'insieme, queste due forme costituiscono il 95% del totale dei casi a coinvolgimento cardiaco.^{2,3} È importante distinguere l'una dall'altra in quanto hanno decorso clinico e trattamento completamente diversi.⁴

La transtiretina (conosciuta anche come pre-albumina poiché nel tracciato elettroforetico migra più dell'albumina in posizione anodica) è una proteina tetramerica fisiologicamente prodotta per la maggior parte dal fegato; una piccola

quota di essa è prodotta anche dal plesso corioideo, dal pancreas e dalla retina. È deputata al trasporto della tiroxina e del retinolo (vitamina A), quest'ultimo attraverso il legame con la RBP (*retinol-binding protein*).³ La transtiretina sviluppa proprietà amiloidogeniche nel momento in cui si dissocia in monomeri.¹

Esistono due forme di ATTR: quella wild-type, tipica dell'anziano e quella dovuta a mutazioni della transtiretina, che colpisce pazienti molto più giovani. Nella prima, conosciuta anche come amiloidosi senile⁴, la transtiretina è presente nella sua forma fisiologica e sembra che acquisisca instabilità e predisposizione all'aggregazione a causa di qualche processo collegato all'invecchiamento, anche se sono necessari ulteriori studi per individuare quali siano questi meccanismi. La seconda forma invece è caratterizzata da mutazioni genetiche ad apparente distribuzione geografica (la più frequente è Val122Ile, presente nel 3.4% degli afroamericani).³ Al giorno d'oggi sono state individuate più di 120 mutazioni patogenetiche, a trasmissione autosomica dominante e penetranza variabile, di cui almeno il 50% hanno coinvolgimento cardiaco.⁵

L'amiloidosi AL è invece una condizione di carattere ematologico, determinata dalla presenza di un anomalo clone di plasmacellule che produce una quantità eccessiva di catene leggere delle immunoglobuline, con una maggiore prevalenza della forma a catene lambda rispetto a quella a catene kappa.⁴ Nonostante in alcuni pazienti l'amiloidosi AL coesista con il mieloma multiplo, non va dimenticato che si tratta di due entità diverse. Quest'ultimo infatti è un vero e proprio tumore delle plasmacellule, in cui esse proliferano al punto da diventare l'elemento cellulare preponderante all'interno del midollo osseo fino a comportare lesioni ossee, anemia, ipercalcemia e disfunzioni renali; al contrario, nel midollo osseo dei pazienti amiloidotici, le plasmacellule rappresentano meno del 20% del totale. Si stima che il 5-10% dei pazienti con amiloidosi AL riporti anche il mieloma multiplo, e che la stessa percentuale di pazienti con mieloma multiplo abbia anche l'amiloidosi AL.⁴ Un'entità clinica ancora diversa è invece la gammapatia monoclonale, spesso individuata come una condizione precedente lo sviluppo del mieloma multiplo e caratterizzata dai tre seguenti punti: presenza di una paraproteina monoclonale (proteina M) nel siero in quantità inferiore ai 30 g/L,

proliferazione delle plasmacellule nel midollo osseo senza occupare più del 10% delle cellule presenti nello stesso e assenza delle caratteristiche di danno d'organo normalmente associate al mieloma multiplo.⁶

2.1.2 Epidemiologia

Da sempre considerata come una malattia rara, l'amiloidosi è stata per molto tempo un'entità poco conosciuta e diagnosticata. Fu scoperta circa 150 anni fa dal patologo tedesco Rudolf Virchow come malattia da *misfolding* proteico.⁵ Solo in tempi più recenti ci si sta rendendo conto di quanto sia frequente ed è ormai noto che è molto più comune di quanto si pensasse fino a pochi anni fa.⁴

Nel 2019, Gilstrap et al.⁷ analizzavano l'epidemiologia dell'amiloidosi cardiaca negli Stati Uniti e ciò che era emerso era una tendenza all'aumento sia dell'incidenza sia della prevalenza della malattia nel periodo tra il 2000 e il 2012, soprattutto in una sottopopolazione di maschi, neri e di età superiore ai 75 anni. Ciò potrebbe essere spiegato con una maggiore consapevolezza da parte del personale medico, così come dalla maggiore disponibilità di utilizzo della risonanza magnetica cardiaca per poter fare diagnosi. Alla luce di questa tendenza veniva sottolineata l'importanza di considerare l'amiloidosi in quei pazienti con età > 65 anni che venissero ricoverati per scompenso cardiaco.

Un recente studio danese del 2021⁸ osserva l'epidemiologia della cardiopatia amiloidotica in Danimarca nel periodo tra il 1998 e il 2017 e conclude che la quest'ultima stia venendo diagnosticata sempre più frequentemente (negli ultimi 20 anni il numero delle diagnosi era addirittura raddoppiato), che il ritardo diagnostico dall'insorgenza di sintomatologia cardiaca è di circa un anno e che la mortalità nel periodo in cui era stato eseguito lo studio era significativamente diminuita. Inoltre, la forma più responsabile dell'incremento del numero delle diagnosi era la amiloidosi da transtiretina wild-type. Questo studio sottolineava che il trend era stato individuato prima dell'approvazione nazionale dei farmaci

definiti disease-modifying drugs, motivo per cui in futuro ci si aspetta che questi dati vengano ulteriormente confermati.

Tra le amiloidosi sistemiche, sembra che la AL sia la più comune, riportando un'incidenza di 10 pazienti su 1 milione all'anno.⁵ L'amiloidosi ATTRwt invece con il passare del tempo si sta riconoscendo sempre più frequentemente come causa di scompenso cardiaco, anche se al giorno d'oggi la sua incidenza rimane ancora sottostimata.¹ Da studi autoptici infatti, emerge che in individui sopra gli 80 anni sono stati riscontrati depositi di amiloide nel cuore in una percentuale di pazienti che varia tra il 22 e il 36%. Il profilo tipico del paziente con ATTRwt è quello di un uomo anziano con inspiegato aumento degli spessori delle pareti ventricolari notate all'ecocardiografia e con scompenso cardiaco biventricolare, spesso accompagnato da alterazioni del ritmo come fibrillazione o flutter atriale.⁵ Si è visto inoltre che nelle donne, rispetto agli uomini, la ATTRwt potrebbe essere molto più diffusa di quanto non venga clinicamente diagnosticata.¹ La reale prevalenza della ATTRwt rimane ad oggi sconosciuta, anche se si stima che circa un quarto dei pazienti deceduti sopra gli 80 anni abbia tracce nel cuore della presenza di fibrille di transtiretina, a prescindere dalla presenza o assenza di sintomi durante la vita.⁹ Attraverso studi basati su un approccio non bioptico, si è arrivati ad individuare presenza di amiloidosi ATTRwt nel 13% dei pazienti anziani con scompenso cardiaco a preservata frazione di eiezione, nel 16% dei pazienti sottoposti a TAVI (sostituzione della valvola aortica trans-catetere) per severa stenosi aortica e nel 5% dei pazienti con presunta cardiomiopatia ipertrofica.¹⁰

Per quanto riguarda invece la forma ATTRv, studiare quale sia la reale prevalenza sembra essere ancora più complesso. Per approfondire le relazioni genotipo-fenotipo tra le varie mutazioni esistenti, è stato creato un registro denominato THAOS¹¹ (the Transthyretin Amyloidosis Outcome Survey), attivo dal 2011, di cui fanno parte 30 centri distribuiti in 19 paesi del mondo.

Per migliorare la capacità diagnostica dell'amiloidosi cardiaca, uno studio del gruppo di Aimo¹², offre una prospettiva interessante: ovvero quella di ricercare l'amiloidosi focalizzando su quei contesti clinici che permettono di individuare delle red flag indicative della malattia stessa. Tra questi, si includevano scintigrafia

ossea per ragioni non cardiache, scompenso cardiaco a preservata frazione di eiezione, scompenso cardiaco con frazione di eiezione ridotta o lievemente ridotta, disturbi della conduzione che richiedessero l'impianto di un pacemaker, intervento chirurgico per tunnel carpale, cardiomiopatia a fenotipo ipertrofico, stenosi aortica severa. Ricercare l'amiloidosi in questi contesti specifici permetteva infatti di diagnosticare un numero più alto di casi.

2.1.3 Fisiopatologia

Il meccanismo alla base del processo amiloidotico consiste nella capacità della proteina originaria di acquisire diverse conformazioni, che ne facilitano l'aggregazione. Nel momento in cui la proteina perde o non acquisisce il proprio *folding* fisiologico, ha inizio la formazione di amiloide. Vari fattori possono concorrere ad avviare questo processo, tra i quali si sono identificati un'anomala proteolisi, mutazioni puntiformi e modifiche post-traduzionali e presenza di un basso pH. A ciò fa seguito l'aggregazione tra molecole proteiche simili, le quali sono libere di circolare nel sangue, per poi depositarsi sotto forma di fibrille nello spazio interstiziale degli organi target. La struttura secondaria che assumono è quella di un cross-beta-sheet.¹³ Una volta depositatosi, questo materiale, non solo va determinare un danno meccanico dell'architettura tissutale, ma compromette il parenchima anche a causa della tossicità intrinseca¹⁴ delle proteine che lo compongono (in modo particolare questo è valido per le catene leggere delle immunoglobuline), oltre a provocare infiammazione, formazione di radicali liberi dell'ossigeno, apoptosi, autofagia e rimodellamento della matrice extracellulare.^{13,15}

Studiando la struttura di questo materiale, si è notato che oltre ai precursori proteici originari, sono presenti anche altre componenti: per esempio la SAP (*serum amyloid P-component*), una glicoproteina che rafforza l'amiloide conferendo rigidità alla sua struttura e protezione dalla proteolisi; abbondanti sono anche proteoglicani e glicosaminoglicani, i quali, anche se il loro ruolo non è

del tutto chiaro, sembrano avere il compito di rappresentare lo scaffold iniziale su cui poi avrà inizio la deposizione delle fibrille amiloidi.¹³

Nell'ATTRwt, il processo ha origine dall'instabilità della transtiretina, la quale esiste fisiologicamente sotto forma di tetramero; a causa di non ancora del tutto chiari processi collegati all'età, tra cui anche un diverso stato ossidativo, essa diventa instabile e inizia a dissociarsi in monomeri e da qui prende inizio la formazione e l'aggregazione delle fibrille amiloidi. Non è chiaro, inoltre, se possa esserci una qualche componente collegata al sesso, visto che le donne rappresentano una frazione molto piccola dei pazienti con ATTRwt.¹⁵ Nei pazienti affetti da ATTRv, invece, è proprio la presenza di mutazioni a favorire l'instabilità della transtiretina.¹⁵

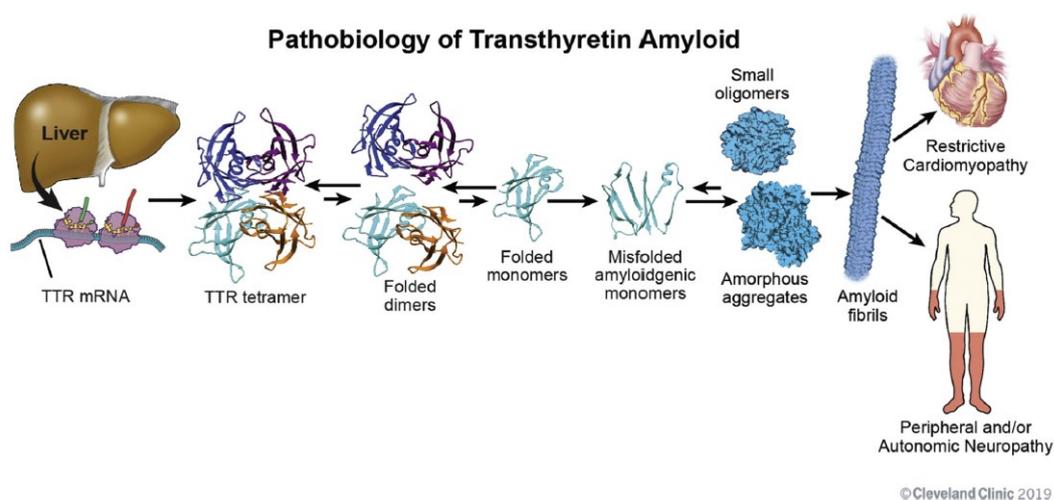


Fig. 1 – Nell'immagine³ è possibile osservare qual è il processo con cui vengono a formarsi le fibrille amiloidi a partire dai tetrameri di transtiretina, che si separano in dimeri e poi in monomeri, poi perdono la propria conformazione fino a trasformarsi in aggregati amorfi di amiloide e fibrille capaci di depositarsi negli organi target.

La forma AL invece è caratterizzata dalla presenza di fibrille formate da catene leggere che derivano da un clone plasmacellulare. In uno studio di Kazman¹⁶ è stato riscontrato che per arrivare alla formazione delle fibrille è necessario un processo in vari passaggi: partendo da dimeri costituiti dai domini variabili delle catene leggere, si arriva a oligomeri che cambiando conformazione da beta-sheet anti-parallelo a parallelo, diventano i precursori delle fibrille. Queste fibrille hanno

affinità per le cellule cardiache e inoltre sono dotate di un'intrinseca tossicità: vengono infatti internalizzate dai cardiomiociti e dai fibroblasti, dove avviano processi ossidativi, alterazioni mitocondriali e attivazione dell'apoptosi, mentre all'esterno delle cellule sono in grado di attivare proteolisi nella matrice extracellulare.¹⁵

2.1.4 Diagnosi

Fino a non molti anni fa, l'amiloidosi era un reperto che molte volte veniva rilevato dalle autopsie di pazienti deceduti per cause cardiache non meglio specificate.^{4,17} In particolare, fino agli anni '80, tutti i casi di amiloidosi senile erano registrati *post-mortem*.¹⁸ Ci sono molti fattori che hanno ostacolato la diagnosi dell'amiloidosi, alcune legate alla malattia stessa altre invece legate alla pratica clinica: le più rilevanti sono la convinzione che fosse una malattia rara, che non ci fossero cure e la scarsa conoscenza dell'argomento, che inevitabilmente ostacolava il sorgere del sospetto nel clinico.¹ Oggi più che mai, invece, dato il miglioramento delle tecniche diagnostiche, nonché l'esistenza di nuove possibilità in ambito terapeutico, si sottolinea come il sospetto sia elemento essenziale alla diagnosi precoce, chiave del successo del percorso terapeutico.¹⁹ Una diagnosi tardiva, infatti, comporta inevitabilmente un esito infausto, poiché il progressivo deposito di amiloide negli anni compromette inevitabilmente il funzionamento degli organi colpiti e la risposta del paziente alla terapia.¹ A causa della sintomatologia inizialmente aspecifica, tutt'oggi fino al 20% dei pazienti con AL riceve la diagnosi oltre 2 anni dopo la comparsa dei sintomi, mentre ancora peggiore è lo scenario per i pazienti con ATTR, che prima di avere il riscontro diagnostico possono dover attendere dai 3 ai 5 anni. Questo inevitabilmente si ripercuote sull'evidenza che purtroppo molti pazienti si presentano in uno stadio già clinicamente avanzato, in cui la mortalità è più alta (questo è ancor più vero per chi ha la forma AL).²⁰

Oltre alla necessità del sospetto dato dalla sintomatologia clinica, la quale verrà approfondita nel capitolo dedicato, per arrivare alla diagnosi è necessario ricorrere a diverse metodiche.

a) L'Elettrocardiogramma

Sebbene non ci siano elementi specifici per determinare la presenza di amiloidosi, una caratteristica comune ai pazienti affetti è quella di avere bassi voltaggi periferici all'ECG a 12 derivazioni²¹, ovvero ≤ 0.5 mV (5 mm) in tutte le derivazioni degli arti e/o ≤ 0.1 mV in tutte le precordiali.¹⁷

In uno studio²² è stato rilevato che nel 52.2% dei pazienti con amiloidosi AL con coinvolgimento cardiaco erano presenti segni di pseudo-infarto, definiti dalla presenza di onde Q patologiche in due o più derivazioni contigue, nonostante l'assenza di storia di malattia ischemica. Inoltre, "in tutti i pazienti venivano rilevati bassi voltaggi alle derivazioni periferiche (degli arti), le quali si associavano ad altri reperti come frequenza cardiaca elevata, intervallo PQ allungato, intervallo QT ristretto, nonostante il QTc fosse comparabile tra pazienti con e senza i bassi voltaggi. Si osservava inoltre come i reperti elettrocardiografici si associassero a determinate caratteristiche all'ecocardiografia (come aumento dello spessore del setto, aumentati diametri telediastolici del VS, funzione sistolica longitudinale severamente compromessa e disfunzione diastolica più marcata), ma anche ad aumentate concentrazioni sieriche di BNP e NT-proBNP, mentre quelle della troponina I rimanessero confrontabili in pazienti con o senza i bassi voltaggi.²¹

Dallo studio di Rapezzi et al.²³ emerge che la presenza dei bassi voltaggi è più frequente nei pazienti con AL rispetto a quelli con TTR, ma va sottolineato il fatto che nei pazienti con ATTRv il coinvolgimento cardiaco è meno frequente. Nello specifico, i pazienti con AL li presentavano con una frequenza del 60%, rispetto al 20% di quelli con ATTRv. Confrontando invece i pazienti con ATTRwt e quelli con ATTRv, sono questi ultimi a risentire maggiormente di amiloidosi cardiaca e quindi a riportare i bassi voltaggi.

Questi ultimi, infine, sembrano avere lo stesso significato prognostico a prescindere dal tipo di amiloidosi e in tutte le forme sono fattori prognostici negativi.²¹

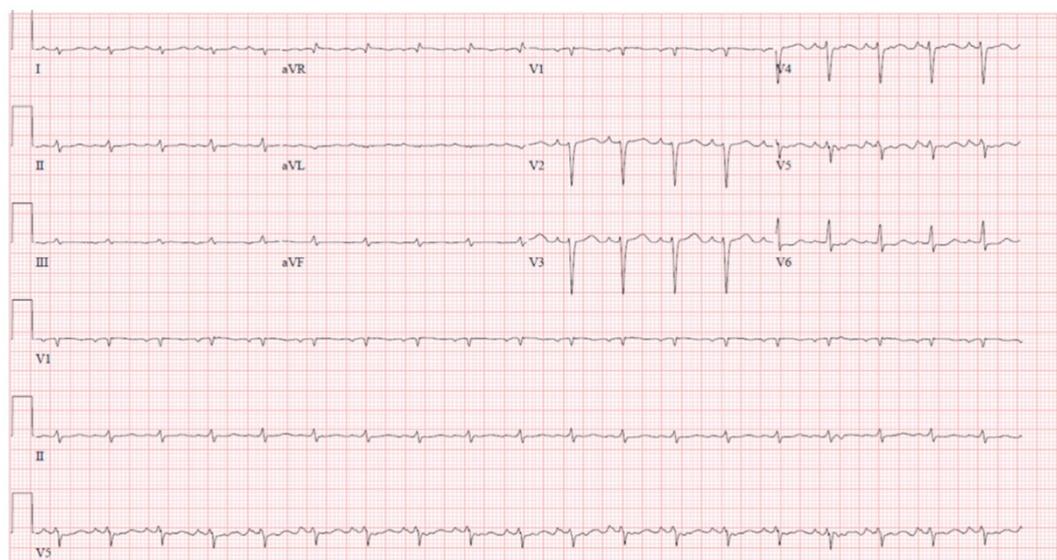


Fig. 2 – Nell'immagine⁴ si può osservare un tracciato tipico di paziente con amiloidosi AL, in cui l'ecocardiogramma aveva mostrato un ventricolo sinistro ispessito, senza versamento pericardico. Il mismatch tra voltaggi e massa ventricolare è altamente suggestivo di amiloidosi.

b) L'ecocardiografia

L'ecografia cardiaca è senz'altro una metodica dai molteplici vantaggi: oltre ad essere ampiamente disponibile e non invasiva per il paziente, ad avere un basso costo e a permettere di valutare il cuore nella sua totalità, è uno strumento estremamente utile per andare a definire una serie di parametri che contribuiscono in maniera sostanziale non solo alla diagnosi, ma anche al follow-up del paziente con amiloidosi.²⁴

Va premesso che la sensibilità di questa tecnica aumenta con il progredire della storia naturale della malattia; è comunque possibile trarre molte informazioni utili anche negli stadi più precoci, con la limitazione però che in questa fase è incapace di distinguere tra una condizione a carattere infiltrante e una cardiomiopatia di tipo ipertrofico o ipertensivo.²⁴ A questo proposito, confrontando il ratio voltaggi/massa, in uno studio di Carroll et al.²⁵ emergeva una correlazione inversa

tra i voltaggi e l'area della sezione trasversale del muscolo ($r = - 0.79$); questo elemento si rende quindi utile nel distinguere i pazienti con amiloidosi da quelli con reale ipertrofia dovuta a stenosi aortica o a ipertensione.

L'accumulo di amiloide si riflette nelle immagini ecografiche manifestando aumento anche importante degli spessori delle pareti cardiache, in particolare nel ventricolo sinistro, che risulta ingrandito nelle dimensioni del setto interventricolare e della parete posteriore, nonché nella massa. Questo avviene in modo più marcato nelle forme ATTRwt, in quanto il deposito fibrillare ha modo di realizzarsi durante un periodo di tempo più lungo.²⁴ Si presenteranno inoltre ispessimento dei lembi valvolari, delle pareti del ventricolo destro e del setto interatriale²⁶, effetto di *granular sparkling* nella parete miocardica⁹ (spesso presente, ma non abbastanza specifico¹⁹), oltre a riduzione del volume della camera ventricolare sinistra e dilatazione atriale a causa delle aumentate pressioni di riempimento.¹⁹ Spesso sarà visibile anche del versamento pericardico.²⁷

Caratteristica è anche la dilatazione atriale, molto spesso bilaterale, dovuta alla severità e alla cronicità dell'aumento delle pressioni dovuto alla disfunzione diastolica.²⁷ La dilatazione atriale è rappresentata da un'onda A ridotta (valutata al pattern transmitralico) e si associa ad aumentato rischio tromboembolico²⁴, soprattutto nei pazienti con amiloidosi AL e soprattutto nelle forme più avanzate.²⁷

Il cuore che va incontro al processo amiloidogenico presenterà una notevole depressione della funzione, soprattutto quella diastolica²⁶: la presenza del deposito di materiale extracellulare, infatti, si rifletterà sulla riduzione della capacità di distensione delle pareti cardiache, impedendo un adeguato riempimento delle camere soprattutto ventricolari. Si va incontro quindi ad uno scompenso cardiaco inizialmente con frazione di eiezione preservata (HFpEF): questo perché si assiste al calo sia dello stroke volume sia del volume telediastolico; questi poi si rifletteranno a loro volta sulla diminuzione del *cardiac output* e della pressione sanguigna.²⁸

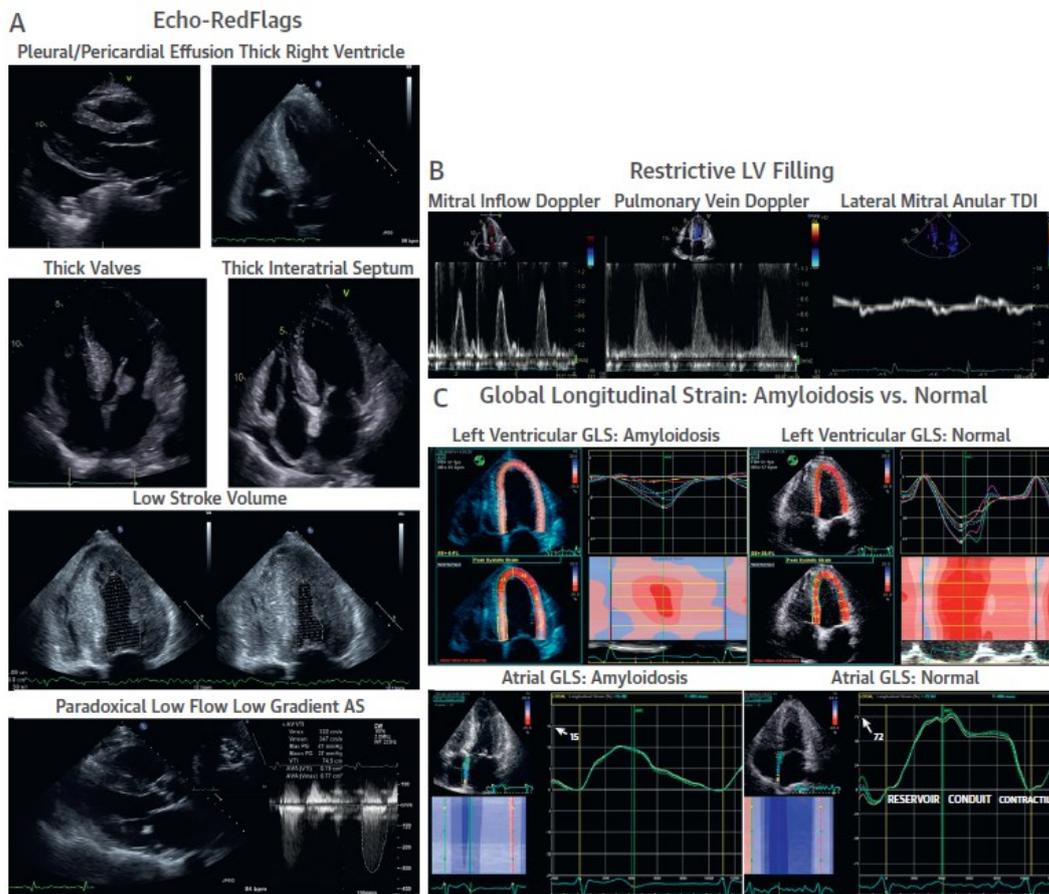
Un altro elemento caratteristico visibile attraverso l'ecografia, grazie all'utilizzo di un dedicato software²⁶, è la riduzione dello *strain* longitudinale globale, con

risparmio dell'apice del ventricolo sinistro (*apical sparing*): si tratta di un pattern di differenze regionali nella deformazione che subisce il miocardio del VS durante la sistole, che evidenzia come la deformazione longitudinale del ventricolo dei pazienti con amiloidosi sia molto più compromessa ai segmenti basale e intermedio rispetto a quello apicale.²⁹ Questo si manifesta con una diminuzione del valore assoluto dello strain, a volte anche in presenza di una frazione di eiezione mantenuta. È una misurazione dotata di elevate sensibilità (93%) e specificità (82%) nella distinzione della cardiopatia amiloidotica dall'ipertrofia del VS²⁴. Il meccanismo sottostante a questo fenomeno non è ancora conosciuto, ma sono state avanzate due ipotesi: da un lato si suppone che la deposizione dell'amiloide sia minore all'apice del ventricolo rispetto alle basi, motivo per cui si avrebbe minor resistenza alla deformazione contrattile; dall'altro lato, probabilmente la diversa disposizione dei cardiomiociti e la diversa orientazione architettonica del miocardio apicale potrebbero renderlo meno soggetto a limitazioni di movimento durante la sistole³⁰.

Pur non essendo un reperto patognomnico di amiloidosi, tra i vari parametri valutati con l'ecografia, l'*apical sparing* risulta essere altamente specifico per la cardiomiopatia amiloidotica, con un importante significato sia diagnostico che prognostico.^{24,29}

Il cuore di un paziente con amiloidosi soffre una disfunzione diastolica: all'inizio della malattia si rileveranno diminuita velocità E ed aumentata velocità A, diminuito rapporto E/A e normale tempo di decelerazione, mentre con il progredire della storia naturale della malattia, si assisterà a normale velocità E, diminuita velocità A, aumentato rapporto E/A, rapido *deceleration time* della mitrale (ad indicare il pattern restrittivo del riempimento del ventricolo sinistro, che ha pressioni elevate e una compliance ridotta). Il TAPSE è generalmente ridotto ed è indicativo di una funzione sistolica destra compromessa. Nelle immagini di doppler, le velocità anulari della tricuspide e della mitrale sono ridotti, con un aumentato E/e' che indica aumento delle pressioni di riempimento.²⁴ Il ridursi della frazione di eiezione e pattern restrittivi al doppler sono indicativi di una peggior prognosi.²⁶

Come dimostrato da Rapezzi et al.,²³ la disfunzione diastolica può verificarsi anche in assenza di anomalie strutturali, soprattutto nei pazienti con amiloidosi AL, nei quali l'incremento degli spessori di parete è meno accentuato.



In the context of a thick left ventricle (LV), the following features should be considered red flags for cardiac amyloidosis (CA): **(A)** pericardial and/or pleural effusions, thick right ventricle, thick valves, thick interatrial septum, small LV cavity size with low stroke volume, and paradoxical low flow, low gradient aortic stenosis. **(B)** Advanced CA results in restrictive LV filling patterns with rapid E-wave deceleration time, a predominant S wave on pulmonary venous Doppler, and low myocardial relaxation velocities on tissue Doppler imaging (TDI) at the mitral annulus. Finally, amyloid infiltration impairs **(C)** global longitudinal strain (GLS) characteristically with apical sparing of the LV apex, in contrast to a normal pattern, and severely reduced contractile function of the atrial myocardium, in contrast to a normal pattern. AS = aortic stenosis.

Fig. 3 – Nell'immagine²⁴ si possono vedere reperti ecocardiografici tipici: ispessimento delle pareti e dei lembi valvolari, diminuito stroke volume, versamento pericardico. In basso a destra si fa un confronto tra lo *strain* longitudinale globale tipico della cardiomiopatia amiloidotica rispetto a quello di un cuore sano.

c) c. La risonanza magnetica cardiaca

Negli ultimi anni è emersa sempre di più tra le tecniche diagnostiche grazie alla grande quantità di informazioni che permette di ricavare non solo in merito alla struttura e alla funzionalità cardiaca, ma anche riguardo la composizione

tissutale¹⁹. Questo è possibile attraverso l'utilizzo di diverse sequenze d'immagine, che vanno dalla T1 e T2 pesate, al T1-mapping pre- e/o post- contrasto, fino al LGE (*late gadolinium enhancement*) ed ECV (*extracellular volume*)²⁴.

Non può essere applicata nei pazienti con insufficienza renale, elemento che molto frequentemente si accompagna all'amiloidosi, in quanto il gadolinio presente all'interno del mezzo di contrasto può compromettere seriamente la funzionalità dei reni¹⁹; può risultare inconcludente nei pazienti con fibrillazione atriale e in quelli dispnoici a causa dei molteplici momenti in cui viene chiesto di trattenere il fiato²⁴.

Il funzionamento del mezzo di contrasto contenente gadolinio si basa sulla sua capacità di permanere all'esterno dei cardiomiociti: nell'amiloidosi, la presenza di accumuli di sostanza proteica determina un'abbondante concentrazione di gadolinio nello spazio extracellulare, da qui il segnale del LGE¹⁹.

Con il LGE è necessario ricercare il "*null point*", ovvero quella condizione che permette all'operatore di vedere il miocardio completamente nero. Questo permette poi il confronto tra l'immagine di miocardio sano e quella con miocardio con presenza di amiloidosi. La difficoltà nel trovare questa condizione è altamente suggestiva della presenza di amiloide, con una sensibilità del 100%. I livelli di gravità clinica e alla CMR sono tre, in ordine di compromissione crescente: assenza di LGE, LGE subendocardico ed LGE transmurale¹⁹. Emerge quindi che il LGE è un predittore di mortalità in tutti i tre tipi principali di amiloidosi²⁴. Un limite è rappresentato dal fatto che sia poco preciso dal punto di vista quantitativo, per cui non è del tutto attendibile nel monitoraggio a lungo termine²⁴.

Il T1 mapping è una nuova tecnica quantitativa che sopperisce alla difficoltà di quantificare l'amiloide attraverso il LGE. Funziona attraverso la misurazione del segnale T1 in ogni pixel o voxel dell'immagine, riconoscendo variazioni della struttura miocardica andando a valutare sia i cardiomiociti sia lo spazio extracellulare. Il segnale ottenuto si definisce T1 native ed è maggiore quando si ha presenza di amiloide o di fibrosi; esso, inoltre, si associa a disfunzione sia sistolica sia diastolica²⁴. Il suo aumento è correlato sicuramente alla presenza di

amiloide, ma è anche influenzato da altri meccanismi patologici, come la presenza di edema¹⁹.

Il vantaggio è che si può utilizzare anche nei pazienti che non tollererebbero il mezzo di contrasto con gadolinio, mentre lo svantaggio è la mancanza di riproducibilità tra macchinari o campi magnetici diversi²⁴.

L'ECV è un marcatore di diagnosi precoce e, insieme al T1 native, costituisce un importante marcatore prognostico, sia nei pazienti con ATTR sia in quelli con AL. In questi ultimi può anche essere utilizzato per valutare la risposta dopo la chemioterapia¹⁹.

Il T2 mapping invece è più adatto nella rilevazione della presenza di edema nel miocardio¹⁹.

Nonostante il T1 native e il T2 abbiano valori più elevati nei pazienti con cardiopatia da AL e l'ECV sia più alto in quelli con TTR, nessuna di queste tecniche ad ora si è rivelata sufficiente per poter distinguere tra le due forme¹⁹.

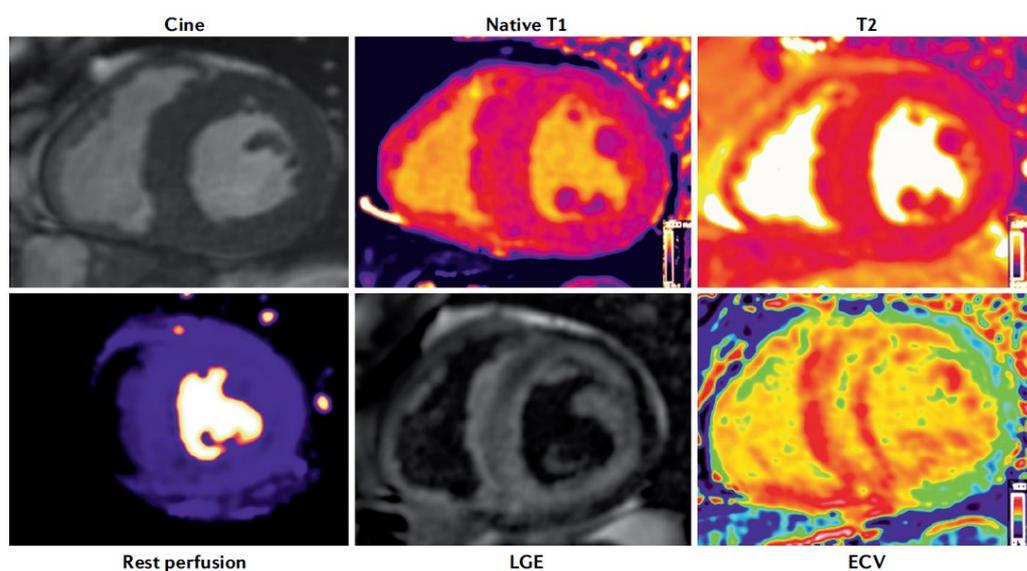


Fig. 4 – Nell'immagine¹⁹ di CMR si può osservare l'aumento di T1 native, di T2, di LGE ed ECV, tutti associati alla presenza di deposito amiloidotico.

d) La scintigrafia con tracciante osseo

La scintigrafia basata sul tecnezio 99 è una tecnica non invasiva utile alla diagnosi dell'amiloidosi, nello specifico della forma ATTR. Inizialmente chiamata scintigrafia ossea in quanto il tracciante usato era specifico per le ossa, ora si definisce anche scintigrafia cardiaca. Non si conosce bene quale sia il meccanismo d'azione del tracciante, ma si sospetta che possa interagire con delle microcalcificazioni più frequentemente presenti nei depositi di amiloide da transtiretina, più che in quelli da catene leggere³¹. Il corretto utilizzo di questa tecnica facilita la diagnosi senza la necessità di ricorrere alla BEM o extracardiaca, ma in ogni caso la cosa principale da fare resta escludere la presenza di amiloidosi AL.

Per determinare il livello di captazione si usa lo score di Perugini (0: assenza di captazione, 1: captazione lieve, 2: captazione media, 3: captazione intensa).

Dato che il tracciante ha affinità anche per il sangue, va eseguita una SPECT (*single-photon emission computed tomography*) al fine di valutare che l'assorbimento sia miocardico e non provenga invece dal circolo sanguigno o da zone extracardiache.³¹

I criteri diagnostici della forma ATTR, secondo le linee guida più recenti³², richiedono:

- Scompenso cardiaco non spiegabile, o essere portatori di mutazioni del gene della TTR
- Risultati di ecocardiografia o CMR compatibili con amiloidosi cardiaca
- Presenza di un grado di captazione alla scintigrafia con tecnezio 99 ≥ 2 confermata da imaging SPECT
- Assenza di gammapatia monoclonale valutata con catene leggere libere (serum FLC) ed elettroforesi con immunofissazione del siero e delle urine.

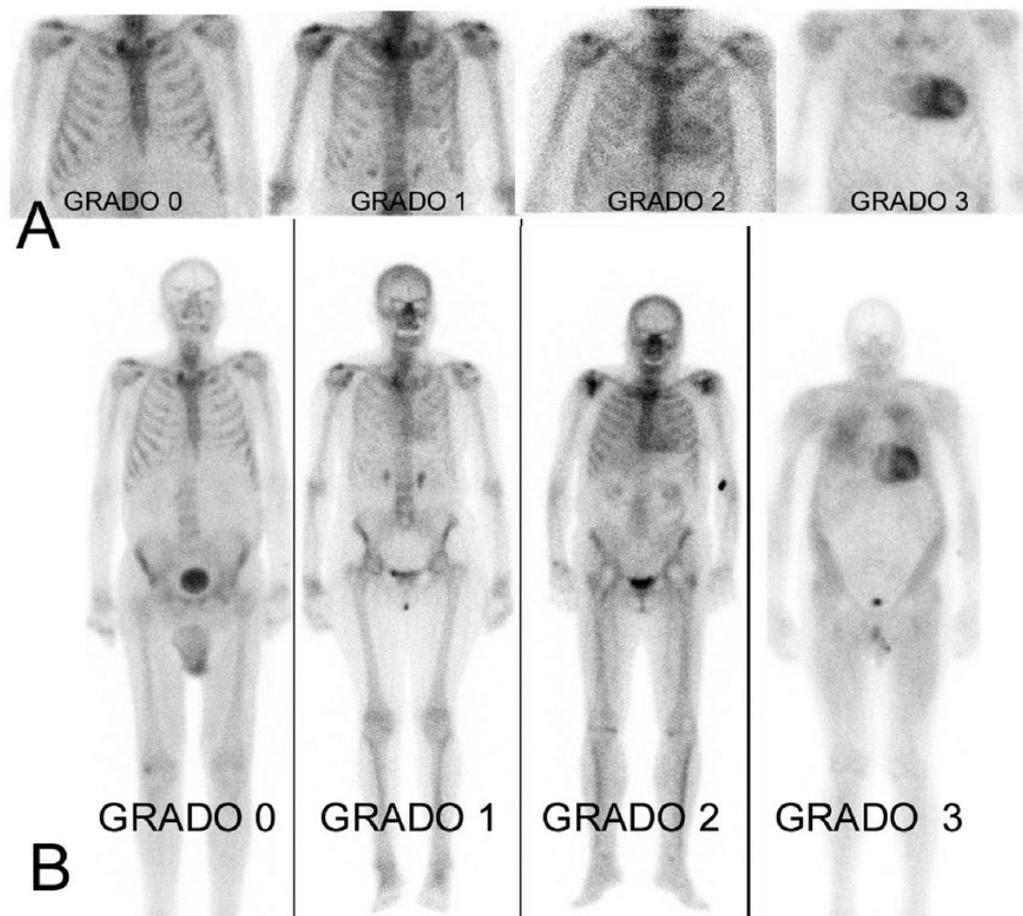


Fig. 5 – Nella figura³³ sono visibili le immagini di scintigrafia con tecnezio 99 nei vari livelli di captazione. A) rispetto alle coste adiacenti: grado 0, captazione assente; grado 1, captazione inferiore a quella delle coste; grado 2, captazione simile o maggiore di quella costale; grado 3, captazione maggiore di quella costale e dello sterno. B) secondo il Perugini score: grado 0, captazione assente; grado 1, captazione inferiore a quella costale; grado 2, captazione simile o maggiore di quella costale; grado 3, captazione simile o maggiore di quella costale e riduzione della captazione ossea.

e) La biopsia del grasso periombelicale

Una tecnica usata in passato era l'aspirazione del grasso periombelicale, la quale ha un'ottima specificità (100%), ma una sensibilità da bassa a molto bassa (dell'84% nelle forme AL e solo del 15% nelle forme ATTR)³⁴. Il miglioramento nella capacità diagnostica si è avuto passando alla biopsia del grasso, che invece è meno dipendente dal patologo che analizza il campione, e dipende più dalla quantità di materiale raccolto¹. La positività viene confermata attraverso la colorazione con

rosso Congo e con la birifrangenza verde mela con microscopio a luce polarizzata, considerato il *gold standard* per la diagnosi³⁵.

Successivamente, l'immunoistochimica e la spettrometria di massa permetteranno la differenziazione tra i vari sottotipi di amiloide³⁴.

L'accuratezza di questa tecnica è stata messa in discussione nei pazienti con ATTR, soprattutto per quanto riguarda l'aspirazione con ago sottile, per i quali sarebbe più indicata la diagnosi attraverso la scintigrafia con tecnezio 99, evitando quindi metodiche più invasive³⁵. Per i pazienti con AL invece, rimane indispensabile la conferma istologica, il cui campione si può prelevare dall'organo coinvolto, se la forma è localizzata, oppure da altri siti se il coinvolgimento è sistemico (grasso periombelicale, midollo osseo, ghiandole salivari minori)³⁶.

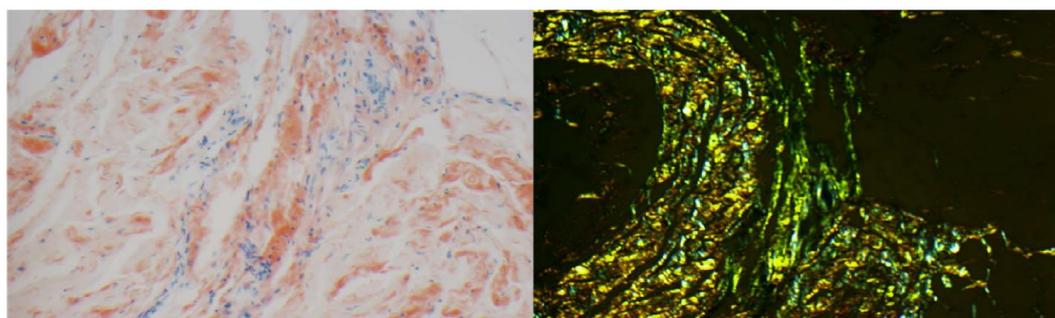


Fig. 6 – L'immagine³⁷ rappresenta una biopsia di grasso periombelicale con a sinistra colorazione con rosso Congo (50x) e a destra la tipica birifrangenza verde mela che evidenzia i depositi di amiloide (*Images courtesy of Dr. Gloria Niehans, Minneapolis VA Medical Center Department of Pathology*).

f) Immunoistochimica, immunofluorescenza, immunoelettro-microscopia e spettrometria di massa

Dopo aver verificato la presenza delle fibrille amiloidi, è fondamentale andare a caratterizzarne la tipologia, per distinguere la proteina originaria e di conseguenza impostare la terapia adeguata. Questo è possibile attraverso le seguenti tecniche. L'immunoistochimica utilizza anticorpi rivolti verso specifiche proteine normali o mutate. Pur essendo ampiamente diffusa e poco costosa, riesce a tipizzare la proteina responsabile solo in centri altamente specializzati, mentre nei restanti casi i risultati si sono spesso dimostrati fuorvianti o inconcludenti.

L'immunofluorescenza è simile ma sfrutta anticorpi marcati con coloranti e un microscopio a fluorescenza e, secondo un recente studio della Mayo Clinic, sembra avere una sensibilità dell'84.6% e una specificità del 92.4% nella tipizzazione del tipo di amiloide. L'immuno-elettromicroscopia è invece una recentissima tecnica che combina IHC e microscopia elettronica e, secondo uno studio di 423 pazienti, riesce a eseguire una tipizzazione corretta nel 99% dei casi, ma è ancora troppo poco diffusa e conosciuta per poter essere applicata sistematicamente.

Il metodo in assoluto più affidabile è la laser capture microdissection dei depositi di amiloide, seguita da spettrometria di massa e dall'analisi tramite appositi software, che caratterizza il sottotipo di amiloide con sensibilità e specificità entrambe pari al 100%³⁶.

g) Le indagini di laboratorio di base

È importante valutare attraverso semplici analisi di laboratorio se possono essere presenti indicatori di scompenso cardiaco, che si riflettono poi sulla funzionalità renale: vanno misurate infatti creatinina, urea, eGFR, oltre a proteinuria ed albuminuria, possibilmente attraverso la raccolta delle urine delle 24h. Per valutare la funzionalità epatica invece, sono utili le transaminasi AST e ALT, la fosfatasi alcalina e la bilirubina diretta e indiretta. Altrettanto importanti sono il conteggio differenziale dei leucociti, gli elettroliti, la proteina C reattiva, e gli indici di coagulazione.

h) I biomarcatori

Ci sono biomarcatori che danno un grande contributo soprattutto prognostico alla gestione del paziente con amiloidosi: sono in particolare le troponine, i peptidi natriuretici e le catene leggere libere.³⁸

Per quanto riguarda la troponina, la più studiata è la hs-cTnT, soprattutto dal punto di vista prognostico, come riportato da Castiglione et al. in un paper del

2021³⁸; meno conosciuto invece è il ruolo della hs-cTnI, che verrà approfondita in questo studio.

Data l'importanza di questi biomarcatori per questo lavoro di ricerca, essi saranno trattati più nel dettaglio in un capitolo successivo dedicato.

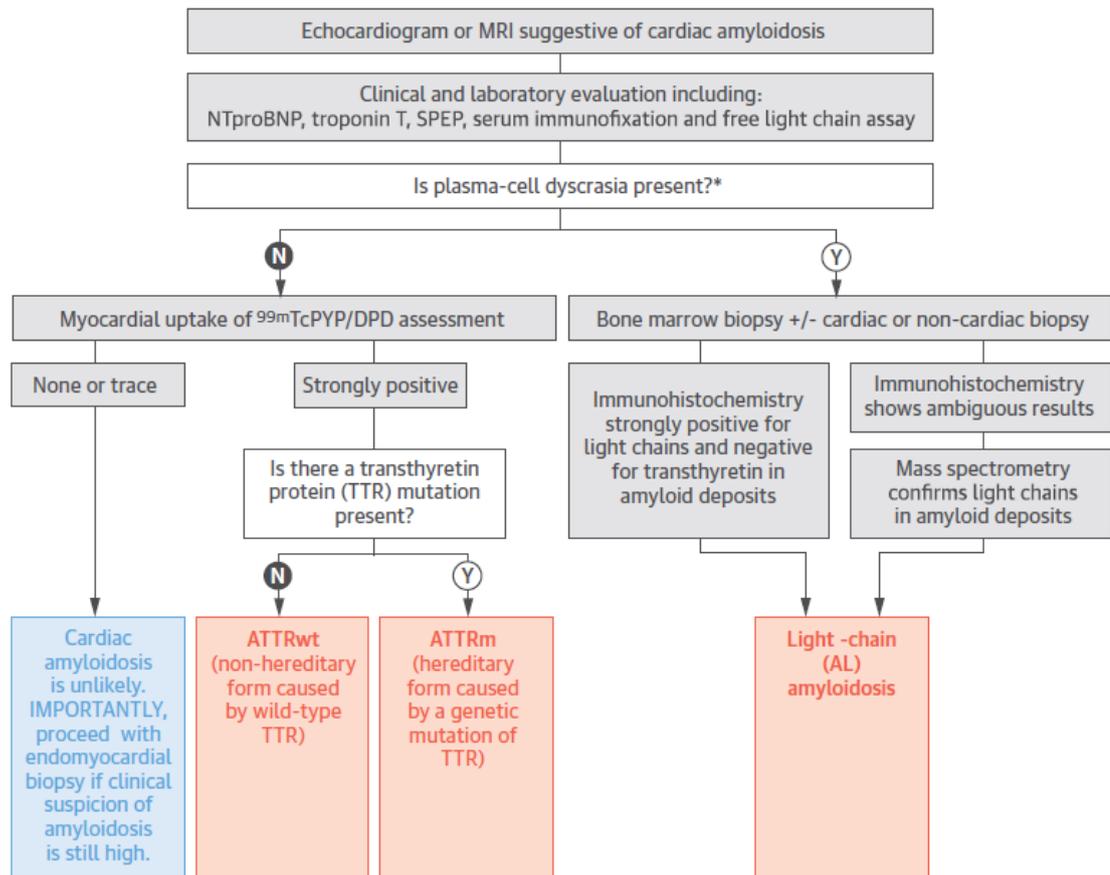


Fig. 7 – Nell'immagine⁴ è rappresentato l'algoritmo con cui è possibile arrivare alla diagnosi e alla tipizzazione dell'amiloidosi in pazienti con scompenso cardiaco di origine sconosciuta.

2.1.5 Clinica

La clinica con cui si presentano i pazienti dipende sostanzialmente dal tipo di amiloidosi e da quali sono gli organi più coinvolti, ovvero quelli in cui si ha maggiore deposito di amiloide, pur esistendo un certo livello di sovrapposizione di sintomi tra le varie forme¹.

In generale, gli organi più comunemente colpiti sono il cuore, i reni, il sistema nervoso, il fegato e il tratto gastrointestinale, oltre a polmoni, muscoli e tessuti molli¹.

Il coinvolgimento del cuore normalmente si manifesta con uno scompenso cardiaco con preservata funzione di eiezione (HFpEF), che si manifesta con segni di scompenso sia sinistro che destro: i primi includono dispnea sia sotto sforzo che a riposo a seconda della gravità, oltre ad edema polmonare; i secondi invece comprendono edemi periferici, epatomegalia ed ascite e aumento della pressione venosa giugulare.^{3,10,20} In alcuni pazienti si ha anche sincope, nel caso di importante riduzione della gittata cardiaca, altri invece vedono il coinvolgimento dei vasi coronarici e conseguente presenza di angina.²⁰ Inoltre, l'infiltrazione di fibrille amiloidi a livello del sistema di conduzione determina spesso disturbi come blocchi di branca, blocco atrio-ventricolare, fibrillazione o flutter atriale.¹⁰ I disturbi di tipo elettrico possono precedere di anni l'insorgenza dello scompenso cardiaco³ e generalmente sono più presenti nei pazienti con ATTR wild-type rispetto alla variante mutata; circa un terzo dei pazienti con ATTR va per questo motivo incontro all'impianto di un pace-maker. Il rischio di formazione di trombi intracardiaci è aumentato in tutti i pazienti con amiloidosi e può avvenire anche in assenza di alterazioni del ritmo³.

A livello renale si hanno proteinuria e riduzione della eGRF, che possono sfociare prima in sindrome nefrosica e poi in insufficienza d'organo. (CIT)

Per quanto riguarda il sistema nervoso, si può avere affezione a livello sia periferico che autonomico.

Andando più in profondità, si possono individuare segni e sintomi più specifici della forma ATTR o della forma AL.

I pazienti con ATTR infatti sono generalmente pazienti anziani e maschi (l'età media della diagnosi è di 74 anni)³. Gli organi più frequentemente coinvolti sono il cuore e il sistema nervoso autonomo.²⁰ Si stima che il 30-50% di essi sia stato operato di tunnel carpale, spesso bilaterale, almeno 5-10 anni prima della diagnosi; frequentemente sono stati operati per stenosi del canale midollare e molto spesso si presentano con rottura spontanea del tendine del bicipite (segno di Popeye positivo)¹ e con parestesie alle estremità, sia alle mani sia ai piedi. Se il coinvolgimento è prevalentemente nervoso, si ha polineuropatia assonale sensitivo-motoria. A livello del sistema nervoso autonomo, la neuropatia si può manifestare anche con ipotensione ortostatica, infezioni urinarie causate da ritenzione urinaria, disfunzioni sessuali e anomalie della sudorazione. La deposizione di amiloide a livello gastrointestinale si manifesta invece con nausea, vomito, diarrea o stipsi e calo ponderale.²⁰

Se i pazienti sono affetti dalla hATTR, questa sintomatologia può iniziare a presentarsi anche fino a 30 anni prima rispetto all'età media di insorgenza³.

Nelle forme AL invece il coinvolgimento multiorgano e la perdita di funzione d'organo sono più rapidi e questo si deve alla dimostrata maggiore tossicità delle catene leggere rispetto alle altre tipologie di amiloide¹. L'età media di diagnosi è intorno ai 63 anni e il 90% circa dei pazienti ha 50 anni o più. Gli organi più coinvolti sono il cuore (70-80%) e i reni (50-60%), ma la sintomatologia iniziale è insidiosa, perché molto spesso generica: astenia, anoressia, perdita di peso sono le prime manifestazioni, a cui si aggiungono più tardi quelle organo-specifiche, come scompenso cardiaco, ipotensione ortostatica, disfagia, neuropatia periferica, macroglossia ed ecchimosi¹. Il coinvolgimento renale con sindrome nefrosica sembra essere quello più frequente (lo riporta il 65% dei pazienti), e si manifesta con proteinuria e progressivo calo della eGFR.²⁰

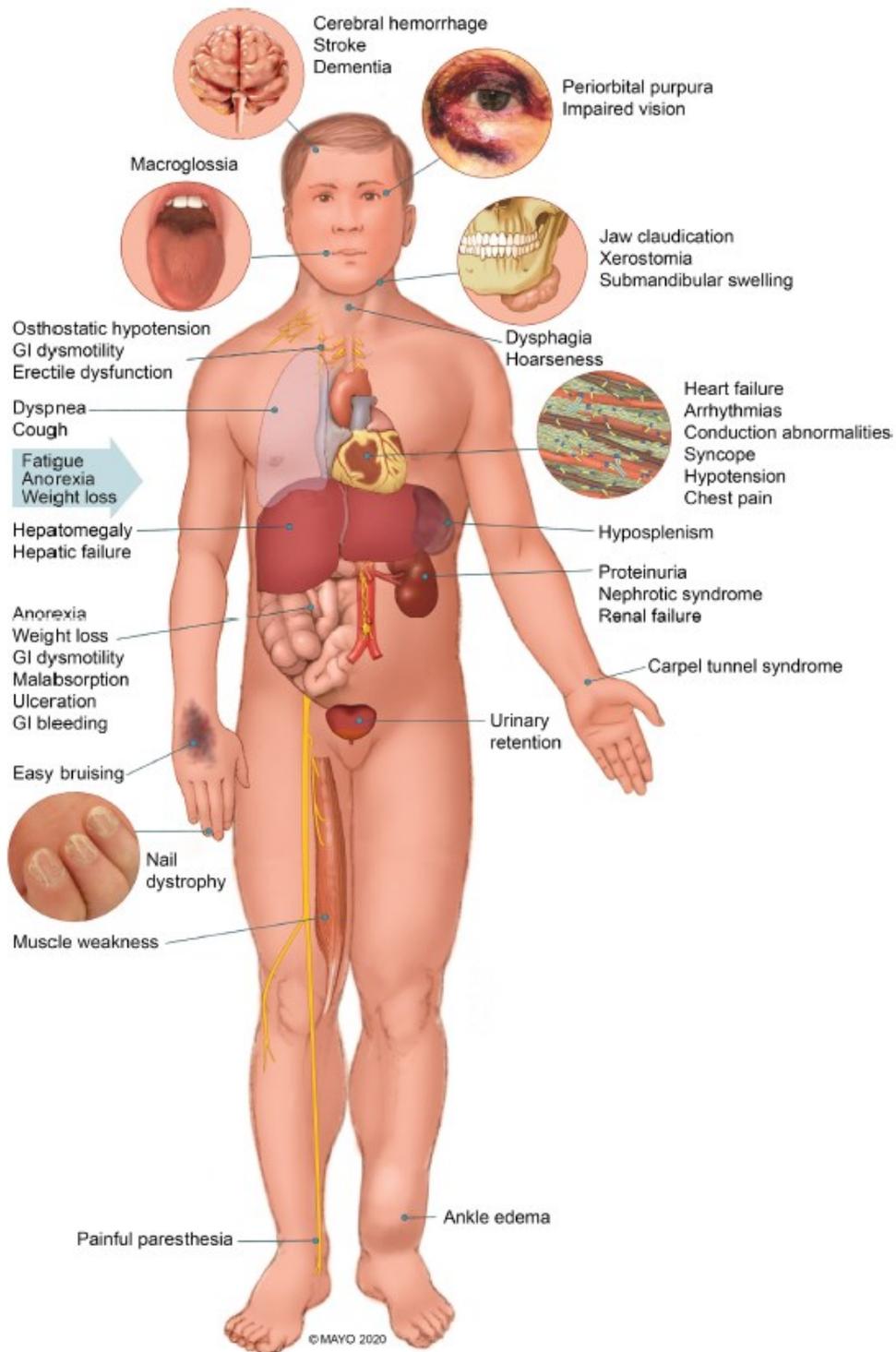


Fig. 8 – Nella figura¹ si possono vedere i siti maggiormente colpiti. La sintomatologia si deve a dove si deposita la sostanza amiloide. Il coinvolgimento cardiaco è quasi sempre presente, sia nella forma AL che nella TTR.

2.1.6 Trattamento

Mai come oggi si sottolinea l'importanza della corretta e rapida diagnosi dell'amiloidosi, date le possibilità terapeutiche che oggi finalmente sono a disposizione dei pazienti.

L'approccio terapeutico nei pazienti con amiloidosi è composto da due pilastri importanti: il primo consiste nel trattamento generale che serve a gestire i sintomi che si accompagnano alla malattia di base, per permettere un complessivo buon compenso, soprattutto a livello cardiaco, principale predittore di outcome clinico; il secondo consiste nella terapia specifica a seconda della forma di amiloidosi in questione, basato sulla soppressione della produzione della proteina anomala e sulla stabilizzazione di quella già prodotta.²⁰ Verranno approfondite nel dettaglio di seguito.

a) Gestione terapeutica della cardiomiopatia amiloidotica

Per il clinico che si occupa del paziente con amiloidosi, la principale preoccupazione è quella di garantire un'ottimale e personalizzata gestione dello scompenso cardiaco, principale causa della sintomatologia clinica (dispnea, ritenzione di liquidi). Per farlo, alla base della terapia si trovano i diuretici²⁰: il loro dosaggio va frequentemente aggiustato a seconda del peso del paziente, il quale deve essere educato a riconoscere i segnali di accumulo di fluidi e potrà con il tempo imparare a regolare la terapia diuretica anche in autonomia. A questo, vanno unite misure igieniche come il controllo dell'introito di liquidi (non superare 1.5 L/die) e la riduzione del sale nella dieta (< 2 g/die). I diuretici più utilizzati sono quelli dell'ansa e gli antagonisti del recettore dell'aldosterone.

Per quanto riguarda invece gli inibitori del sistema RAAS e dei beta bloccanti, manca evidenza di un beneficio sul quadro clinico; il loro utilizzo, al contrario, può comprometterlo ancora di più inficiando il labile equilibrio emodinamico di questi pazienti, il cui output cardiaco è spesso mantenuto da una tachicardia

compensatoria che con queste categorie di farmaci tende a venire meno, oltre a provocare un abbassamento della pressione che i pazienti tollerano poco.^{3,4}

I calcio-antagonisti vanno evitati, a causa dell'effetto inotropo negativo, mentre la digossina può essere utile nei pazienti con fibrillazione atriale per il controllo della frequenza cardiaca.²⁰ La fibrillazione atriale è riscontrata in una percentuale che oscilla intorno al 70% nei pazienti con ATTR. Alcuni studi hanno dimostrato che non ci sono grandi differenze nel tasso di sopravvivenza tra i pazienti che ce l'hanno e quelli che non ce l'hanno, motivo per cui il trattamento va individualizzato a seconda del paziente. I farmaci utilizzati a questo proposito sono gli anticoagulanti (inibitori della vitamina K e nuovi anticoagulanti orali).²⁰

In merito ai disturbi della conduzione, provocati dal deposito di amiloide anche a livello del nodo seno atriale, del nodo atrioventricolare e delle altre componenti del sistema, può essere valutato l'impianto di un pacemaker, seguendo le linee guida dell'ESC.

b) Terapia specifica per l'amiloidosi da transtiretina (ATTR)

Fino a pochi anni fa, l'unica terapia disponibile per i pazienti con ATTRv era il trapianto di fegato, che offriva un tasso di sopravvivenza a 20 anni del 55%, con risultati migliori in quei pazienti che avessero BMI elevato, età inferiore ai 50 anni, malattia di recente insorgenza e presenza della mutazione Val30Met. Il trapianto non era un'opzione invece per i pazienti con forma wild-type, in quanto il loro fegato produce una transtiretina del tutto normale. Per loro era considerato invece il trapianto di cuore, anche se rimane una possibilità non molto fruibile a causa dell'età avanzata della maggior parte dei pazienti. Al giorno d'oggi, vista la disponibilità di nuove e varie possibilità terapeutiche, i trapianti stanno venendo sempre di più abbandonati.²⁰

Tra i farmaci utilizzabili attualmente si hanno a disposizione diverse categorie: gli stabilizzatori della transtiretina, i silenziatori genici, e molecole in grado di degradare le fibrille amiloidi.²⁰

Nella prima categoria si trova il tafamidis: è stato dimostrato che questo farmaco è in grado di migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita e ridurre l'ospedalizzazione nei pazienti con ATTR a coinvolgimento cardiaco, sia nella forma mutata che nella forma wild-type, a patto che la classe NYHA di presentazione del paziente sia compresa tra I e II.²⁰ Recentemente introdotto anche in Italia, il tafamidis è una molecola in grado di legarsi alla transtiretina e di prevenirne la dissociazione in monomeri: è stato dimostrato inoltre che riduce la mortalità per cause non solo cardiovascolari ed è associato a miglioramento della qualità della vita rispetto al placebo. Da sottolineare inoltre è il fatto che è un farmaco molto ben tollerato dai pazienti, con scarsissimi effetti collaterali e profilo di sicurezza quasi del tutto sovrapponibile al placebo. Gli effetti sulla qualità della vita sono già visibili dopo 6 mesi di trattamento, mentre quelli sul miglioramento del tasso di sopravvivenza sopraggiungono dopo circa 18 mesi. In ogni caso, quanto più precoce è la diagnosi, tanto migliori saranno i risultati clinici.¹⁰

Tra i silenziatori genici, i più conosciuti sono il patisiran e l'inotersen, entrambi capaci di sopprimere la produzione di transtiretina a livello epatico e indicati nei pazienti con coinvolgimento neurologico sia ATTRv sia ATTRwt. I farmaci invece deputati alla degradazione delle fibrille comprendono la doxicilina e l'acido tauroursodesossicolico.²⁰

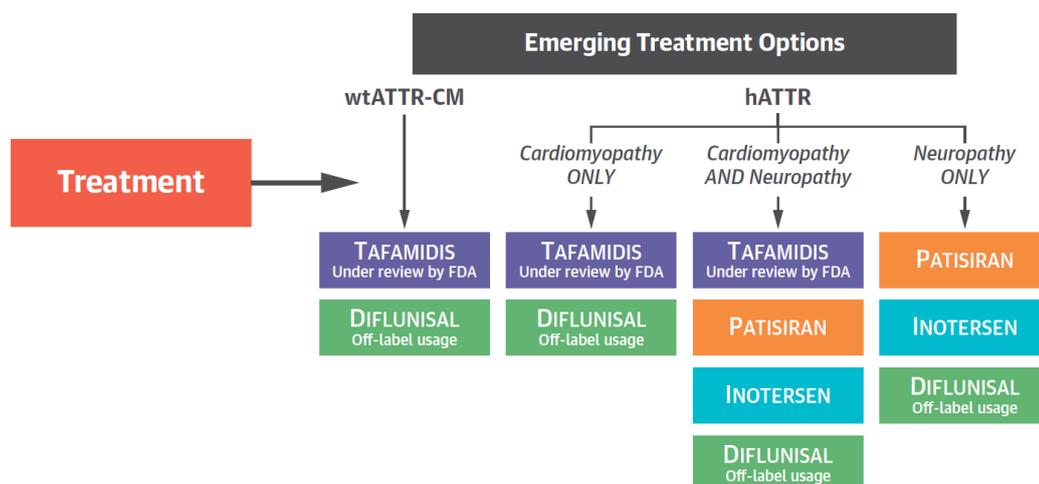


Fig. 9 – Nell'immagine³ sono schematizzati i trattamenti disponibili per le amiloidosi da transtiretina ATTRwt e ATTRv.

c) Terapia specifica per l'amiloidosi da catene leggere (AL)

L'obiettivo della chemioterapia è quello di eradicare il clone plasmacellulare responsabile della produzione delle catene leggere ed eliminare quelle già presenti nel circolo. Prende origine da quella che è la terapia per il mieloma multiplo, adattandola alla condizione specifica del paziente con amiloidosi AL. Prima di iniziare la terapia, i pazienti vanno stratificati a seconda del rischio. I pazienti a basso rischio costituiscono purtroppo una minoranza del totale e possono essere identificati attraverso i seguenti criteri:

- Assenza di severo coinvolgimento cardiaco
- Età biologica <65-70 anni
- NT-proBNP < 5000 ng/mL
- Pressione sistolica > 90 mmHg
- Clearance della creatinina > 50 mL/min
- ECOG < 2
- NYHA I o II
- Assenza di versamento pleurico
- Capacità di diffusione polmonare di CO > 50%
- < 3 organi coinvolti (fegato, cuore, reni, sistema nervoso autonomo)

Solamente il 10-25% dei pazienti soddisfa questi criteri. I pazienti di questa categoria vanno incontro a chemioterapia ad alto dosaggio secondo il protocollo CyBorD (bortezomib, ciclofosfamide e desametasone; il bortezomib è un inibitore del proteasoma, che fa diminuire rapidamente i livelli di catene leggere circolanti, mentre la ciclofosfamide è un agente alchilante dal potere citostatico).²⁰

I pazienti a rischio intermedio e alto si identificano a seconda della classe NYHA e dello staging della Mayo Clinic: i primi sono quelli compresi tra lo stage I e IIIA, mentre i secondi sono quelli dello stadio IIIB, entrambi con classe NYHA superiore a III (la classe III è stata successivamente suddivisa³⁹ in IIIA, con NT-proBNP ≤ 8500 ng/mL e IIIB, con NT-proBNP > 8500 ng/mL). Coloro che afferiscono alla classe intermedia ricevono terapia secondo il protocollo CyBorD oppure BMDex (bortezomib, melphalan e desametasone, dove anche il melphalan è un agente alchilante). I pazienti a rischio elevato invece, essendo altamente fragili, hanno

bisogno di combinazioni di questi farmaci a dosaggio basso e valutato individualmente a seconda delle condizioni del singolo paziente.²⁰ In alcuni pazienti giovani e fit ben selezionati, prima della chemioterapia si può prendere in considerazione il trapianto di cuore.

Più recentemente sono stati introdotti anche anticorpi monoclonali come il daratumumab il quale, legandosi a CD38, un antigene espresso dalle plasmacellule sia nell'amiloidosi AL sia nel mieloma multiplo, innesca una risposta immunitaria attivando il complemento, la citotossicità mediata da anticorpi, la fagocitosi indotta da anticorpi e l'induzione dell'apoptosi,¹⁵ offrendo una risposta ematologica nell'80% dei pazienti dopo un follow-up di 7.5 mesi, una risposta cardiaca nel 33% e una risposta renale nel 32% dei pazienti di un recente studio della Mayo Clinic.⁴⁰

Un altro farmaco che si sta rivelando promettente è la doxiciclina, un antibiotico che sembra essere in grado di sopprimere la formazione di fibrille amiloidi.¹⁵ Sono attualmente in corso studi circa la possibilità di rimuovere il materiale amiloide già depositatosi nei tessuti attraverso l'uso di altri anticorpi monoclonali.¹⁵

La risposta al trattamento si valuta sotto due punti di vista: quello ematologico, ovvero la riduzione delle catene leggere circolanti (il risultato ottimale sarebbe arrivare a d-FLC < 40 mg/L se prima del trattamento superavano le 50 mg/L), e quello d'organo, per cui la funzione d'organo migliora sensibilmente. Per quanto riguarda la risposta a livello cardiaco, si intende un calo di NT-proBNP di almeno il 30% e di almeno 300 ng/L rispetto a prima della terapia, o un miglioramento della classe NYHA da IV-III a II-I. A livello epatico, è necessaria una riduzione del 50% della fosfatasi alcalina o di almeno 2 cm dell'epatomegalia all'imaging. Per quanto riguarda invece i reni, si ha risposta quando la proteinuria cala del 30% o sotto i 0.5 g/24h, in assenza di progressione del danno renale (definito come un calo della eGFR di almeno il 25%). È importante ricordare che la risposta d'organo può rendersi evidente anche qualche mese dopo la risposta ematologica.²⁰ Se nonostante la terapia in corso dovesse manifestarsi progressione della malattia, è necessario immediatamente procedere con cambio del trattamento. Altre opzioni

terapeutiche includono farmaci immunomodulanti come lenalidomide e pomalidomide oppure nuovi inibitori del proteasoma come l'ixazomib.²⁰

Tra le altre possibilità terapeutiche, c'è il trapianto di cellule staminali autologhe. Circa il 20% dei pazienti con diagnosi recente può essere candidato a questa procedura, e vari altri pazienti possono beneficiarne dopo essere stati sottoposti a chemioterapia pre-trapianto.⁴¹

2.2 Biomarcatori cardiaci

Fin dai primi anni 2000 è noto che l'utilizzo di biomarcatori cardiaci, in particolare la troponina e i peptidi natriuretici, rappresenta un ottimo sistema per valutare l'estensione del coinvolgimento cardiaco, principale predittore di outcome clinico nei pazienti con amiloidosi.⁴²

Le troponine cTnT e cTnI, sono componenti dell'apparato contrattile dei cardiomiociti e sono marcatori altamente sensibili e specifici di danno miocardico.⁴³

La troponina è un marcatore di danno miocardico utilizzato ampiamente nei pazienti con coronaropatia e con IMA, ma il suo campo di applicazione è più ampio. È utile, infatti, anche nella valutazione della sofferenza miocardica nei pazienti con amiloidosi a prescindere dall'intaccamento coronarico. Nel 2001 infatti, in uno studio di Miller et al.⁴⁴, in cui venivano analizzati 13 pazienti con amiloidosi (sia di tipo AL sia di tipo ATTRv) sottoposti a trapianto cardiaco, per la prima volta si riscontrava che alla cardiomiopatia amiloidotica si associava un incremento sia della troponina T sia della troponina I, in assenza di coronaropatia grave (tutti erano stati sottoposti a coronarografia prima del trapianto e ciò che era emerso era una coronaropatia lieve in 7 di essi e coronarie angiograficamente normali nei restanti 6). In uno studio del 2012 di Apridonidze et al.⁴⁵, veniva per la prima volta individuata la correlazione tra la componente clinica, l'ecocardiografia e l'aumento della troponina I. L'incremento della troponina I era infatti associato a indici ecocardiografici peggiori riguardo la funzionalità del ventricolo sinistro, in particolare un diminuito indice cardiaco e un aumentato MPI (myocardial performance index), a peggioramento della funzione sistolica dell'atrio sinistro, oltre che a incremento del BNP. Tra tutte le variabili cliniche ed ecocardiografiche analizzate nel suddetto studio, la troponina I risultava essere il maggior predittore di mortalità per tutte le cause nei pazienti con cardiopatia amiloidotica.

In un recente studio di Myhre⁴⁶ infatti, data per assodata la relazione tra aumento della troponina T e aumento della massa del ventricolo sinistro nella popolazione generale e tra i pazienti con scompenso a preservata frazione di eiezione, si è

voluta indagare la correlazione tra aumento della hs-cTnT e la funzione del ventricolo sinistro in merito alla fase diastolica. Ciò che è emerso è che la presenza di aumento di hs-cTnT insieme alla disfunzione diastolica stessa sono associati a un aumentato rischio di scompenso cardiaco, motivo per cui se ne suggerisce l'utilizzo come marcatore di diagnosi precoce. Il presente studio invece approfondirà il ruolo della troponina I.

Attualmente la troponina cardiaca viene misurata con test ad alta sensibilità e il valore del novantanovesimo percentile (99°) sesso-specifico misurato in una popolazione sana è il cutoff universalmente accettato per definire l'anormalità e la presenza di danno miocardico.⁴³

I test ad elevata sensibilità, per essere definiti tali, devono soddisfare due caratteristiche principali:

1. il 99° percentile deve essere misurato con un'impresione analitica inferiore al $\leq 10\%$ (% CV, coefficiente di variazione);
2. Valori superiori al limite di riferimento (limit of detection) devono essere misurabili in almeno il 50% dei soggetti sani.

Mentre per la hs-cTnT vi è un solo test disponibile e diffuso globalmente per la misurazione, per la hs-cTnI sono disponibili numerosi test prodotti da diverse aziende e approvati per l'utilizzo clinico.

Tuttavia, è presente una carenza di armonizzazione tra i test disponibili, dovuta alla differente specificità degli anticorpi utilizzati per i differenti epitopi nonché da altri fattori che influenzano il dosaggio quali la degradazione proteolitica, la fosforilazione e la presenza di complessi circolanti di cTnI diversa conformazione.

Il proBNP invece è un peptide prodotto principalmente dal ventricolo sinistro, il quale viene rilasciato e tagliato in due componenti, il BNP attivo e il segmento NT-proBNP. Quest'ultimo è un sensibile indicatore di anomalie cardiache, soprattutto aumenta quando c'è stress di parete e disfunzione del ventricolo sinistro, per cui è un forte indicatore prognostico nello scompenso cardiaco congestizio.^{47,48} In molti centri si usa il BNP al posto dell'NT-proBNP, ma si è visto che hanno valore prognostico simile.⁴⁸

Per quanto riguarda i pazienti con AL, è fondamentale lo studio della Mayo Clinic del 2004⁴⁷ attraverso il quale si è delineato un sistema di staging dall'elevato valore prognostico, basato sull'utilizzo di cTnT non ad alta sensibilità e di NT-proBNP. Lo staging definisce tre livelli a seconda delle seguenti soglie di biomarcatori:

- NT-proBNP < 332 ng/L
- cTnT < 0.035 µg/L oppure cTnI < 0.1 µg/L

Lo staging si definisce come segue:

- Stage I: né NT-proBNP né la troponina superano il livello soglia
- Stage II: uno dei due supera il livello soglia
- Stage III: entrambi superano il livello soglia.⁴⁷

Si tratta di un modello basato su due parametri oggettivi, poco costosi e facilmente riproducibili. Nel 2012, lo stesso gruppo di ricerca ha migliorato questo modello aggiungendo anche la misurazione delle catene leggere libere sieriche (sFLC), ed in particolare la differenza tra la componente coinvolta e quella non coinvolta (dFLC), notando un miglioramento nella stratificazione del rischio e dell'outcome e nello sviluppo di terapie aggiustate a seconda della prognosi del paziente.⁴⁸

Questo nuovo modello, oltre a introdurre anche il valore di dFLC, modifica le soglie anche dell'NT-proBNP, che diventa di 1800 pg/mL e della troponina T, da 0.035 a 0.025 ng/mL. Questo nuovo modello permette di classificare meglio i pazienti in gruppi con diverso outcome, a differenza del modello precedente.⁴⁸

In contesti diversi dall'amiloidosi, è stato dimostrato che i livelli di NT-proBNP correlano con la dilatazione, la disfunzione e il remodeling del ventricolo sinistro, con lo scompenso cardiaco congestizio e con la mortalità in pazienti con infarto acuto del miocardio (IMA) e quest'ultima associazione esiste anche in assenza di aumento della troponina.⁴⁹

Non si conoscono ancora del tutto i meccanismi che determinano il rilascio di troponina ed NT-proBNP nei pazienti con amiloidosi AL, ma si ipotizza che siano l'amiloide stessa e le catene leggere a provocare un danno diretto o indiretto ai cardiomiociti, i quali rispondono rilasciando in circolo questi biomarcatori. Essi

sono facilmente misurabili e possono aiutare a predire l'outcome nei pazienti sottoposti a chemioterapia o a trapianto di cellule staminali.⁴⁸

Secondo il lavoro di Merlini et al. del 2018⁵⁰, le catene leggere delle immunoglobuline sono in grado di attivare la pathway di p38 MAPK, una via di signalling che promuove il danno cellulare attraverso diverse azioni: un aumento nella produzione di ROS, alterazione dell'omeostasi dei canali del calcio, disfunzione e morte cellulare nei cardiomiociti, oltre a mediare la trascrizione del BNP.

Nei pazienti con AL, risulta che l'aumento dei biomarcatori cardiaci, definito come un aumento di più del 30% (e di più di 300 ng/L) dell'NT-proBNP e un aumento di più del 75% nella hs-cTnT, sia un importante fattore prognostico indipendente. L'obiettivo della chemioterapia nei pazienti con AL deve essere quindi quello di determinare una risposta cardiaca che si manifesta con la riduzione dei valori dell'NT-proBNP e della hs-cTnT. L'andamento dei biomarcatori deve essere quindi monitorato di pari passo a quello della risposta ematologica (quindi la normalizzazione o l'abbattimento della concentrazione delle sFLC), tenendo conto di quelli che potrebbero essere altri fattori che sarebbero in grado di influenzarne i livelli (come la ritenzione di fluidi, la disidratazione o altre patologie cardiache concomitanti).⁵¹ Il miglior momento per effettuare la misurazione di questi biomarcatori sarebbe idealmente una situazione di equilibrio, dove si sia raggiunto un ottimale bilancio idrico e in assenza di altri fattori che potrebbero comprometterne la concentrazione ematica.⁵¹

Per quanto riguarda invece i pazienti con ATTRwt, uno studio di Mayo Clinic del 2016¹⁸ ha sviluppato un apposito sistema di staging in grado di individuare tre popolazioni di pazienti con diversi tassi di sopravvivenza (overall survival, OS), a seconda dei livelli soglia di cTnT e di NT-proBNP (rispettivamente 0.05 ng/mg e 3000 pg/mL), e consiste in:

- Stage I: entrambi i valori sotto la soglia
- Stage II: un solo valore sotto la soglia
- Stage III: entrambi i valori sopra la soglia

Questa suddivisione si riflette poi sul tasso di sopravvivenza, che è rispettivamente di 66, 40 e 20 mesi, aggiustando il dato a seconda del sesso e dell'età dei pazienti.¹⁸ Come anticipato prima, un altro dato di laboratorio di importanza cruciale nella diagnosi e nella valutazione della risposta al trattamento nei pazienti con amiloidosi AL è rappresentato dalle catene leggere libere sieriche (sFLC), κ e λ . Nel 90% dei pazienti con AL non trattata, si rileva un alterato rapporto κ/λ^4 , ma non va dimenticato che un rapporto normale non esclude la diagnosi; in questo caso quindi andranno eseguiti ulteriori approfondimenti.

Biomarker	Screening	Diagnosis	Risk stratification	Response to treatment
AL				
BNP, NT-proBNP	+/-	+++	+++	+++
(hs-)TnT/I	+/-	+	+++	+
FLCs, dFLC	n/a	+++	+++	+++
sST2	n/a	n/a	++	n/a
GDF15	n/a	n/a	++	n/a
HGF	+/-	+	+	n/a
Gal-3	n/a	n/a	+/-	n/a
OPN, OPG, PIGF, vWF, MR-proADM	n/a	n/a	+	n/a
ATTR				
BNP, NT-proBNP	+/-	+	++	+/-
(hs-)TnT/I	+/-	+	++	+/-
eGFR	n/a	n/a	++	n/a
TTR	+/- (ATTRv)	+	+	+
RBP4	+/- (ATTRv)	+	n/a	n/a
Uric acid	n/a	n/a	+	n/a
HGF	n/a	+/-	+/-	n/a

Fig. 10 – Nell'immagine³⁸ sono rappresentati i vari biomarcatori utili nella gestione del paziente con AL e con ATTR, dal punto di vista dello screening, della diagnosi, della stratificazione del rischio e della risposta al trattamento (+++ indica forte livello di evidenza, inclusione in score validi a livello internazionale o raccomandazioni provenienti da consensus; ++ forte evidenza da molteplici studi originali o da singoli studi con grandi coorti; + evidenza limitata a piccoli studi originali; +/- risultati controversi; n/a: dati non disponibili).

2.3 La biopsia endomiocardica (BEM)

Attraverso la realizzazione della BEM e lo studio di cuori espantati, è stato possibile studiare e caratterizzare non solo la distribuzione delle fibre amiloidi tra i cardiomiociti, ma anche la tipologia di risposte al danno che vi si accompagnano. Risulta infatti che la deposizione di materiale amiloide segua dei *pattern* di localizzazione (interstiziale, nodulare e peri-vascolare^{17,52}) e di distribuzione (diffusa o non diffusa)¹⁷, che, nei precedenti studi citati, venivano così definite: la deposizione veniva quantificata attraverso una scala visuale in tre livelli, lieve moderata e severa a seconda della superficie miocardica occupata (rispettivamente < 25%, tra 25 e 50% e >50%); l'infiltrazione, invece, veniva definita "diffusa" se più del 50% della sezione istologica era occupato da amiloide con infiltrazione generalizzata in assenza di aree di accumulo, e "non diffusa" se meno del 50% della sezione istologica era occupata da amiloide, distribuita secondo zone di accumulo confluenti.¹⁷ Anche se ad ora non è del tutto chiaro se il tipo di amiloide possa essere distinto a seconda del pattern di distribuzione, sembra però esserci una prevalenza di depositi diffusi a livello pericellulare, endocardico, arteriale e arteriolare nella amiloidosi AL e invece di tipo nodulare nella ATTR.¹³

Il danno d'organo, comunque, si deve non soltanto all'ingombro meccanico dato dalla presenza dell'amiloide, ma anche a un'intrinseca tossicità determinata dalle fibrille amiloidi, soprattutto quelle formate dalle catene leggere delle immunoglobuline.

Analizzando in profondità l'architettura strutturale del danno miocardico, un recente studio di Pucci *et al.*⁵² ha dimostrato che esiste aumento del volume dello spazio extracellulare nel miocardio affetto da amiloidosi. A spiegare questo fenomeno non intervengono solamente le fibre amiloidi lì depositatesi, ma in ugual misura si ha la presenza di fibrosi. Analizzando infatti le biopsie endomiocardiche prelevate dal ventricolo sinistro di 36 pazienti (dei quali 19 con AL e 18 con TTR), emergeva che per un'estensione di circa il 15% il tessuto analizzato era caratterizzato dalla presenza di sostanza amiloide e che un altro

15% manifestava fibrosi, senza che ci fosse sovrapposizione tra le due componenti. La distribuzione dell'amiloide era multifocale nel 78% dei pazienti e diffusa nell'11%, con presenza di fibrille sia a livello interstiziale che perivascolare. Questi risultati non manifestavano particolari differenze tra i sottogruppi AL e TTR, tranne, una lieve tendenza a una grossolana distribuzione a macchia di leopardo nelle forme ATTR.⁵² Nello stesso studio, emergeva che l'estensione dell'amiloide correlava con la hs-cTnT e con l'NT-proBNP, sia nella popolazione totale, sia analizzando separatamente i sottogruppi AL e TTR, mentre non c'era correlazione con il pattern di distribuzione o con la localizzazione. Anche la combinazione di estensione di amiloide e di fibrosi correlava con gli stessi biomarcatori.⁵²

In contrapposizione a quanto riportato da Pucci et al.⁵², un altro studio di Larsen⁵³ sembra invece individuare una forte correlazione tra il tipo di amiloide e l'estensione e la distribuzione della stessa. Nella sua analisi, erano inclusi 108 pazienti (60 con ATTR, 44 con AL e i restanti 4 con altre forme meno note) e le biopsie provenivano da prelievi autoptici ventricolari transmurali a tutto spessore (almeno 4 campioni per paziente). L'analisi istopatologica evidenziava che la deposizione seguiva preferenzialmente pattern diffuso pericellulare interstiziale, vascolare ed endocardico nei pazienti con AL, mentre in quelli con TTR erano più frequenti i tipi nodulare e discreto pericellulare interstiziale.⁵³ Ciononostante, l'istopatologia da sola non è sufficiente a fare una diagnosi accurata. Può servire invece per rafforzare la diagnosi nel momento in cui altri elementi fossero già stati individuati, in modo da permettere al paziente di iniziare la terapia nell'attesa di avere i risultati della spettrometria di massa e la cromatografia liquida.⁵³ Ad oggi, quindi, sono necessari ulteriori studi per determinare quali siano i meccanismi fisiopatologici alla base dei diversi tipi di pattern di distribuzione e se essi possano in qualche modo correlare con la prognosi dei pazienti.⁵³

Sempre nell'ottica di analizzare dal punto di vista istologico il deposito di materiale amiloide, un recente studio di Morioka et al.⁵⁴ si propone di ricercare una correlazione tra imaging cardiaco, biomarcatori e quantitativo di amiloide presente nei pazienti affetti da cardiomiopatia amiloidotica da transtiretina wild-type. I risultati confermano che la positività alla scintigrafia, i parametri di

risonanza magnetica cardiaca (T1 native ed ECV), lo strain longitudinale globale e i livelli di hs-cTnT correlano oltre che tra di loro, anche con il carico di amiloide presente nel miocardio, e nell'insieme permettono di monitorare l'andamento della patologia nel tempo.

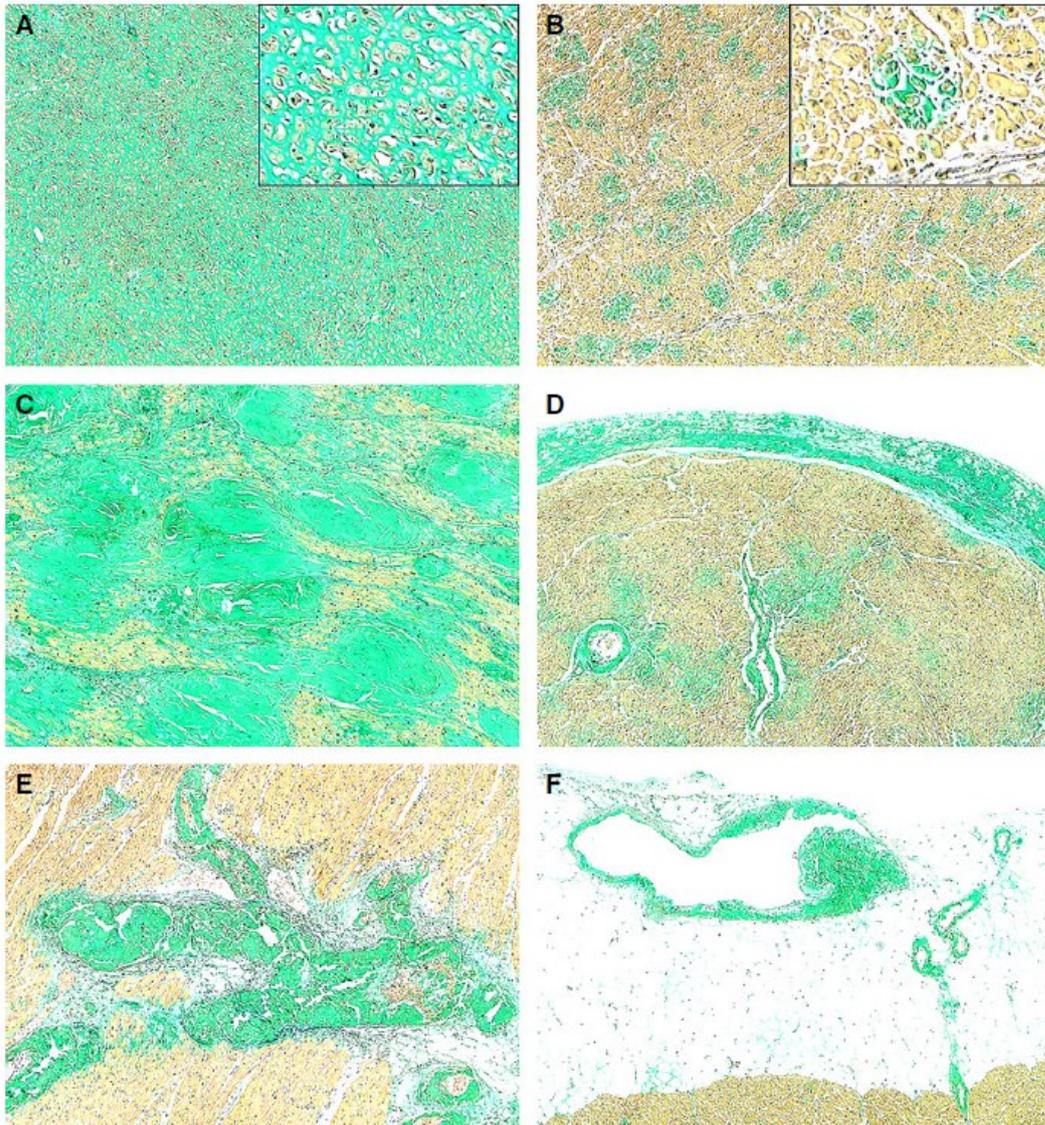


Fig. 11 – Nell'immagine⁵³ sono rappresentati diversi pattern di distribuzione dell'amiloide a livello cardiaco, in colorazione con alcian-blu solfato: a) interstiziale pericellulare diffusa; b) interstiziale perivascolare discreta; c) interstiziale nodulare; d) endocardica; e) arteriosa (ostruttiva); f) venosa (non ostruttiva).

3. Scopo dello studio

Attualmente, vi è grande interesse scientifico nei confronti dell'amiloidosi cardiaca e in merito alle varie sfaccettature di quest'entità clinica, nelle sue forme principali. Si sono studiati i meccanismi alla base della fisiopatologia, si sono migliorati gli algoritmi diagnostici, fino alla realizzazione di adeguate terapie mirate a seconda della tipologia di amiloidosi e dello stadio clinico in cui si trova in paziente nel momento in cui viene effettuata la diagnosi.

È noto l'importante significato prognostico dei biomarcatori cardiaci, in particolare della cTn e dei peptidi natriuretici. Tuttavia, i meccanismi strutturali e fisiopatologici alla base della diversa entità di danno miocardico nelle forme principali di amiloidosi e nel singolo paziente restano ancora da definire. Il presente studio multidisciplinare, che integra l'anatomia patologica e la cardiologia clinica, ha lo scopo di investigare quali siano i determinanti ecocardiografici e tissutali di danno miocardico espresso dall'incremento della troponina cardiaca.

Gli scopi di questo studio sono pertanto:

- 1) Correlazione tra dati clinici e strumentali e danno miocardico, valutato con la misurazione della troponina I ad alta sensibilità (hs-cTnI).
- 2) Correlazione tra dati istologici valutati attraverso lo studio di biopsie endomiocardiche (BEM) e il danno miocardico, valutato con la misurazione della troponina I ad alta sensibilità (hs-cTnI). Lo studio si propone di correlare l'entità del danno miocardico e i parametri ecocardiografici con i pattern di deposizione amiloide, la severità dell'infiltrazione miocardica e il grado di infiammazione tissutale.

4. Materiali e metodi

4.1 Popolazione dello studio

Questo è uno studio di tipo osservazionale retrospettivo.

Per effettuarlo, si sono raccolti dati clinici, strumentali e laboratoristici dei pazienti affetti da amiloidosi AL e ATTR a coinvolgimento cardiaco facenti riferimento all'Ambulatorio Specialistico dell'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova dal 2019 a marzo 2022.

Grazie all'integrazione dei dati dell'Unità di Patologia Cardiovascolare, sono stati anche inclusi dati relativi a BEM di pazienti affetti da amiloidosi cardiaca effettuate tra il 2010 e il 2022 sempre presso questo centro.

Sono state effettuate due analisi separate:

- 1) Una valutazione clinico-strumentale per valutare i determinanti di danno miocardico dal punto di vista clinico ed ecocardiografico.
- 2) Valutazione istopatologica per correlare i reperti istologici con il danno miocardico espresso dall'incremento della troponina cardiaca e i parametri ecocardiografici.

4.2 Criteri di inclusione

Per l'analisi clinico strumentale, sono stati selezionati pazienti con amiloidosi AL o ATTR a coinvolgimento cardiaco secondo i seguenti criteri di inclusione:

- Disponibilità di una misurazione della troponina I o T (possibilmente ad alta sensibilità); per consistenza, le analisi sono state eseguite in base ai valori di hs-cTnI (forma dosata più frequentemente nel nostro centro).
- Disponibilità di un ecocardiogramma transtoracico il cui referto fosse prodotto o riportato all'interno del sistema informatico.

L'obiettivo è che queste analisi fossero state eseguite tutte in un intervallo di

tempo di circa tre mesi, il più possibile prossimi alla data di diagnosi. Si è fatto riferimento ai referti ufficiali ottenuti dal sistema informatico oppure ai referti cartacei presentati dai pazienti stessi nell'eventualità in cui avessero eseguito tali indagini in presso altri centri.

Per l'analisi istopatologica, sono stati inclusi i pazienti di cui fosse disponibile il campione della BEM presso il Nostro Istituto per le analisi dedicate.

4.3 Raccolta dati clinico-strumentali

Il primo database è quello clinico-strumentale ed è suddiviso nelle seguenti parti, di seguito descritte.

Dati anagrafici e caratteristiche base:

- età (anni),
- peso (kg),
- altezza (cm),
- data di diagnosi di amiloidosi (coincidente con la data della prima ecocardiografia suggestiva),
- tipo di amiloidosi riscontrata (AL, ATTRwt, ATTRv),
- classe NYHA, per la valutazione dello scompenso cardiaco (I-IV).

Comorbidità alla diagnosi:

- ipertensione arteriosa (sì/no),
- diabete mellito (sì/no),
- fibrillazione o flutter atriale (sì/no),
- coronaropatia critica (sì/no) o non critica (sì/no),
- eventuale impianto di pacemaker o defibrillatore impiantabile (ICD) (sì/no),
- precedente infarto miocardico (sì/no)
- Severa valvulopatia mitro-aortica (sì/no)

Terapia per scompenso cardiaco in atto al momento della diagnosi:

- beta-bloccanti (sì/no),
- diuretici dell'ansa (sì/no),
- ACE-inibitori (sì/no),
- bloccanti del recettore dell'angiotensina (ARBs) (sì/no),
- angiotensin receptor neprilysin inhibitor (ARNI) (sì/no),
- antagonisti dell'aldosterone (sì/no),
- anticoagulanti (antagonisti della vitamina K oppure nuovi anticoagulanti orali) (sì/no).

Dati di laboratorio (accompagnati dalla data di esecuzione):

- troponina I ad alta sensibilità o classica (ng/L),
- troponina T ad alta sensibilità o classica (ng/L),
- BNP (pg/mL),
- NT-proBNP (pg/L),
- emoglobina (g/L),
- creatinina (mg/dL),
- differenza tra catene leggere libere kappa e lambda, in particolare tra componente coinvolta e non coinvolta.
- proteinuria di Bence-Jones (sì e tipo/no).

Parametri di ecografia:

- pressione sistolica e diastolica all'esecuzione (mmHg),
- frequenza cardiaca al momento dell'esecuzione (bpm),
- spessore del setto interventricolare (mm),
- spessore della parete posteriore (mm),
- massa del ventricolo sinistro (g/m^2),
- volumi telesistolico e telediastolico del ventricolo sinistro (mL/m^2),
- volume sistolico dell'atrio sinistro (mL/m^2),
- frazione di eiezione (FE) (%),
- strain longitudinale globale (GLS) (%),

- TAPSE (mm, escursione sistolica del piano dell'anello tricuspide)
- velocità E ed A (m/s) valutate al profilo del flusso transmitralico (la velocità E rappresenta la velocità del flusso durante il riempimento rapido precoce del ventricolo sinistro, mentre la velocità A rappresenta la velocità del flusso durante il riempimento tardivo del ventricolo sinistro e corrisponde al momento del kick atriale)
- e' medial ed e' lateral, valutati con il doppler tissutale, come indice di rilassamento miocardico,
- rapporto E/e' , come indice indiretto delle pressioni di riempimento ventricolare sinistro,
- pressione nell'arteria polmonare stimata (mmHg), stimata attraverso la velocità massima di rigurgito tricuspide e la pressione in atrio destro,
- stroke volume (mL),
- indice cardiaco (mL/min).

4.4 Raccolta dati di patologia

Il secondo database conteneva i dati dei pazienti che hanno eseguito la BEM e, similmente al primo, include informazioni di laboratorio e di ecocardiografia, relative ad un intervallo di tempo il più possibile prossimo all'esecuzione della BEM stessa. I pazienti sottoposti a BEM con campione disponibile per la revisione sono stati individuati nell'archivio informatizzato dell'Unità di Patologia Cardiovascolare.

4.4.1 Processazione della BEM

I campioni di BEM del ventricolo destro sono stati ottenuti alla giunzione tra setto ventricolare e parete libera anteriore del ventricolo destro, attraverso la vena femorale, utilizzando la tecnica con biotomo a guaina lunga (*disposable Cordis bioptome*, Miami, FL, USA). I campioni bioptici sono stati fissati in formalina

tamponata al 10% (pH 7.35) e processati per l'esame istologico. Le sezioni incluse in paraffina di spessore 5 μm sono state sottoposte a tagli seriatati e colorazione con ematossilina-eosina e tricromica di Heidenhain. Quest'ultima rappresenta il metodo di colorazione di elezione per il tessuto connettivo (che risulta blu) ed è particolarmente indicato per evidenziare le fibre muscolari (che si colorano in rosso). Inoltre, è stata effettuata la colorazione rosso Congo per evidenziare la presenza di depositi di amiloide con la caratteristica birifrangenza a color verde mela, mediante microscopia ottica a luce polarizzata. Per l'analisi dell'infiammazione miocardica, la valutazione è stata effettuata con uso di immunistochemica (IHC) osservata al microscopio ottico. Sono stati applicati specifici anticorpi per gli antigeni dei linfociti T (anti-CD3, Novocastra, diluizione 1:50) e per gli antigeni macrofagici (anti-CD68, Dako, diluizione 1:50). Prima di utilizzare il primo anticorpo, l'immunoreattività è stata intensificata con trattamento a microonde (750 W, 5 minuti) in soluzione tamponata di citrato (10 mM, pH 6.0) e con trattamento di cottura a pressione (3 minuti) in soluzione tamponata di citrato. La positività della reazione antigene-anticorpo è stata testata con il metodo del complesso avidina-biotina perossidasi (Vector, Burlingame, California, USA).

4.4.2 Analisi morfometrica della BEM

I campioni di BEM sono stati sottoposti ad analisi istopatologica dettagliata per valutare le seguenti caratteristiche.

- Diametro dei cardiomiociti: per ogni caso è stato calcolato il diametro medio dei cardiomiociti ad un ingrandimento di 40x, su vetrini istologici colorati in ematossilina-eosina, acquisiti digitalmente e con l'utilizzo di un software commerciale (Image-Pro Plus Version 4.0, Media Cybernetics, MD, USA).
- Vacuolizzazione dei cardiomiociti: per ogni caso è stata valutata la presenza di vacuolizzazione cardiomiocitaria (definita come la dislocazione di elementi contrattili alla periferia dei miociti risultante in spazi otticamente chiari nel citoplasma dei cardiomiociti⁵⁵).

- Necrosi dei cardiomiociti: è stata effettuata una valutazione qualitativa riguardante la morte cellulare dei miociti qualora vi fosse evidenza di irregolarità della membrana, attenuazione delle miofibre o presenza di residui cellulari, in vetrini colorati in ematossilina-eosina.
- Quantità di amiloide: l'area corrispondente ai depositi di amiloide è stata calcolata con *score* quantitativo utilizzando un sistema di analisi digitale mediante software commerciale (v. sopra) come precedentemente descritto.⁵⁶ L'analisi è stata effettuata su vetrini colorati in colorazione tricromica e il risultato è stato espresso come percentuale di amiloide sul frammento che è risultato essere più colpito dai depositi di amiloide stessa.
- Localizzazione vascolare o peri-vascolare di amiloide: la presenza di depositi di amiloide nei vasi intramiocardici che erano inclusi nei frammenti di BEM è stata valutata in maniera qualitativa, in vetrini colorati in ematossilina-eosina.
- Fibrosi sostitutiva: l'area corrispondente all'eventuale fibrosi sostitutiva è stata calcolata con modalità quantitativa utilizzando un sistema di analisi digitale mediante software commerciale (v. sopra) come precedentemente descritto.⁵⁶ Il dato è stato espresso come percentuale di fibrosi sullo stesso frammento su cui è stata valutata la quantità di amiloide.
- Edema e infiammazione: la presenza di edema interstiziale e di *cluster* di cellule infiammatorie (linfociti, granulociti, macrofagi o plasmacellule) è stata valutata su vetrini colorati in ematossilina-eosina e il dato è stato reso in maniera qualitativa (presenza o assenza).
- Valutazione immunoistochimica (IHC): in aggiunta alla valutazione qualitativa delle cellule infiammatorie, la presenza di linfociti T e di macrofagi nei campioni di EMB è stata effettuata con analisi morfometrica delle cellule risultate positive alle colorazioni CD3 e CD68. In primo luogo, l'area del frammento più colpito è stata calcolata con il software precedentemente descritto, in mm². Successivamente, per ogni caso il numero di cellule positive in ciascun frammento è stata calcolata con la

funzione di “soglia per colore”. Infine, si è ottenuto il rapporto tra il numero di cellule CD3+ e CD68+ e l’area calcolata del frammento (il risultato finale è stato espresso in CD3+/mm² CD68+/mm²).

Due patologi cardiovascolari hanno effettuato le analisi non essendo a conoscenza dei dati clinici dei pazienti dello studio.

4.4.3 Tipizzazione dell’amiloide mediante immunoelettromicroscopia

La tipizzazione dell’amiloide è stata effettuata mediante immunoelettromicroscopia sul materiale fissato in formalina e incluso in paraffina, dopo dissoluzione di quest’ultima e inclusione in resina. Le sezioni selezionate sono state quindi processate per la post-inclusione come da procedura per *immunogold*, come precedente riportato.⁵⁷ Gli anticorpi primari utilizzati sono stati anti-catene leggere kappa umane, anti-catene leggere lambda umane, anti-TTR umana.

4.4 Analisi statistica

Le variabili categoriali sono presentate come numeri assoluti e percentuali (%) mentre le variabili continue sono presentate come mediane (con intervalli interquartili 25°-75°, 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. 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. Per valutare le correlazioni tra variabili continue, sono stati calcolati i valori r di Pearson. I dati sono stati analizzati utilizzando SPSS versione 27.0 (IBM). Per tutte le analisi statistiche, P <0.05 è stato considerato significativo.

5. Risultati

5.1 Caratteristiche della popolazione

La popolazione inizialmente considerata includeva 138 pazienti afferenti all'Ambulatorio Specialistico dell'Amiloidosi Cardiaca dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova, secondo i criteri di inclusione descritti nel capitolo 3. Successivamente sono stati esclusi 24 pazienti, per le cause indicate nella flowchart che segue.

La coorte finale per questa prima parte ha pertanto incluso 114 pazienti.

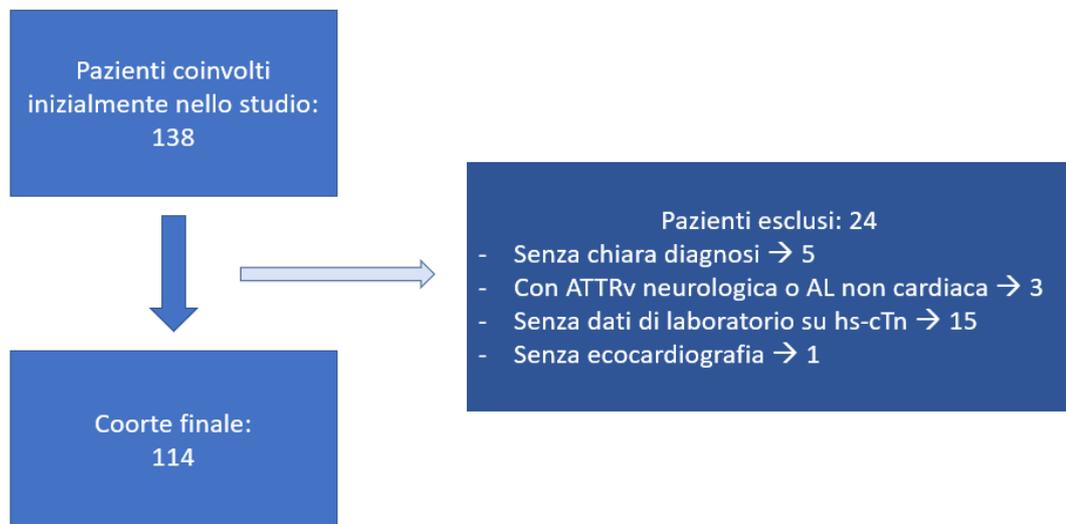


Fig. 12 – Flow-chart dello studio.

5.1.1 Caratteristiche generali

Nella tabella di seguito sono riportate le principali caratteristiche demografiche della popolazione in esame, quindi sesso, età alla diagnosi e proporzione di soggetti con ATTR ereditaria. Il totale dei pazienti è di 114 soggetti, di cui 67 (59%) con ATTR ereditaria. Il totale dei pazienti è di 114 soggetti, di cui 67 (59%) con ATTR-AC (wild type + mutata) e 47 (41%) con AL-AC. Tra i pazienti con ATTR-AC, il numero di quelli con ATTR-AC su base ereditaria è pari a 9 (13%). Per quanto

riguarda il sesso, la maggioranza di pazienti affetti da ATTR-AC sono maschi (n=64, 96%), mentre la percentuale di uomini scende al 60% (n=28) nel gruppo dei pazienti affetti da AL-AC, $p < 0.001$. L'età alla diagnosi è più alta nella forma ATTR (mediana 78 anni, IQR 72,82) che nella AL (mediana 64 anni, IQR 58, 75), con una differenza statisticamente significativa tra i due sottogruppi ($p < 0.001$).

Variabile	Overall N=114	ATTR (wt+v) N= 67	AL N= 47	P value
Sesso (M), n (%)	92 (81)	64 (96)	28 (60)	<0.001
Età alla diagnosi, mediana (IQR)	74 (66, 79)	78 (72, 82)	64 (58, 75)	<0.001
ATTR v, n (%)	9 (8)	9 (13)	NA	NA

Tab. I – In questa tabella sono riportate le caratteristiche generali dei pazienti. ATTRv: ATTR-AC variante. NA: non applicabile.

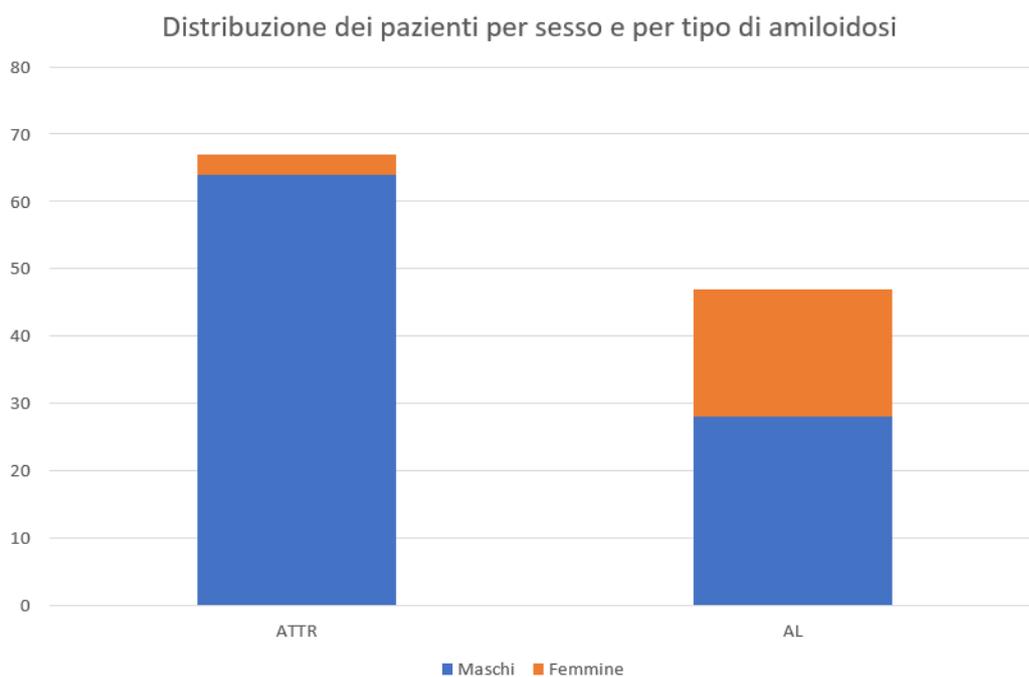


Fig. 13 – Nella figura viene illustrata la distribuzione dei pazienti di sesso maschile e di sesso femminile nelle due sottopopolazioni di studio.

5.1.2 Comorbidità

In questa tabella sono evidenziate le principali comorbidità dei pazienti analizzati nello studio. La classe NYHA era disponibile per 96 pazienti su 114 e 34 di essi (il 36%) riportava una classe NYHA superiore a 2; questo era più frequente nei pazienti con AL-AC rispetto a quelli con ATTR-AC (47% vs 29%) senza però raggiungere una differenza statisticamente significativa. L'ipertensione arteriosa era presente nel 56% dei pazienti, con una percentuale del 72% nei pazienti con ATTR-AC (48 su 67), e del 34% nei pazienti con AL-AC (16 su 47), $p < 0.001$. Il 12% del totale dei pazienti era stato sottoposto ad impianto di pacemaker o defibrillatore impiantabile, percentuale più alta nei pazienti con ATTR-AC (12 su 67, 18%) rispetto a quelli con AL-AC (2 su 47, 4.3%), $p = 0,029$. Aritmie come la fibrillazione atriale e il flutter atriale erano presenti nel 41% dei pazienti; anche qui la percentuale era superiore nei pazienti con forma ATTR (41 su 67, 61%) rispetto a quelli con forma AL (6 su 47, 13%), $p < 0.001$. La presenza di valvulopatia (aortica o mitralica) di grado moderato-severo è stata segnalata per il 10% dei pazienti con amiloidosi ATTR (7 su 67), mentre non è stata rilevata nei pazienti con forma AL, $p = 0.022$.

Variabile	Overall N=114	ATTR (wt+v) N=67	AL N=47	P value
NYHA >2, n (%)	34/94 (36)	17 (29)	17 (47)	0.079
Ipertensione arteriosa, n (%)	64 (56)	48 (72)	16 (34)	<0.001
Diabete mellito, n (%)	16 (14)	12 (18)	4 (8.5)	0.16
PM/ICD, n (%)	14 (12)	12 (18)	2 (4.3)	0.029
FA/flutter, n (%)	47 (41)	41 (61)	6 (13)	<0.001
CAD significativa, n (%)	18 (16)	14 (21)	4 (8.5)	0.074
Valvulopatia moderato-severa, n (%)	7 (6)	7 (10)	0 (0)	0.022

Tab. II – In questa tabella sono riportate le comorbidità dei pazienti dello studio, (PM = pace-maker, ICD = defibrillatore cardiaco impiantabile, FA = fibrillazione atriale, CAD = coronaropatia)

5.1.3 Terapia domiciliare

Nella tabella successiva si riportano i farmaci utilizzati dai pazienti relativi alla gestione clinica dello scompenso cardiaco. I beta-bloccanti venivano usati dal 55% dei pazienti con ATTR-AC (37 su 67), versus il 33% di quelli con AL-AC (15 su 47), $p=0.023$. La percentuale dei pazienti che assumevano farmaci appartenenti alle classi ACE-inibitori/ARB/ARNI era maggiore nei pazienti con ATTR-AC (33 su 67, 49%) rispetto a quelli con AL-AC (10 su 47, 22%), $p=0.04$. Il 69% del totale dei pazienti assumeva diuretici dell'ansa, senza differenze significative tra i due sottogruppi. Per quanto riguarda gli antagonisti dell'aldosterone, questi venivano assunti dal 30% dei pazienti, ma la percentuale era del 39% dei pazienti con ATTR-AC (26 su 67) e del 18% in quelli con AL-AC (8 su 47), $p=0.021$. Gli anticoagulanti (inibitori della vitamina K e nuovi anticoagulanti orali) erano assunti più frequentemente dai pazienti con ATTR-AC (39 su 67, 58%) rispetto a quelli con AL-AC (6 su 47, 13%), $p<0.001$.

Variabile	Overall N=114	ATTR (wt+v) N=67	AL N=47	P value
Beta-bloccanti, n (%)	52 (46)	37 (55)	15 (33)	0.023
ACE-inibitori /ARB/ARNI, n (%)	43 (38)	33 (49)	10 (22)	0.004
Diuretici dell'ansa, n (%)	78 (69)	47 (70)	31 (69)	0.89
Antagonisti dell'aldosterone, n (%)	34 (30)	26 (39)	8 (18)	0.021
Warfarin/DOAC, n (%)	45 (40)	39 (58)	6 (13)	<0.001

Tab. III – In questa tabella si possono osservare i farmaci assunti dai pazienti dello studio per la gestione dello scompenso cardiaco, (ARBs = bloccanti del recettore dell'angiotensina, ARNI = angiotensin receptor neprilysin inhibitor, DOAC = anticoagulanti orali ad azione diretta).

5.2 Caratteristiche ecocardiografiche

Nella seguente tabella sono riportati i dati relativi all'ecocardiogramma transtoracico per descrivere la struttura e la funzionalità sistolica e diastolica del cuore dei pazienti con AC. È emerso un aumento dello spessore del setto interventricolare superiore nei pazienti con ATTR-AC (mediana 18 mm, IQR 16,20) rispetto a quelli con AL-AC (mediana 15 mm, IQR 12,18), $p < 0.001$; similmente ciò avviene considerando lo spessore della parete posteriore, con mediana di 16 mm nei pazienti con ATTR-AC (IQR 14,17) e di 13 mm in quelli con AL-AC (IQR 12,16). La massa del ventricolo sinistro appare aumentata: nel gruppo dei pazienti con ATTR-AC la mediana è di 172 (IQR 147,204) gr/m^2 , mentre nel gruppo dei pazienti con AL-AC la mediana è 146 (IQR 119,172) gr/m^2 , $p < 0.001$. Il volume dell'atrio sinistro appare aumentato in entrambi i gruppi: nel gruppo dei pazienti con ATTR-AC, la mediana è 50 (IQR 44,61) ml/m^2 , mentre tra i pazienti con AL-AC la mediana è 38 (IQR 32,49) ml/m^2 , $p < 0.001$. L'ipertrofia del ventricolo destro risulta più frequente nei pazienti con ATTR-AC (52%) con una differenza rispetto ai pazienti con AL-AC (34%) al limite della significatività ($p = 0.054$).

Variabile	N disponibile	Overall	ATTR (wt+v) N= 67	AL N=47	P value
SIV mm, mediana (IQR)	66, 46	17 (15, 19)	18 (16, 20)	15 (12, 18)	<0.001
PP mm, mediana (IQR)	66, 46	15 (13, 17)	16 (14, 17)	13 (12, 16)	<0.001
VTDi ml/mq, mediana (IQR)	66, 47	55 (47, 65)	58 (47, 71)	54 (48, 60)	0.088
Massa VS gr/m2, mediana (IQR)	66, 46	157 (134,185)	172 (147, 204)	146 (119, 172)	<0.001
Volume atrio sin, ml/m2, mediana (IQR)	67, 46	46 (36, 57)	50 (44, 61)	38 (32, 49)	<0.001
FE del VS %, mediana (IQR)	66, 47	54 (46, 59)	52 (42, 60)	55 (50, 59)	0.18
E' m/s, mediana (IQR)	67, 44	0.9 (0.7, 1.06)	0.92 (0.78, 1.1)	0.89 (0.64, 1.04)	0.214
E/e' mediana (IQR)	59, 41	16 (12, 23)	15.5 (12.5, 20.2)	16.4 (10.6, 23.8)	0.98
GLS %, mediana (IQR)	44, 34	-12 (-14, -9)	-11.5 (-13, -7.2)	-13 (-15, -9)	0.059
PAPs mmHg, mediana (IQR)	60, 41	34 (27, 40)	35 (28, 44)	33 (26, 39)	0.12
TAPSE mm, mediana (IQR)	62, 42	18 (15, 21)	17 (14, 21)	19 (16, 21)	0.29
Ipertrofia VD (%)	67, 47	51 (45)	35 (52)	16 (34)	0.054

Tab IV – Nella tabella sono riportati i parametri dell'ecocardiografia transtoracica eseguita dai pazienti dello studio. (SIV = setto interventricolare, PP = parete posteriore, VTDi = volume del ventricolo destro indicizzato, VS = ventricolo sinistro, FE = frazione di eiezione, GLS = strain longitudinale globale, PAPs = pressione in arteria polmonare stimata, TAPSE = tricuspide annular plane excursion, VD = ventricolo destro).

5.3 Caratteristiche di laboratorio

Nella tabella V sono riportate le principali caratteristiche di laboratorio nelle due sottopopolazioni. Si può notare come i valori di hs-cTnI siano simili nelle due sottopopolazioni: nel sottogruppo dei pazienti con ATTR-AC la mediana era 88 (IQR 38,170) ng/L, mentre nel sottogruppo dei pazienti con AL-AC era 64 (IQR 24,173) ng/L, $p=0.24$. I valori di BNP ed NT-pro BNP erano tendenzialmente

maggiori nei pazienti con AL-AC, senza però raggiungere differenze statisticamente significative. In merito all'emoglobina, pazienti con AL-AC presentavano valori di emoglobina più bassi (mediana 132 g/L, IQR 115,146) rispetto ai pazienti affetti da ATTR-AC (mediana 139 g/L, IQR 128,153), con $p=0.019$.

Variabile	N disponibile	Overall	ATTR (wt+v) N= 67	AL N=47	P value
Hs-cTnI ng/L, mediana (IQR)	108	77 (33, 169)	88 (38, 170)	64 (24, 173)	0.24
Hs-cTnT ng/L, mediana (IQR)	6	52 (46, 81)	55 (48, 92)	41	NA
BNP, ng/L, mediana (IQR)	42	374 (195, 861)	342 (192, 711)	653 (168, 2262)	0.49
NT-proBNP, ng/L, mediana (IQR)	77	3161 (984, 6383)	2907 (1120, 5511)	3896 (939, 8578)	0.55
Emoglobina g/L, mediana (IQR)	108	137 (121, 150)	139 (128, 153)	132 (115, 146)	0.019
Creatinina mg/dL, mediana (IQR)	105	1.08 (0.89, 1.34)	1.15 (0.89, 1.33)	1.05 (0.88, 1.44)	0.82
dFLC mg/L, mediana (IQR)	46	141 (43, 458)	NA	141 (43, 458)	NA

Tab. V – Nella tabella sopra riportata si possono osservare i dati di laboratorio dei pazienti dello studio, comprensivi di hs-cTnI, hs-cTnT, BNP, NT-proBNP, emoglobina, creatinina, dFLC (differenza tra le catene leggere libere di tipo kappa o lambda), secondo valore mediano e intervallo interquartile.

5.4 Caratteristiche clinico-strumentali in base ai valori di hs-cTnI nei pazienti con ATTR-AC

Di seguito sono riportati i dati clinico strumentali confrontando i pazienti con ATTR-AC con hs-cTnI inferiore o superiore al valore mediano di questa sottopopolazione, pari a 88 ng/L.

5.4.1 Differenze cliniche

L'unica differenza statisticamente significativa è stata riscontrata in merito all'età di diagnosi dei pazienti, più alta nei pazienti con hs-cTnI sopra la mediana (81 anni, IQR 73,83), rispetto ai pazienti con hs-cTnI sotto la mediana (74 anni, IQR 70,80), $p=0.024$. Non sono emerse differenze statisticamente significative in merito alla classe NYHA e alle comorbidità anche se queste erano tendenzialmente più frequenti nel gruppo con $hs-cTnI > 88$ ng/L.

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI ≤ mediana N=31	Hs-cTnI > mediana N=31	P value
Età alla diagnosi, mediana (IQR)	62	74 (70, 80)	81 (73, 83)	0.024
ATTR v, n (%)	62	6 (19)	3 (9.7)	0.47
NYHA >2, n (%)	53	6 (23)	10 (37)	0.27
Ipertensione arteriosa, n (%)	62	20 (64)	24 (77)	0.26
Diabete mellito, n (%)	62	5 (16)	6 (19)	0.74
PM/ICD, n (%)	62	4 (13)	7 (23)	0.32
FA/flutter, n (%)	62	18 (58)	20 (65)	0.60
CAD significativa, n (%)	62	6 (19)	8 (26)	0.54
Valvulopatia moderato-severa, n (%)	62	1 (3.2)	5 (16)	0.20

Tab. VI – In questa tabella sono raccolti i dati in merito alle differenze tra le caratteristiche generali e le comorbidità presenti nei pazienti del sottogruppo dell'amiloidosi da transtiretina, suddivisi a seconda che riportassero un valore di hs-cTnI superiore o inferiore a quello mediano (pari a 88 ng/L); (PM = pacemaker, ICD = defibrillatore cardiaco impiantabile, FA = fibrillazione atriale, CAD = coronaropatia).

5.4.2 Differenze nella terapia

Nella tabella VII si nota che, tra i pazienti con hs-cTnI superiore alla mediana, l'utilizzo di diuretici dell'ansa è più frequente (26 su 31, 84%) rispetto a coloro con hs-cTnI inferiore alla mediana (18 su 31, 58%), $p=0.025$.

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI ≤ mediana N=31	Hs-cTnI > mediana N=31	P value
Beta bloccanti, n (%)	62	18 (58)	17 (55)	0.80
Ace-inibitori-ARB- ARNI, n (%)	62	14 (45)	15 (48)	0.80
Diuretici dell'ansa, n (%)	62	18 (58)	26 (84)	0.025
Antagonisti dell'aldosterone, n (%)	62	12 (39)	13 (42)	0.80
Warfarin/DOAC, n (%)	62	19 (61)	17 (55)	0.61

Tab. VII – In questa tabella sono riportati i dati inerenti la terapia domiciliare dello scompenso cardiaco nei pazienti con ATTR-AC, suddivisi a seconda del valore mediano della hs-cTnI, (ARBs = bloccanti del recettore dell'angiotensina, ARNI = angiotensin receptor neprilysin inhibitor, DOAC = anticoagulanti orali ad azione diretta).

5.4.3 Differenze all'ecocardiografia

Per quanto riguarda i parametri di ecocardiografia, è emerso che il volume telediastolico è maggiore nei pazienti con valore di hs-cTnI sopra il valore mediano (63 mL/m², IQR 50,73) rispetto ai pazienti con valore di hs-cTnI sotto il valore mediano (54 mL/m², IQR 42,67), p=0.047. Anche la massa del ventricolo sinistro indicizzata è significativamente più alta nei pazienti con valore di hs-cTnI sopra la mediana (181 g/m², IQR 167,228), rispetto a quelli con hs-cTnI sotto la mediana (152 g/m², IQR 138,196), p=0.002. Il volume dell'atrio sinistro indicizzato riporta valori maggiori nel gruppo con hs-cTnI sopra la mediana (56, IQR 45,65), rispetto a quello con hs-cTnI sotto la mediana (48, IQR 35,53), p=0.008. Il valore di E/e' nel gruppo dei pazienti con hs-cTnI superiore alla mediana è 18.6 (IQR 13.8,23.3), mentre nel gruppo con hs-cTnI inferiore alla mediana è 14.8 (IQR 11,18.5), p=0.029. Lo strain longitudinale globale è maggiormente preservato nei pazienti con hs-cTnI più bassa (-12, IQR -13,-11) rispetto a quelli con hs-cTnI maggiore alla mediana (-9, IQR -13,-6), p=0.031. La pressione in arteria polmonare è maggiore nei pazienti con hs-cTnI oltre la mediana (39 mmHg, IQR 28,48) rispetto a quelli

con hs-cTnI inferiore alla mediana (32, IQR 27,37), p=0.024. Il TAPSE è più basso nel gruppo con hs-cTnI sopra la mediana (15 mm, IQR 12,19) rispetto al gruppo con hs-cTnI sotto la mediana (19 mm, IQR 15,22), p=0.037.

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI ≤ mediana N=31	Hs-cTnI > mediana N=31	P value
SIV mm, mediana (IQR)	61	18 (16, 20)	18 (16, 20)	0.82
PP mm, mediana (IQR)	61	15 (14, 17)	16 (15, 18)	0.081
VTDi ml/mq, mediana (IQR)	62	54 (42, 67)	63 (50, 73)	0.047
LV mass index gr/m ² , mediana (IQR)	61	152 (138, 196)	181 (167, 228)	0.002
Atrio sin volume index, mediana (IQR)	62	48 (35, 53)	56 (45, 65)	0.008
LVEF %, mediana (IQR)	62	54 (46, 60)	48 (38, 60)	0.12
E/e' mediana (IQR)	55	14.8 (11, 18.5)	18.6 (13.8, 23.3)	0.029
GLS %, mediana (IQR)	41	-12 (-13, -11)	-9 (-13, -6)	0.031
PAPs mmHg, mediana (IQR)	56	32 (27, 37)	39 (28, 48)	0.024
TAPSE mm, mediana (IQR)	57	19 (15, 22)	15 (12, 19)	0.037
Ipertrofia Vdx (%)	62	18 (58)	16 (52)	0.61

Tab. VIII – Nella tabella sono riportati i valori rispettivi all'ecocardiografia transtoracica nei pazienti del sottogruppo dell'amiloidosi da transtiretina, suddivisi a seconda che riportassero un valore di hs-cTnI superiore o inferiore a quello mediano, (SIV = setto interventricolare, PP = parete posteriore, VTDi = volume del ventricolo destro indicizzato, VS = ventricolo sinistro, FE = frazione di eiezione, GLS = strain longitudinale globale, PAPs = pressione in arteria polmonare stimata, TAPSE = tricuspid annular plane excursion, VD = ventricolo destro).

5.4.4 Differenze nel laboratorio

I biomarcatori cardiaci BNP ed NT-proBNP sono entrambi significativamente più alti nel gruppo di pazienti con hs-cTnI sopra il valore mediano. Il BNP nel gruppo con hs-cTnI sopra la mediana ha mediana 658 (IQR 408,1446), mentre nel gruppo con hs-cTnI inferiore o uguale alla mediana ha mediana 206 (IQR 120, 335),

p<0.001. L'NT-proBNP nel gruppo con hs-cTnI sopra la mediana risulta avere mediana 4437 (IQR 2819,10338), mentre nel gruppo di pazienti con hs-cTnI inferiore o uguale alla mediana ha mediana 1441 (IQR 744,3373), p=0.003. La creatinina nel gruppo con hs-cTnI sopra la mediana ha mediana 1.31 (IQR 1.03,1.47), mentre nel gruppo con hs-cTnI inferiore o uguale alla mediana ha mediana 0.99 (IQR 0.86,1.25), p=0.022.

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI ≤ mediana N=31	Hs-cTnI > mediana N=31	P value
BNP ng/L	33	206 (120, 335)	658 (408, 1446)	<0.001
NT-proBNP ng/L	32	1441 (744, 3373)	4437 (2819, 10338)	0.003
Emoglobina g/L	57	141.5 (133.5, 154)	137 (125, 152)	0.32
Creatinina	55	0.99 (0.86, 1.25)	1.31 (1.03, 1.47)	0.022

Tab. IX – Nella tabella si possono osservare i dati di laboratorio del sottogruppo dei pazienti affetti da amiloidosi da transtiretina, suddivisi a seconda del valore mediano di hs-cTnI.

5.4.5 Follow-up e outcome

Il follow-up dei pazienti con amiloidosi ATTR è stato proseguito per una mediana di 11 mesi (5, 22). Durante tale periodo, tra i pazienti con troponina sotto la mediana, la mortalità è stata del 6.5%, mentre tra quelli con la troponina sopra la mediana, è stata del 26%, p=0.038.

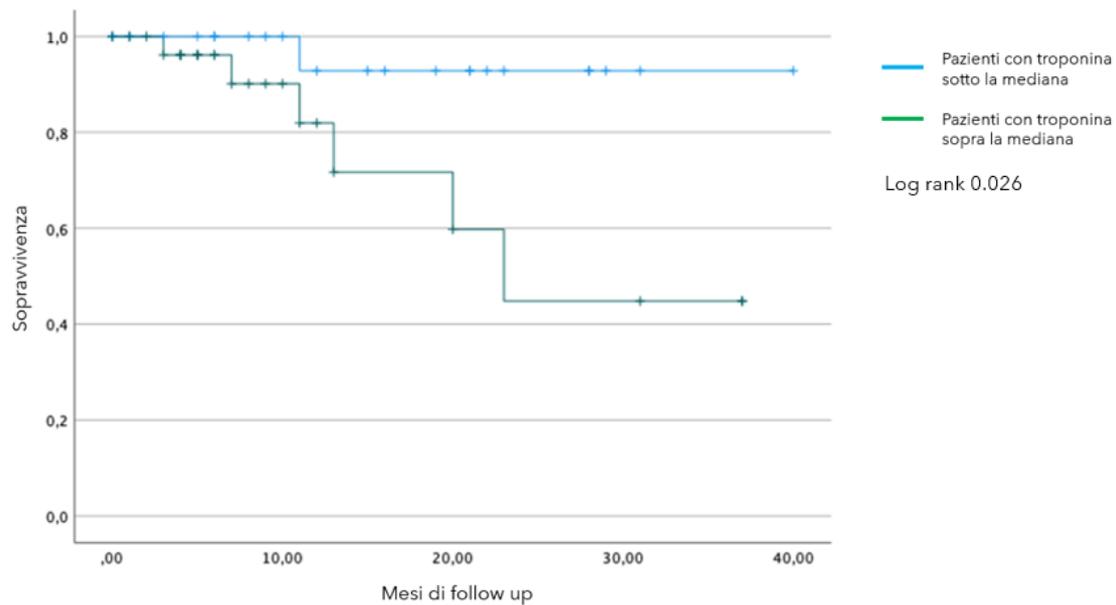


Fig. 14 – Nella figura sono visibili le curve di Kaplan-Meier relative alla sopravvivenza dei pazienti affetti da amiloidosi ATTR. La curva blu rappresenta i pazienti con hs-cTnI inferiore al valore mediano, mentre la curva verde rappresenta i pazienti con la troponina superiore al valore mediano (88 ng/L). Log rank 0.026.

5.5 Caratteristiche clinico-strumentali in base ai valori di hs-cTnI nei pazienti con amiloidosi AL

Di seguito sono riportati i dati clinico strumentali confrontando i pazienti con amiloidosi cardiaca da catene leggere (AL) con hs-cTnI inferiore o superiore al valore mediano di questa sottopopolazione, pari a 64 ng/L.

5.5.1 Differenze cliniche

I pazienti con AL-AC con valori di hs-cTnI erano 46. Non sono emerse differenze statisticamente significative tra il gruppo con hs-cTnI sotto e sopra la mediana in relazione alle caratteristiche di base e alle comorbidità.

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI \leq mediana	Hs-cTnI $>$ mediana	P value
Età alla diagnosi, mediana (IQR)	46	64 (58, 75)	65 (58, 74)	0.85
NYHA >2 , n (%)	35	7 (39)	9 (53)	0.40
Iperensione arteriosa, n (%)	46	9 (39)	6 (26)	0.35
Diabete mellito, n (%)	46	4 (17)	0 (0)	0.11
PM/ICD, n (%)	46	1 (4.3)	1 (4.3)	1.00
FA/flutter, n (%)	46	3 (13)	2 (9)	1.00
CAD significativa, n (%)	46	2 (8.7)	2 (8.7)	1.00

Tab. X – In questa tabella sono raccolti i dati in merito alle differenze tra le caratteristiche generali e le comorbidità presenti nei pazienti del sottogruppo dell'amiloidosi da catene leggere, suddivisi a seconda che riportassero un valore di hs-cTnI superiore o inferiore a quello mediano (pari a 64 ng/L); (PM = pacemaker, ICD = defibrillatore cardiaco impiantabile, FA = fibrillazione atriale, CAD = coronaropatia).

5.5.2 Differenze nella terapia

Per quanto riguarda la terapia, si è visto che il gruppo con valori di hs-cTnI sopra la mediana riferiva un utilizzo di diuretici nell' 87% dei casi rispetto al gruppo con hs-cTnI sotto la mediana, la cui percentuale di utilizzo era del 48%, $p=0.005$. Anche gli antagonisti dell'aldosterone erano più spesso utilizzati nei pazienti con hs-cTnI oltre la soglia (32%) rispetto a quelli con hs-cTnI sotto la soglia (4.8%), $p=0.046$.

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI ≤ mediana	Hs-cTnI > mediana	P value
Beta bloccanti, n (%)	46	5 (23)	9 (39)	0.28
Ace-inibitori- ARB-ARNI, n (%)	46	4 (19)	5 (22)	1.00
Diuretici dell'ansa, n (%)	46	10 (48)	20 (87)	0.005
Antagonisti dell'aldosterone, n (%)	46	1 (4.8)	7 (32)	0.046
Warfarin/DOAC, n (%)	46	3 (14)	3 (13)	1.00

Tab. XI - In questa tabella sono riportati i dati inerenti la terapia domiciliare dello scompenso cardiaco nei pazienti con amiloidosi AL, suddivisi a seconda del valore mediano della ha-cTnI; (ARBs = bloccanti del recettore dell'angiotensina, ARNI = angiotensin receptor neprilysin inhibitor, DOAC = anticoagulanti orali ad azione diretta).

5.5.3 Differenze all'ecocardiografia

All'ecocardiografia, i pazienti con valori di hs-cTnI sopra la mediana mostravano un maggiore aumento degli spessori del setto interventricolare (15 mm, IQR 14,18 vs 13.5, IQR 11,118, p=0.029) e della parete posteriore (15 mm, IQR 13,17 vs 12.5, IQR 11,13.25, p=0.008). Lo strain longitudinale globale (GLS) appariva maggiormente conservato nei pazienti con valori di hs-cTnI inferiori alla mediana (-14, IQR -15,-7.6 vs -11, IQR -17,-11, p=0.025). Infine, l'ipertrofia del ventricolo destro appare con frequenza maggiore in presenza di valori di hs-cTnI maggiori alla mediana (52% vs 17%, p=0.013).

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI \leq mediana	Hs-cTnI $>$ mediana	P value
SIV mm, mediana (IQR)	45	13.5 (11, 18)	15 (14, 18)	0.029
PP mm, mediana (IQR)	45	12.5 (11, 13.25)	15 (13, 17)	0.008
VTDi ml/mq, mediana (IQR)	46	53 (44, 60)	54 (48, 60)	0.83
LV mass index gr/m ² , mediana (IQR)	45	134 (115, 152)	151 (123, 172)	0.13
Atrio sin volume index, mediana (IQR)	45	38 (32, 47)	40 (31, 48)	0.93
LVEF %, mediana (IQR)	46	55 (51, 60)	54 (48, 57)	0.26
E/e' mediana (IQR)	40	14 (9.5, 23)	19 (15, 26)	0.11
GLS %, mediana (IQR)	34	-14 (-17, -11)	-11 (-15, -7.6)	0.025
PAPs mmHg, mediana (IQR)	40	31 (26, 37)	33 (24, 40)	0.73
TAPSE mm, mediana (IQR)	41	19 (18, 22)	17 (12, 20)	0.11
Ipertrofia Vdx (%)	46	4 (17)	12 (52)	0.013

Tab. XII - Nella tabella sono riportati i valori rispettivi all'ecocardiografia transtoracica nei pazienti del sottogruppo dell'amiloidosi da catene leggere, suddivisi a seconda che riportassero un valore di hs-cTnI superiore o inferiore a quello mediano; (SIV = setto interventricolare, PP = parete posteriore, VTDi = volume del ventricolo destro indicizzato, VS = ventricolo sinistro, FE = frazione di eiezione, GLS = strain longitudinale globale, PAPs = pressione in arteria polmonare stimata, TAPSE = tricuspid annular plane excursion, VD = ventricolo destro).

5.5.4 Differenze nel laboratorio

Osservando i biomarcatori cardiaci, è emerso come i pazienti con hs-cTnI > 64 ng/L mostrassero un più accentuato aumento del NT-proBNP (4924, IQR 3030,10723, p=0.010). I valori oltre la mediana di hs-cTnI sono stati associati inoltre a valori più elevati di creatinina (1.22 mg/dL, IQR 1.03,1.68 vs 0.93, IQR 0.93 mg/dL, IQR 0.84,1.06, p=0.047).

Variabile	N disponibile	Hs-cTnI ≤ mediana	Hs-cTnI > mediana	P value
BNP ng/L	9	182 (72, 553)	1900 (705, 3122)	0.063
NT-proBNP ng/L	40	1244 (609, 4867)	4924 (3030, 10723)	0.010
Emoglobina g/L	46	124 (115, 150)	134 (118, 145)	0.46
Creatinina mg/dL	45	0.93 (0.84, 1.06)	1.22 (1.03, 1.68)	0.047
dFLC	46	70 (24, 387)	227 (78, 486)	0.11

Tab. XIII - Nella tabella si possono osservare i dati di laboratorio del sottogruppo dei pazienti affetti da amiloidosi AL, suddivisi a seconda del valore mediano di hs-cTnI. (dFLC = differenza fra le catene leggere di tipo kappa e lambda).

5.5.5 Follow-up e outcome

Qui di seguito si possono osservare le curve di Kaplan-Meier per quanto riguarda la sopravvivenza dei pazienti con AL distribuiti secondo valori più alti e più bassi di hs-cTnI rispetto alla mediana. Durante il follow-up di mediana di 18 mesi (intervallo interquartile 6, 49 mesi), si è visto che il tasso di mortalità è stato del 22% nei pazienti con hs-cTnI sotto la mediana e del 35% nel gruppo con hs-cTnI sopra la mediana.

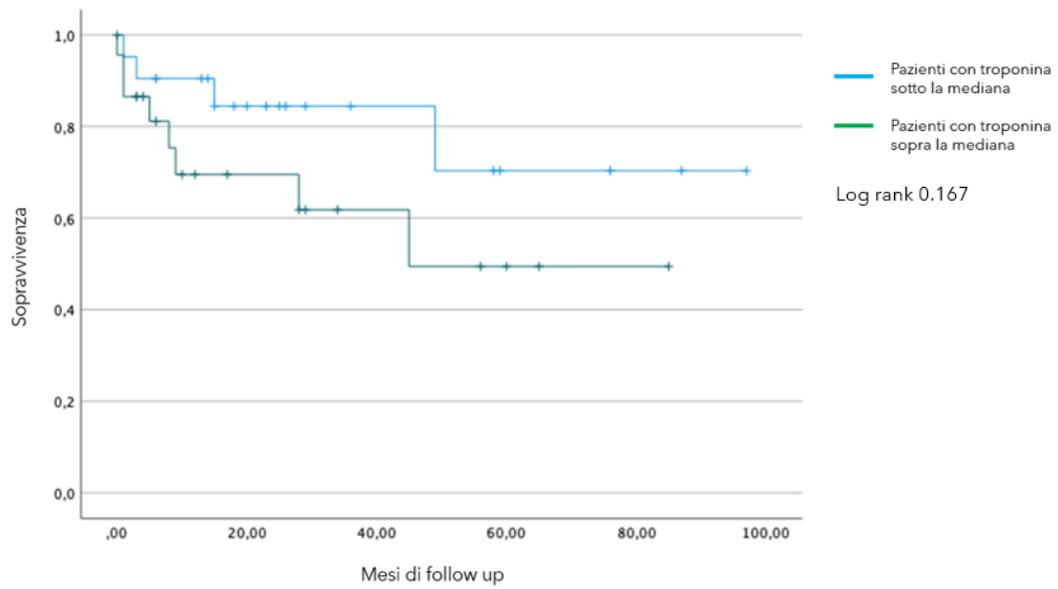


Fig. 15 - Nella figura sono visibili le curve di Kaplan-Meier relative alla sopravvivenza dei pazienti affetti da amiloidosi AL. La curva blu rappresenta i pazienti con hs-cTnI inferiore al valore mediano, mentre la curva verde rappresenta i pazienti con la troponina superiore al valore mediano (64 ng/L). Log rank 0.167.

5.6 Valutazione istopatologica

5.6.1 Analisi delle biopsie endomiocardiche (BEM)

L'analisi istopatologica è stata effettuata su 40 campioni di BEM ottenuti dalla UOC di Cardiologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. I risultati sono riportati in tabella XIV. L'età media di realizzazione della BEM era di 67.2 anni (range 45,81). La tipizzazione dell'amiloide ha riscontrato amiloidosi AL di tipo lambda nel 35% dei pazienti, di tipo kappa nel 30% e amiloidosi ATTR nel restante 35%. Il diametro dei cardiomiociti è risultato essere di 18.1 micrometri (range 13.6,24.9).

Nell'intera popolazione, la vacuolizzazione è stata descritta come una caratteristica comune (60%) mentre la necrosi è stata riscontrata solo in due casi (5%). La percentuale di amiloide media nei campioni esaminati è risultata pari al 25.9% (range 3% – 85%), senza una differenza statisticamente significativa tra AL-AC e ATTR-AC. Il coinvolgimento perivascolare da parte dei depositi di amiloide è stato dimostrato nella metà dei casi (50%) ed è risultato più frequente nei pazienti con amiloidosi AL [4 (29%) vs 16 (62%), $p=0.047$]. La percentuale di fibrosi è risultata in media pari al 3.9% (range 0% - 30%). L'edema e l'infiammazione sono stati rinvenuti rispettivamente nel 7.5% e 2.5% dei casi. All'analisi IHC, la presenza media di cellule infiammatorie è risultata essere 9.5% cellule CD3+ per mm^2 (range 0-32.1) e 21.4% cellule CD68+ per mm^2 (range 7.1 – 45.2).

	Popolazione (N=40)
Età alla EMB	
Media (SD)	67.2 (10)
Range	45 - 81
Tipizzazione dell'amiloide, N (%)	
AL-lambda	14 (35%)
AL-kappa	12 (30%)
ATTR	14 (35%)
Diametro dei cardiomiociti μm, N (%)	
Media (SD)	18.1 (2.6)
Range	13.6 – 24.9
Vacuolizzazione, N (%)	24 (60%)
Necrosi, N (%)	2 (5%)
Quantità di amiloide %	
Media (SD)	25.9 (22.6)
Range	3 - 85
Coinvolgimento perivascolare N (%)	20 (50%)
Fibrosi %	
Media (SD)	3.9 (7.2)
Range	0 - 30
Fibrosi, N (%)	16 (40)
Edema, N (%)	3 (7.5%)
Infiammazione, N (%)	1 (2.5%)
CD3+/mm²	
Media (SD)	9.5 (6.4)
Range	0.0 – 32.1
CD68+/mm²	
Media (SD)	21.4 (10.7)
Range	7.1 – 45.2

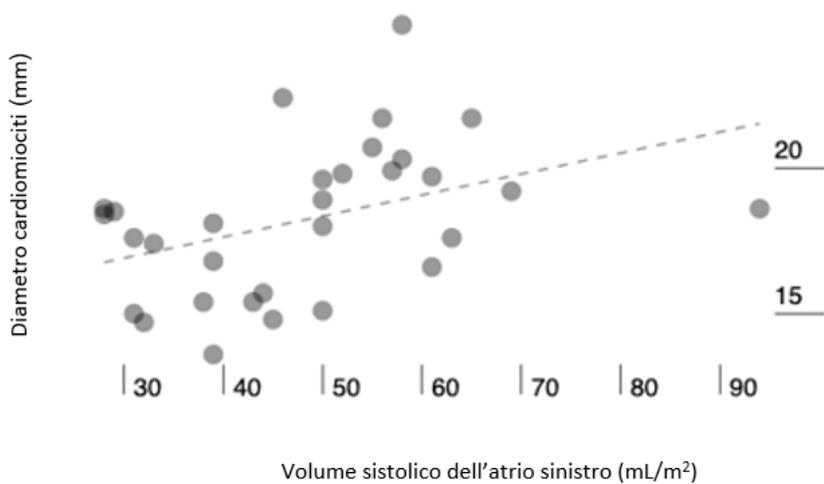
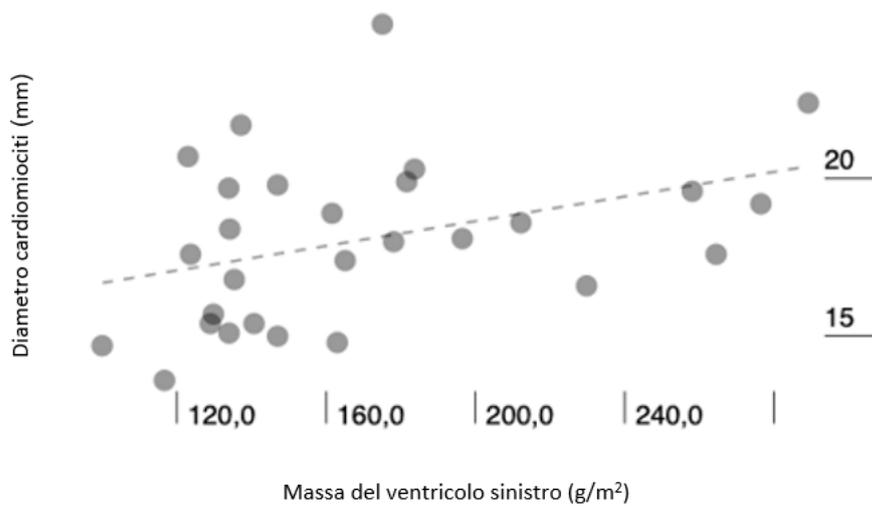
Tab. XIV – Nella tabella sono riportati i risultati in merito all'analisi tissutale dei campioni di BEM.

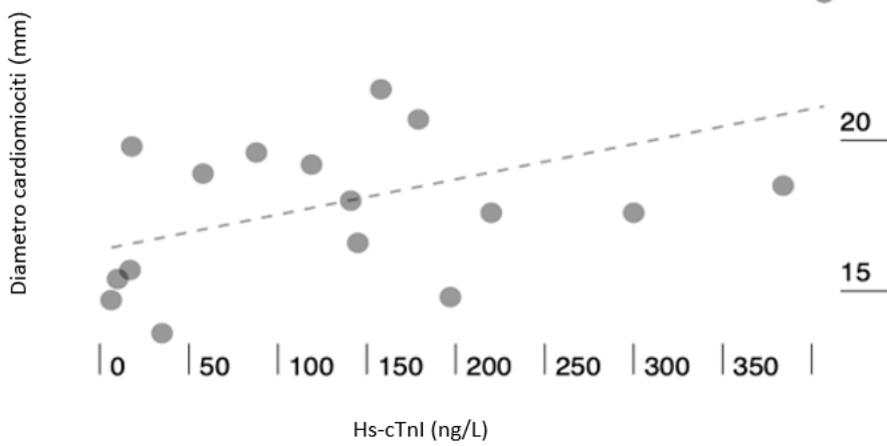
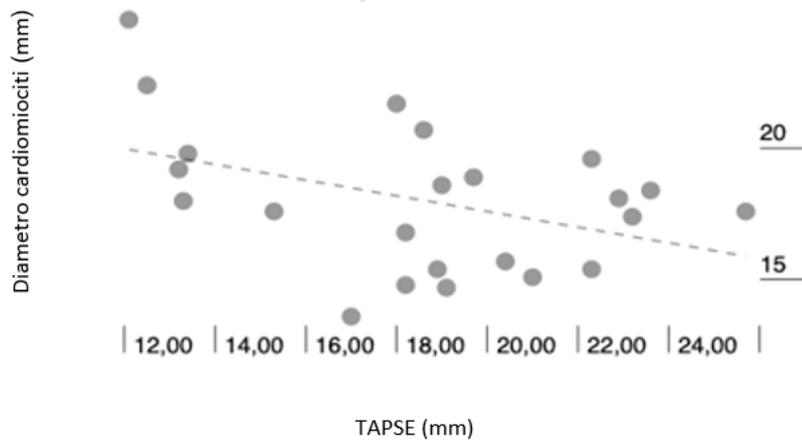
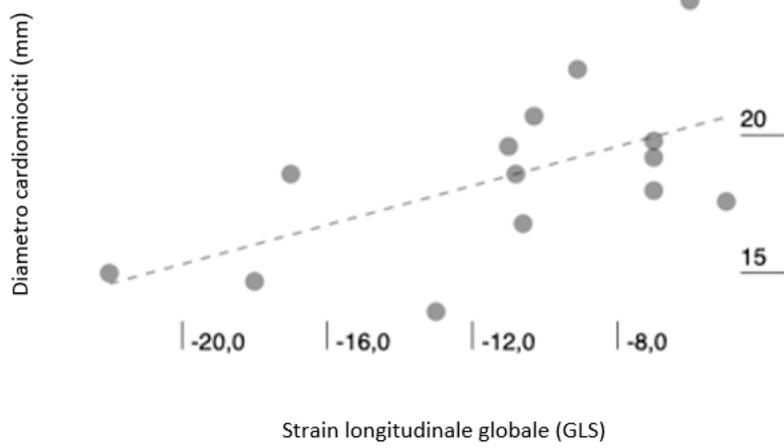
5.6.2 Correlazioni tra dati istologici, ecocardiografici e biumorali

Si è notata una correlazione significativa positiva tra il diametro dei cardiomiociti e la massa del ventricolo sinistro ($R\ 0.383$, $p=0.044$), con il volume dell'atrio sinistro ($R\ 0.407$, $p=0.023$), con un GLS maggiormente alterato ($R\ 0.587$, $p=0.027$) e con la hs-cTnI ($R\ 0.514$, $p=0.035$). È stata riscontrata una correlazione negativa

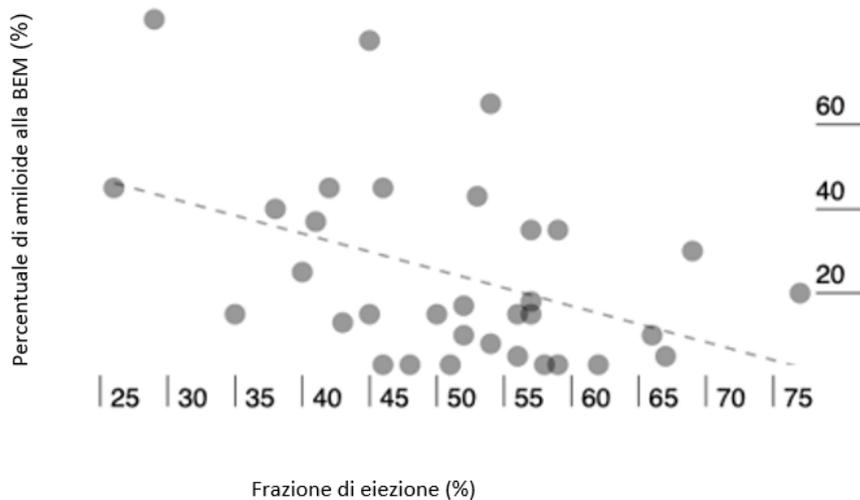
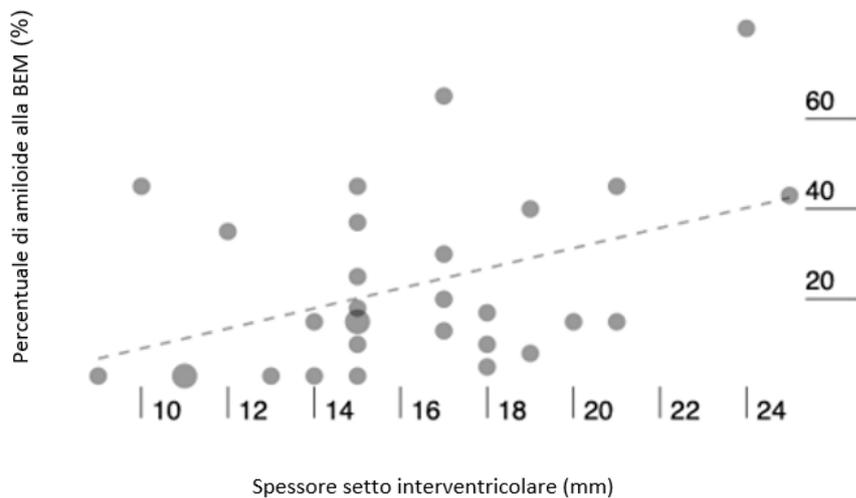
significativa con il TAPSE ($R -0.421$, $p=0.045$). Non è stata evidenziata una correlazione con la frazione di eiezione, con l'ipertrofia del ventricolo destro e con NT-proBNP.

Fig. 16 - Nelle figure sottostanti sono riportati i grafici delle correlazioni tra il diametro dei cardiomiociti e la massa del ventricolo sinistro, il volume dell'atrio sinistro, lo strain longitudinale globale (GLS), il TAPSE e la hs-cTnI.





La percentuale di amiloide ha mostrato correlazioni significative con il diametro del setto interventricolare in tutti i pazienti ($R\ 0.429$, $p=0.018$) e nei pazienti con AL-AC ($R\ 0.495$, $p=0.037$), con la massa del ventricolo sinistro ma solo nei pazienti con AL-AC ($R\ 0.633$, $p=0.006$), con la hs-cTnI in tutti i pazienti ($R\ 0.537$, $p=0.026$) e in quelli con AL-AC ($R\ 0.654$, $p=0.040$). È emersa una correlazione negativa tra percentuale di amiloide e frazione di eiezione del ventricolo sinistro in tutti i pazienti ($R\ -0.460$, $p=0.007$) e nei pazienti con amiloidosi AL-AC ($R\ -0.614$, $p=0.003$), con il TAPSE solamente nei pazienti con amiloidosi ATTR-AC ($R\ -0.750$, $p=0.020$)



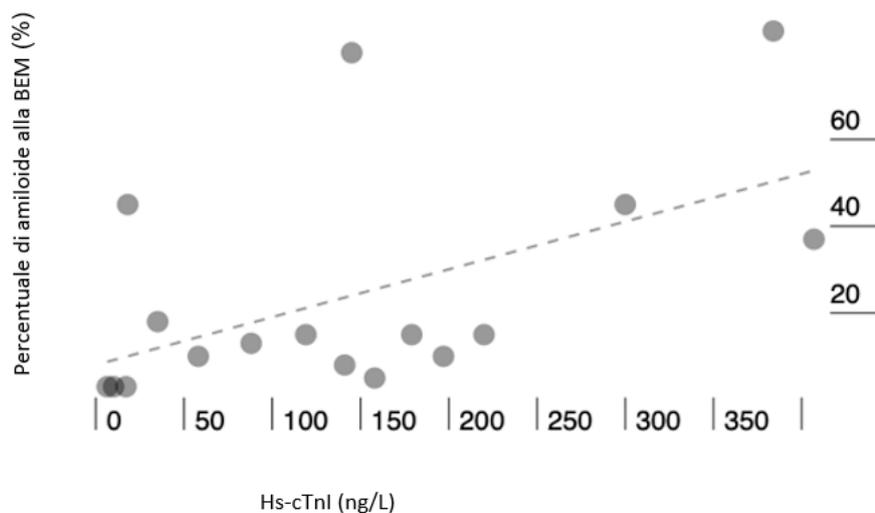
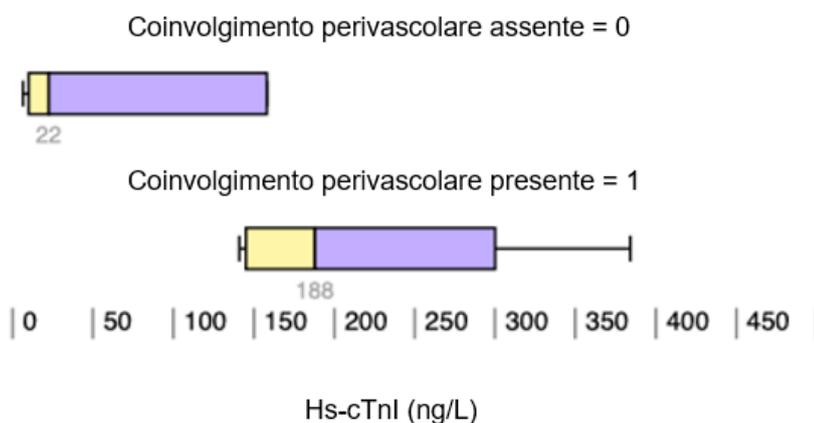
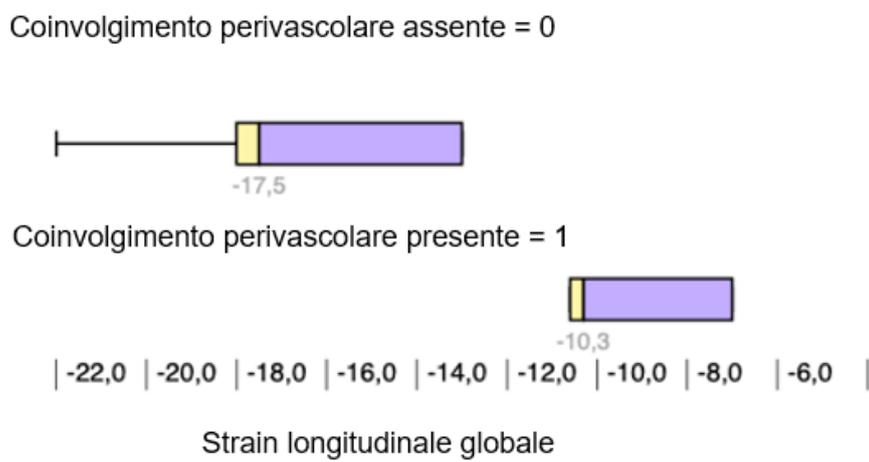
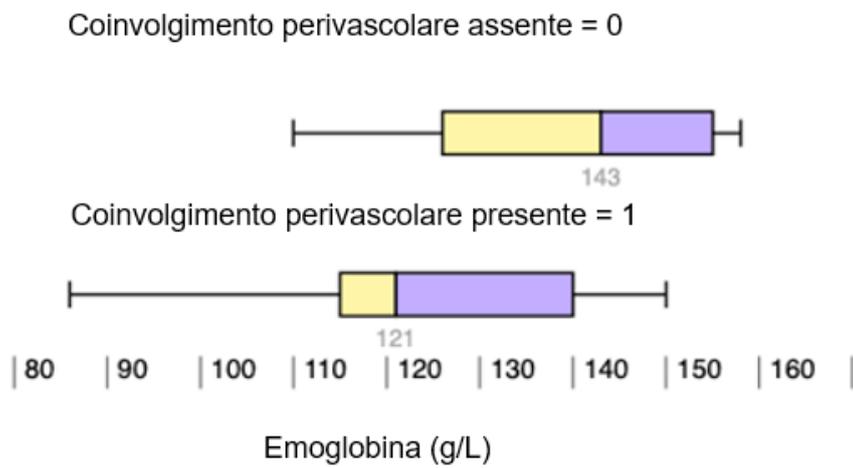
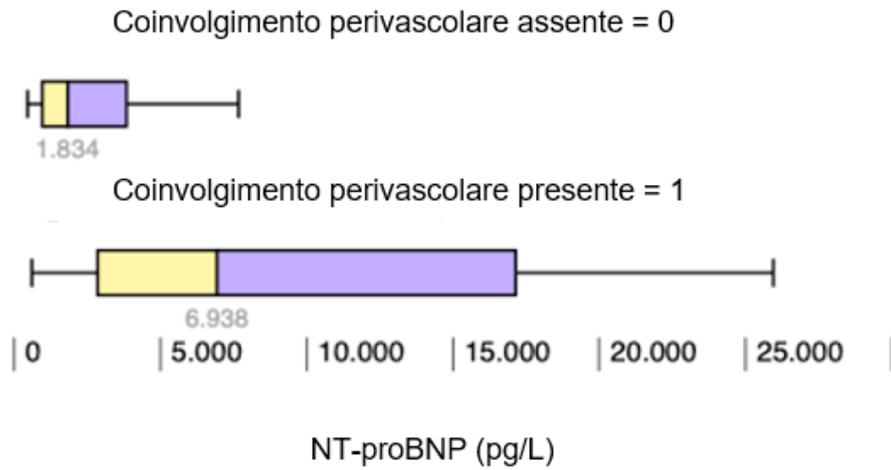


Fig. 17 – Nelle figure soprastanti sono riportati i grafici in cui viene illustrato il rapporto tra la percentuale di amiloide e lo spessore del setto interventricolare, la frazione di eiezione e la hs-cTnI.

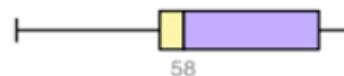
Nei pazienti affetti da AL-AC, coloro che presentavano coinvolgimento perivascolare mostravano valori maggiori di hs-cTnI [23 (7, 127) ng/L vs 188 (144, 321) ng/L, $p=0.038$] e di NT-proBNP [1834 (966, 3848) ng/L vs 6938 (2809, 16560) ng/L, $p=0.045$] e valori inferiori di emoglobina [143 (126, 156) g/L versus 121 (114, 138) g/L, $p=0.014$], di GLS [-17.5 (-20, -15) vs -10.3 (-10.5, -8.6), $p=0.05$] e della frazione di eiezione ventricolare sinistra [59 (53, 66) vs 54 (41, 57), $p=0.025$].

I dati inerenti la presenza di vacuolizzazione, di fibrosi e la percentuale di fibrosi non hanno mostrato correlazioni statisticamente significative.





Coinvolgimento perivascolare assente = 0



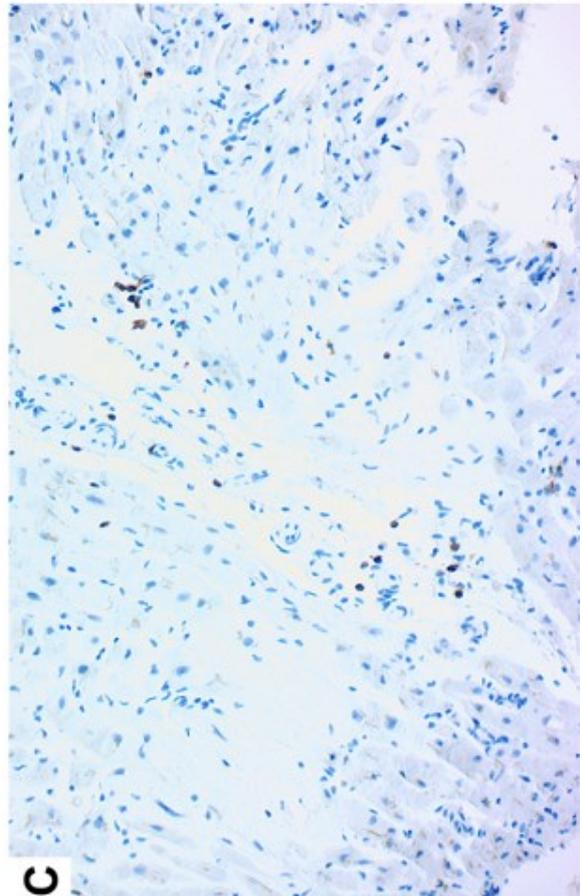
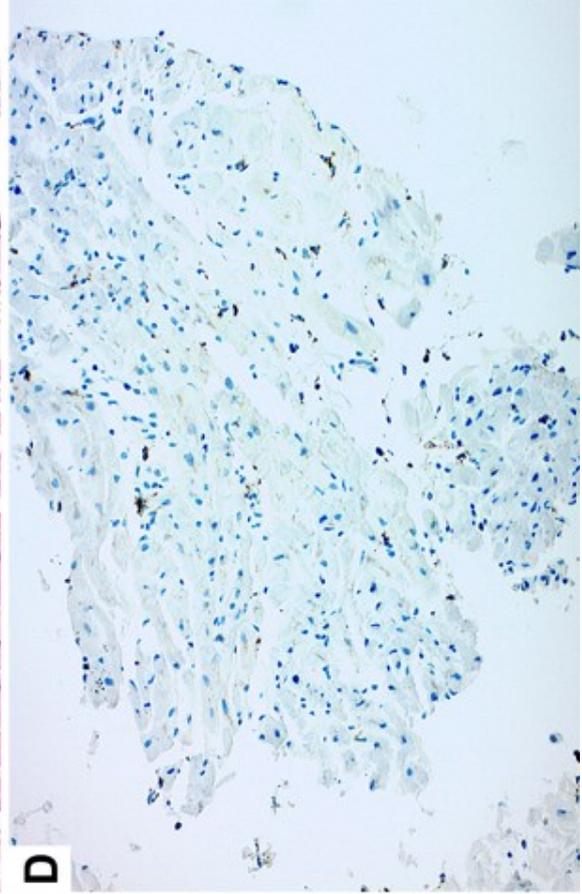
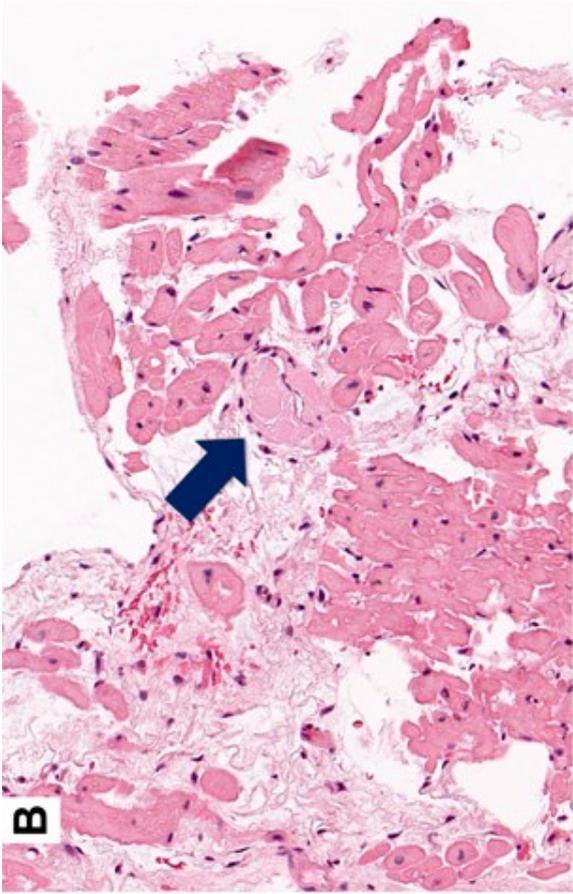
Coinvolgimento perivascolare presente = 1



Frazione di eiezione (%)

Fig. 18 – Nelle figure soprastanti sono rappresentati i grafici corrispondenti al coinvolgimento perivascolare del deposito di amiloide e le correlazioni con la hs-cTnI, con l'NT-proBNP, emoglobina, strain longitudinale globale (GLS) e frazione di eiezione (EF).

Fig. 19 – Immagine a pagina seguente. Indagine istopatologica dei campioni di BEM. A) Frammento con deposito interstiziale massivo di amiloide che simula la presenza di edema interstiziale (colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento originale x4); B) evidenza di deposito perivascolare di amiloide (freccia blu), associato a ipertrofia miocitaria e focale vacuolizzazione miocitaria (colorazione ematossilina-eosina, ingrandimento originale x20); C) colorazione IHC CD3 per linfociti, con rare cellule positive non associate a necrosi miocitaria (ingrandimento originale x10); D) colorazione IHC CD68 per macrofagi, con occasionali cellule positive a livello interstiziale (ingrandimento originale x10).



6. Discussione

In questo studio è stato approfondito da diversi punti di vista l'aspetto del danno miocardico nei pazienti con amiloidosi, soffermandosi sia sull'aspetto strumentale (ecocardiografico), sia tissutale e correlando i risultati con l'incremento dei biomarcatori di interesse (la troponina I ad alta sensibilità, hs-cTnI).

6.1 Caratteristiche clinico-strumentali della popolazione di studio

Per quanto riguarda le caratteristiche della popolazione, si sono confermati dati simili a quelli presenti in letteratura,^{1,3} ovvero che i pazienti con amiloidosi sono maschi nel 96% dei casi delle forme ATTR-AC e nel 60% delle forme AL-AC e che l'età mediana alla diagnosi è più alta nei pazienti con forme ATTR rispetto a quelli con forme AL. In merito alle comorbidità, è emersa una maggiore frequenza di ipertensione arteriosa tra i pazienti con ATTR-AC. Questo è coerente con quanto già noto, e lo si può spiegare con il fatto che i pazienti con ATTR-AC sono in genere più anziani e in linea con quanto succede con la popolazione generale, la prevalenza di questa condizione aumenta con l'età.³ È stata riscontrata anche maggiore frequenza di comorbidità cardiovascolari nel gruppo dei pazienti affetti da ATTR-AC rispetto a quello dei pazienti affetti AL-AC, come ad esempio in merito a impianto di pacemaker o defibrillatore impiantabile, di fibrillazione o flutter atriale e di valvulopatia aortica o mitralica di grado moderato-severo. Ognuno di questi elementi è da correlarsi al fatto che, come accennato, i pazienti affetti da amiloidosi ATTR sono più anziani e più frequentemente soggetti alle comorbidità cardiovascolari che affliggono la popolazione generale della stessa fascia d'età. Inoltre, è noto come la progressiva e lenta infiltrazione di transtiretina possa interessare anche il sistema di conduzione generando disturbi del ritmo, nonché gli apparati valvolari, soprattutto del cuore di sinistra.^{1,24}

Per quanto concerne la terapia domiciliare, si è potuto osservare che i pazienti con ATTR-AC assumono più frequentemente terapia cardiovascolare

rispetto ai pazienti con AL-AC, coerentemente con quanto discusso in precedenza. L'utilizzo di terapia diuretica è risultato invece sovrapponibile nei due gruppi, a sottolineare il fatto che, per entrambe le patologie, la problematica spesso più rilevante risulta il sovraccarico di liquidi da correlarsi all'emodinamica restrittiva.

Le analisi dei dati di ecocardiografia hanno evidenziato un aumento degli spessori di parete significativo, sia del setto interventricolare, sia della parete posteriore, e anche una massa del ventricolo sinistro aumentata in modo più spiccato per i pazienti con ATTR-AC. Questo dato è coerente con la letteratura, dove vari studi precedenti avevano infatti dimostrato che il cuore affetto da ATTR-AC è complessivamente più ispessito di quello dei pazienti con AL-AC, i quali molte volte presentano spessori anche normali, pur a fronte di una compromissione funzionale spesso più grave.⁴ L'atrio sinistro manifesta un aumento volumetrico maggiore nei pazienti con ATTR-AC rispetto a quelli con AL-AC, segno di un maggiore aumento delle pressioni di riempimento ventricolare sinistro. Ai limiti della significatività si è riscontrata una maggiore frequenza di ipertrofia del ventricolo destro nei pazienti con ATTR-AC.

Per quanto riguarda le analisi di laboratorio, in letteratura è noto che livelli più alti di troponina T (hs-cTnT) correlano con malattia cardiaca e con un aumentato rischio di mortalità per tutte le cause e di eventi cardiovascolari, indipendentemente dai fattori di rischio tradizionali (come ad esempio la funzionalità renale ed altri biomarcatori come CRP ed NT-proBNP).⁵⁸ Inoltre, si è visto che un'elevazione cronica della hs-cTnT è correlata a maggior frequenza di scompenso cardiaco. Si suggeriva che potessero esistere delle differenze nella fisiopatologia del rilascio troponinico in situazioni acute piuttosto che croniche e che livelli progressivamente aumentati di hs-cTnT possano essere considerati fattore prognostico negativo e markers di danno cardiovascolare.⁵⁸ È noto inoltre che entrambe hs-cTnT e hs-cTnI sono tendenzialmente leggermente più elevate nella AL-AC rispetto alla ATTR-AC³⁸. Nella nostra popolazione non abbiamo riscontrato questa differenza, probabilmente perché i dati di laboratorio sono stati raccolti quanto più vicini alla diagnosi ma non coincidevano necessariamente con essa. Pertanto, alcuni pazienti con AL-AC potevano essere già in trattamento

chemioterapico specifico e questo può aver comportato una riduzione dei valori di hs-cTnI circolante (come segno di risposta cardiaca alla terapia).

6.2 Correlazione clinico-strumentale con hs-cTnI

6.2.1 Correlazione clinico-strumentale con hs-cTnI nei pazienti affetti da amiloidosi da transtiretina (ATTR)

Analizzando il gruppo dei pazienti con amiloidosi ATTR, si è riscontrata una correlazione tra maggiori livelli di hs-cTnI e un'età alla diagnosi più alta, d'accordo con quanto riportato in uno studio di Grogan et al. del 2016.¹⁸ In merito alla terapia domiciliare, i pazienti con hs-cTnI sopra la mediana facevano un uso più consistente dei diuretici dell'ansa, elemento che supporta la correlazione tra un maggior coinvolgimento cardiaco e la maggiore necessità di diuretici per evitare il sovraccarico di liquidi.

Dal punto di vista ecocardiografico, è emersa una correlazione tra valori più elevati di hs-cTnI e aumentati volume telediastolico del ventricolo sinistro, massa del ventricolo sinistro indicizzata, volume dell'atrio sinistro indicizzato, rapporto E/e', diminuzione del GLS, aumentata pressione in arteria polmonare e ridotto TAPSE. Nell'insieme questi dati riflettono un maggiore rimodellamento miocardico in senso ipertrofico-restrittivo e una situazione emodinamica più compromessa nei pazienti con hs-cTnI più elevata. Dagli studi relativi alla cTn, è noto come maggiori pressioni endoventricolari si associno ad un danno miocardico soprattutto endocardico per riduzione della perfusione in questa sede.⁵⁹ In un precedente studio di Grogan et al. del 2016¹⁸, venivano riportati dati simili in merito all'ecocardiografia nei pazienti con ATTRwt-AC, ovvero aumento significativo della massa del ventricolo sinistro indicizzata con riempimento di tipo restrittivo, diminuito mitral deceleration time, oltre a frazione di eiezione preservata o lievemente ridotta nella maggior parte dei pazienti. In un recente studio di Boldrini et al. del 2020⁶⁰, in cui vengono combinate diverse variabili

ecocardiografiche ai fini di migliorare l'accuratezza diagnostica della cardiopatia amiloidotica, emergeva come i parametri che meglio descrivevano la disfunzione cardiaca erano gli aumentati spessori di parete, il parametro E/e', lo strain longitudinale e il TAPSE, i quali tra l'altro correlavano con un maggior quantitativo di deposito amiloidotico rilevato attraverso la misurazione dello spazio extracellulare della risonanza magnetica cardiaca. In questo studio, abbiamo confermato questi dati morfo-funzionali e abbiamo correlato la loro maggiore compromissione con livelli più elevati di hs-cTnI. I dati di laboratorio hanno mostrato che i pazienti con valori di hs-cTnI più elevati presentavano valori più alti di creatinina, ma anche più alti livelli sia di BNP sia di NT-proBNP. Questo dato è in linea con due studi in cui viene analizzato il ruolo però della hs-cTnT: nello studio di Castiglione del 2021³⁸ si evidenziava che a valori più elevati di BNP, NT-proBNP e troponina T corrispondevano una compromissione cardiologica più severa e di conseguenza un peggiore outcome; dati simili appaiono nello studio di Grogan¹⁸, in cui la cTnT insieme al NT-proBNP venivano utilizzati per creare un modello di staging per stratificare i pazienti con amiloidosi ATTRwt a seconda del rischio.

6.2.2 Correlazione clinico-strumentale con hs-cTnI nei pazienti affetti da amiloidosi da catene leggere (AL)

Nei pazienti con AL-AC, non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra i due sottogruppi confrontati in base alla hs-cTnI per quanto riguarda le caratteristiche generali dei pazienti, né in merito alle comorbidità.

Dal punto di vista della terapia domiciliare, è emerso un uso più consistente di diuretici dell'ansa e di antagonisti dell'aldosterone in coloro con valori di hs-cTnI più elevati, anche qui a supportare il fatto che maggiori livelli di hs-cTnI correlano con un maggior coinvolgimento cardiaco.

Per quanto riguarda l'ecocardiografia, invece, a valori di troponina hs-cTnI più corrispondevano aumentati spessori del setto interventricolare e della parete posteriore, riduzione del valore assoluto del GLS e aumentata frequenza di

ipertrofia del ventricolo destro. L'aumento della cTnI (non ad alta sensibilità) era stato correlato a un peggioramento della funzione sia del ventricolo sinistro sia dell'atrio sinistro in un precedente studio di Apridonidze et al. del 2012⁴⁵, dove esso veniva associato anche a un aumento del late gadolinium enhancement alla risonanza magnetica cardiaca, suggerendo un correlazione con un più avanzato stato infiltrativo. All'ecocardiografia, l'aumento della cTnI si associava a indici di funzionalità del ventricolo sinistro peggiorati (più basso indice cardiaco, più alto myocardial performance index e diminuito stroke index) e peggiore funzionalità sistolica dell'atrio destro, mentre l'aumento dello spessore del setto interventricolare era solo leggermente più elevato nel gruppo con cTnI più alta.

I nostri dati basati su valori di hs-cTnI suggeriscono come, nella AL-CA, l'entità del danno miocardico si associ ad aumentati spessori biventricolari e a una ridotta deformazione longitudinale globale, aspetti che poi verranno validati dall'analisi istologica (si veda sotto). Nella forma AL-AC, variabili ecocardiografiche riferite alla situazione emodinamica (E/e' , volume atriale sinistro, pressione sistolica in arteria polmonare) non sono risultate differenti tra i pazienti con hs-cTnI superiore o inferiore alla mediana, a suggerire un ruolo principale dell'infiltrazione stessa, più che delle alterazioni emodinamiche, nella genesi del danno miocardico.

Nei pazienti affetti da amiloidosi AL, coloro che riferivano valori di hs-cTnI maggiori presentavano valori di NT-proBNP e creatinina maggiori. Il dato di BNP in questo sottogruppo non è interpretabile essendo stato disponibile solo per 9 pazienti.

6.3 Follow-up e outcome

Sia in AL-AC sia in ATTR-AC, abbiamo riscontrato una sopravvivenza tendenzialmente peggiore nei pazienti con troponina hs-cTnI più elevata. In particolare, nei pazienti con forma ATTR la sopravvivenza a 30 mesi nel gruppo con hs-cTnI più elevata risultava essere della metà rispetto al gruppo dei pazienti con hs-cTnI più bassa della mediana (tasso di mortalità del 26% nel primo caso e del 6.5% nel secondo). Anche nella popolazione di pazienti con forma AL la

sopravvivenza era migliore nei pazienti con hs-cTnI sotto la mediana; qui il follow-up considerato era di 80 mesi e si riscontrava un tasso di sopravvivenza di circa il 70% nei pazienti con hs-cTnI sotto il valore mediano e del 50% in quelli con hs-cTnI sopra la soglia (il tasso di mortalità era del 35% nel primo caso e del 22% nel secondo). L'assenza di una differenza statisticamente significativa alle curve di Kaplan-Meier in questo sottogruppo è, di nuovo, da imputarsi al fatto che tale marcatore non è stato necessariamente dosato alla diagnosi e potrebbe pertanto risultare ridotto dalla terapia specifica, alterando le curve di sopravvivenza. In letteratura sono stati eseguiti studi riguardo la cTnT, mentre meno approfondito era il ruolo della cTnI. Se consideriamo però il ruolo della troponina T e lo confrontiamo con i nostri risultati, ci aspettiamo uno scenario simile: nello studio di Apridonidze nel 2012⁴⁵, emergeva che la troponina cTnT aumentata era il maggior predittore di mortalità per tutte le cause; il concetto evidenziato anche precedentemente da de Lemos in uno studio del 2010⁵⁸, in cui l'aumento della hs-cTnT correlava con un aumentato rischio di mortalità per tutte le cause e per quelle cardiovascolari, indipendentemente dai fattori di rischio tradizionali come la funzione renale e i livelli di NT-proBNP.

6.4 Biopsie endomiocardiche

6.4.1 Valutazione delle biopsie endomiocardiche

Le biopsie endomiocardiche valutate nel nostro studio sono state prelevate dal setto interventricolare dalla parte del ventricolo destro, come da pratica clinica. L'analisi dei campioni è stata focalizzata su diversi elementi che potenzialmente concorrono a determinare il danno miocardico, tra questi, l'infiltrazione di amiloide, la vacuolizzazione, la necrosi, il coinvolgimento perivascolare, la fibrosi e l'edema. Elementi frequentemente riscontrati sono stati la vacuolizzazione, stata descritta in un'ampia percentuale di biopsie (60%), così come il coinvolgimento perivascolare, riscontrato nella metà delle biopsie. La necrosi era presente solo

nel 5% delle biopsie, mentre la fibrosi risultava presente nel 40% delle biopsie con una percentuale media del 3.9%. Questo dato è in disaccordo con quanto riportato da Pucci et al.⁵², il quale individuava la fibrosi in tutte e 37 le biopsie analizzate nel suo studio, per un'estensione di circa il 15% del campione. Inoltre, nello stesso studio la quantificazione del deposito di amiloide rappresentava il 15% dell'intera superficie del campione, senza particolari differenze tra i sottogruppi di amiloidosi ATTR o AL, mentre, nelle nostre biopsie questa percentuale era più alta e arrivava al 25.9%. Va sottolineato che, nello studio di Pucci et al.⁵², si consideravano biopsie prelevate dal ventricolo sinistro (differentemente dai nostri campioni prelevati dalla giunzione tra setto ventricolare e parete libera anteriore del ventricolo destro).

La presenza di linfociti T CD3+ è stata associata a un peggiore outcome nei pazienti con CA-AL⁵²; il nostro lavoro ne evidenziava una presenza pari a 9.5 unità per mm² (range 0.0 – 32.1). La conta dei macrofagi CD68+ nel nostro studio ha mostrato una presenza di 21.4 unità per mm², più alta di quanto emerso nello studio di Pucci et al. (11, range 7-16).⁵²

Il coinvolgimento perivascolare è risultato più frequente nella AL-AC rispetto alla ATTR-AC, coerentemente con la letteratura; Larsen et al.⁵³, infatti, riportavano come l'interessamento perivascolare fosse più frequente nelle biopsie di pazienti affetti da amiloidosi AL, per quanto riguarda sia depositi venosi sia arteriosi.

Proseguendo con la nostra analisi, va riportato che l'infiammazione era quasi del tutto assente (riscontrata infatti solo in una delle 40 biopsie, quindi con frequenza del 2.5%), mentre la presenza di edema è stata individuata nel 7.5% dei pazienti.

6.4.2 Correlazioni tra dati delle BEM, dati ecocardiografici e hs-cTnI

Le analisi sulle biopsie sono state confrontate con i parametri ecocardiografici e laboratoristici e sono emersi dati interessanti. La percentuale di amiloide presente nei campioni, infatti, è risultata correlare con l'aumento dello spessore del setto interventricolare, ad indicare quindi che un aumento della componente infiltrante

concorre nel determinare l'aumento di spessore del ventricolo sinistro. Tuttavia, per quanto riguarda la massa del ventricolo sinistro, questa è risultata correlare positivamente con la percentuale di infiltrazione amiloide solo nei pazienti con AL-AC; questo potrebbe suggerire che, in questi pazienti (più giovani e con meno patologie cardiovascolari), l'aumento della massa ventricolare sinistra sia maggiormente a carico dell'infiltrazione amiloide stessa rispetto a quanto accade nei pazienti con ATTR-AC che possono presentare concomitante ipertrofia ventricolare sinistra per altre cause (ipertensione arteriosa, valvulopatie). Abbiamo riscontrato, sia in AL-AC sia in ATTR-AC, una correlazione tra l'aumento della percentuale di infiltrazione amiloide e la diminuzione della frazione di eiezione. Un dato interessante è inoltre che il grado di infiltrazione amiloide correlava con la diminuzione del TAPSE nei pazienti con ATTR-AC, confermando che questo parametro si altera negli stadi avanzati come riportato da Boldrini et al.⁶⁰

In merito a coinvolgimento perivascolare, nei pazienti con AL-AC, correlava con l'entità del danno e stress miocardico espresso da hs-cTnI ed NT-proBNP, nonché con una peggiore compromissione della deformazione longitudinale globale e della funzione di pompa ventricolare sinistra. Nello studio di Pucci et al.⁵² non era emersa una correlazione significativa tra pattern di infiltrazione amiloide e aumento della hs-cTnT. Tuttavia, il nostro riscontro appare fisiopatologicamente coerente, in quanto si può supporre che un coinvolgimento perivascolare possa concorrere ad una componente anche ischemica del danno miocardico, manifestandosi con valori più elevati di hs-cTnI.

Per quanto riguarda il diametro dei cardiomiociti, è noto sin dagli anni '80 che il deposito di amiloide nel cuore sia correlato a una coartazione dei cardiomiociti, generalmente definita come 'atrofia miocitaria'.^{61,62} Tuttavia, le alterazioni descritte più frequentemente nelle analisi patologiche di esemplari cardiaci colpiti da infiltrazione di amiloide sono aspecifiche, quali aloni perinucleari, vacuolizzazione citoplasmatica e atrofia cellulare.⁵⁵ Come precedentemente riportato, alcuni studi sperimentali hanno affrontato il tema del meccanismo eziologico della disfunzione miocardica nella cardiomiopatia amiloidotica,

rivelando la natura citotossica delle fibrille di amiloide nel miocardio, sia per i frammenti di catene leggere sia di transtiretina.^{63,64} Inoltre, la presenza stessa di proteine malripiegate è stata ipotizzata come causa di danno diretto dei cardiomiociti tramite morte cellulare apoptotica e conseguente disfunzione miocardica con scompenso cardiaco.⁶⁵⁻⁶⁷ Sfortunatamente, l'apoptosi è molto difficile da valutare istologicamente in maniera quantitativa, poiché il metodo più frequentemente utilizzato (TUNEL) è gravato da forti controversie.⁶⁸ La valutazione delle modifiche cellulari nel miocardio rimane quindi il metodo più affidabile per stimare il danno miocardico a livello istologico nella CA. Un precedente lavoro di Arbustini et al.⁶⁹ ha ben documentato la correlazione tra alterazioni dei cardiomiociti e prognosi clinica. Il gruppo ha valutato la dimensione dei cardiomiociti con metodo quantitativo e l'ha confrontata con lo spessore dei depositi di amiloide circondanti i cardiomiociti. È stata dimostrata la relazione tra lo spessore maggiore dei depositi e il minore tempo di sopravvivenza dei pazienti. Nel nostro lavoro, il diametro dei cardiomiociti correlava positivamente con la massa ventricolare sinistra, il volume atriale sinistro, un peggior GLS e un peggior TAPSE. Inoltre, una correlazione degna di nota è quella tra l'aumento del diametro miocitario e il rialzo dei valori di hs-cTnI. Tuttavia, i nostri dati non confermano la relazione tra l'aumento del diametro dei cardiomiociti e il maggior carico di amiloide, verosimilmente per l'ampia variabilità nel grado di deposito di amiloide nella nostra popolazione. Degli studi prospettici con biopsie endomiocardiche di controllo potrebbero aiutare a identificare il ruolo prognostico delle alterazioni cardiomiocitarie e le loro ipotetiche modifiche dopo l'introduzione della terapia.

6.5 Limiti dello studio

Trattandosi di uno studio osservazionale di natura retrospettiva, i dati provenivano dalle cartelle cliniche dei pazienti, motivo per cui alcuni dati essere mancanti. Per lo stesso motivo, anche il follow-up potrebbe non essere completo per tutti i pazienti. Lo studio inoltre è monocentrico. Inoltre, tra i pazienti che avevano effettuato la biopsia, inoltre, solo 19 avevano a disposizione la troponina I ad alta sensibilità e alcuni dati di ecocardiografia non erano presenti in tutti i pazienti. Inoltre, dato il numero relativamente esiguo di BEM, analisi consistenti delle differenze tissutali tra AL-AC e ATTR-AC non sono state possibili per tutti i parametri. Infine, una limitazione maggiore è l'assenza di correlazione con dati di risonanza magnetica cardiaca, che non erano disponibili per tutti i pazienti al momento della stesura di questa tesi.

7. Conclusioni

In questo studio, abbiamo riportato i dati clinici, ecocardiografici e laboratoristici dei pazienti con AC (ATTRwt, ATTRv e AL) seguiti presso il nostro Centro nonché i dati di 40 biopsie endomiocardiche di pazienti affetti da AC, realizzate tra il 2012 e il 2022 presso la nostra Struttura. Tra i pazienti affetti da ATTR-AC, coloro con valori di hs-cTnI più elevati presentavano non solo un aumentato rimodellamento cardiaco in termini di aumentati spessori biventricolari, ma anche un peggior profilo emodinamico espresso da un maggiore rapporto E/e', dal maggior volume atriale sinistro e da una maggiore pressione stimata in arteria polmonare. Nei pazienti con AL-CA, invece, i pazienti con un aumento più importante della hs-cTnI mostravano un maggiore spessore della parete posteriore del ventricolo sinistro, del setto interventricolare e del ventricolo destro. In entrambe le patologie, pazienti con hs-cTnI più elevata mostravano una maggiore alterazione della deformazione longitudinale globale. Dal punto di vista istologico, abbiamo riportato una percentuale di infiltrazione amiloide del 26%; anche la vacuolizzazione e la fibrosi sono risultate un elemento frequente, mentre più rari sono risultati la necrosi, l'edema e l'infiammazione. L'interessamento perivascolare è risultato più frequente nei pazienti con AL-AC. Abbiamo riportato originali correlazioni tra il diametro dei cardiomiociti e peggiori parametri morfo-funzionali all'ecocardiogramma, nonché maggiori valori di hs-cTnI. Anche la percentuale di deposizione amiloide correlava significativamente con peggiori parametri morfo-funzionali ecocardiografici e con aumentati valori di hs-cTnI; interessante il dato che la correlazione con la massa ventricolare sinistra era rilevante solo nei pazienti con AL-AC, a riprova del fatto che nei pazienti con ATTR-AC, vi sono potenzialmente altri fattori che concorrono all'ipertrofia del ventricolo sinistro (ipertensione arteriosa, valvulopatie, ecc.). Infine, riportiamo un ruolo significativo dell'infiltrazione perivascolare nella patogenesi del danno miocardico nei pazienti con AL-AC. Questi dati contribuiscono in modo importante all'elucidazione dei meccanismi di danno miocardico, maggior determinante della prognosi, nei pazienti con cardiopatia amiloidotica.

8. Bibliografia

1. Muchtar E, Dispenzieri A, Magen H, et al. Systemic amyloidosis from A (AA) to T (ATTR): a review. *J Intern Med.* 2021;289(3):268-292. doi:10.1111/joim.13169
2. Wolfson AM, Shah KS, Patel JK. Amyloid and the Heart. *Curr Cardiol Rep.* 2019;21(12):164. doi:10.1007/s11886-019-1230-9
3. Ruberg FL, Grogan M, Hanna M, Kelly JW, Maurer MS. Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(22):2872-2891. doi:10.1016/j.jacc.2019.04.003
4. Falk RH, Alexander KM, Liao R, Dorbala S. AL (Light-Chain) Cardiac Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(12):1323-1341. doi:10.1016/j.jacc.2016.06.053
5. Angelini A, Zanco F, Castellani C, et al. Cardiac amyloidosis: a review of the literature and a practical approach for the clinicians. *Ital J Med.* 2019;13(2):73-90. doi:10.4081/itjm.2019.1149
6. Atkin C, Richter A, Sapey E. What is the significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance? *Clin Med.* 2018;18(5):391-396. doi:10.7861/clinmedicine.18-5-391
7. Gilstrap LG, Dominici F, Wang Y, et al. Epidemiology of Cardiac Amyloidosis–Associated Heart Failure Hospitalizations Among Fee-for-Service Medicare Beneficiaries in the United States. *Circ Heart Fail.* 2019;12(6):e005407. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005407
8. Westin O, Butt JH, Gustafsson F, et al. Two Decades of Cardiac Amyloidosis. *JACC CardioOncology.* 2021;3(4):522-533. doi:10.1016/j.jacc.2021.05.004
9. Maurer MS, Bokhari S, Damy T, et al. Expert Consensus Recommendations for the Suspicion and Diagnosis of Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Circ Heart Fail.* 2019;12(9):e006075. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006075
10. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, et al. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2018;379(11):1007-1016. doi:10.1056/NEJMoa1805689
11. Planté-Bordeneuve V, Suhr OB, Maurer MS, White B, Grogan DR, Coelho T. The Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey (THAOS) registry: design and methodology. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(1):77-84. doi:10.1185/03007995.2012.754349

12. Aimo A, Merlo M, Porcari A, et al. Redefining the epidemiology of cardiac amyloidosis. A systematic review and meta-analysis of screening studies. *Eur J Heart Fail*. Published online May 16, 2022:ejhf.2532. doi:10.1002/ejhf.2532
13. Griffin JM, Rosenblum H, Maurer MS. Pathophysiology and Therapeutic Approaches to Cardiac Amyloidosis. *Circ Res*. 2021;128(10):1554-1575. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318187
14. Witteles RM, Liedtke M. AL Amyloidosis for the Cardiologist and Oncologist. *JACC CardioOncology*. 2019;1(1):117-130. doi:10.1016/j.jacc.2019.08.002
15. Saito Y, Nakamura K, Ito H. Molecular Mechanisms of Cardiac Amyloidosis. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):25. doi:10.3390/ijms23010025
16. Kazman P, Absmeier RM, Engelhardt H, Buchner J. Dissection of the amyloid formation pathway in AL amyloidosis. *Nat Commun*. 2021;12(1):6516. doi:10.1038/s41467-021-26845-0
17. Porcari A, Bussani R, Merlo M, et al. Incidence and Characterization of Concealed Cardiac Amyloidosis Among Unselected Elderly Patients Undergoing Post-mortem Examination. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:749523. doi:10.3389/fcvm.2021.749523
18. Grogan M, Scott CG, Kyle RA, et al. Natural History of Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis and Risk Stratification Using a Novel Staging System. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(10):1014-1020. doi:10.1016/j.jacc.2016.06.033
19. Martinez-Naharro A, Baksi AJ, Hawkins PN, Fontana M. Diagnostic imaging of cardiac amyloidosis. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(7):413-426. doi:10.1038/s41569-020-0334-7
20. Ihne S, Morbach C, Obici L, Palladini G, Störk S. Amyloidosis in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2019;16(6):285-303. doi:10.1007/s11897-019-00446-x
21. Valentini F, Anselmi F, Metra M, et al. Diagnostic and prognostic value of low QRS voltages in cardiomyopathies: old but gold. *Eur J Prev Cardiol*. Published online October 25, 2020:zwaa027. doi:10.1093/eurjpc/zwaa027
22. Dubrey S. The clinical features of immunoglobulin light-chain (AL) amyloidosis with heart involvement. *QJM*. 1998;91(2):141-157. doi:10.1093/qjmed/91.2.141
23. Rapezzi C, Merlini G, Quarta CC, et al. Systemic Cardiac Amyloidoses: Disease Profiles and Clinical Courses of the 3 Main Types. *Circulation*. 2009;120(13):1203-1212. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843334
24. Dorbala S, Cuddy S, Falk RH. How to Image Cardiac Amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020;13(6):1368-1383. doi:10.1016/j.jcmg.2019.07.015

25. Carroll JD, Gaasch WH, McAdam KPWJ. Amyloid cardiomyopathy: Characterization by a distinctive voltage/mass relation. *Am J Cardiol.* 1982;49(1):9-13. doi:10.1016/0002-9149(82)90270-3
26. Falk RH, Quarta CC. Echocardiography in cardiac amyloidosis. *Heart Fail Rev.* 2015;20(2):125-131. doi:10.1007/s10741-014-9466-3
27. Tsang W, Lang RM. Echocardiographic Evaluation of Cardiac Amyloid. *Curr Cardiol Rep.* 2010;12(3):272-276. doi:10.1007/s11886-010-0108-7
28. Rubin J, Maurer MS. Cardiac Amyloidosis: Overlooked, Underappreciated, and Treatable. *Annu Rev Med.* 2020;71(1):203-219. doi:10.1146/annurev-med-052918-020140
29. Rapezzi C. Relative Left Ventricular Apical Sparing of Longitudinal Strain in Cardiac Amyloidosis. :3.
30. Phelan D, Collier P, Thavendiranathan P, 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. *Cardiovasc Imaging.*:7.
31. Hanna M, Ruberg FL, Maurer MS, et al. Cardiac Scintigraphy With Technetium-99m-Labeled Bone-Seeking Tracers for Suspected Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(22):2851-2862. doi:10.1016/j.jacc.2020.04.022
32. Dorbala S, Ando Y, Bokhari S, et al. ASNC/AHA/ASE/EANM/HFSA/ISA/SCMR/SNMMI expert consensus recommendations for multimodality imaging in cardiac amyloidosis: Part 1 of 2—evidence base and standardized methods of imaging. *J Nucl Cardiol.* 2019;26(6):2065-2123. doi:10.1007/s12350-019-01760-6
33. de Haro-del Moral FJ, Pubul-Núñez V, Casáns-Tormo I, Jiménez-Heffernan A, Ruano-Pérez R. Cardiac scintigraphy with 99mTc-diphosphonates in cardiac amyloidosis. *Rev Esp Med Nucl E Imagen Mol Engl Ed.* 2020;39(4):254-266. doi:10.1016/j.remnie.2020.06.006
34. Aimo A, Emdin M, Musetti V, Pucci A, Vergaro G. Abdominal Fat Biopsy for the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis. *JACC Case Rep.* 2020;2(8):1182-1185. doi:10.1016/j.jaccas.2020.05.062
35. Paulsson Rokke H, Sadat Gousheh N, Westermark P, et al. Abdominal fat pad biopsies exhibit good diagnostic accuracy in patients with suspected transthyretin amyloidosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):278. doi:10.1186/s13023-020-01565-8
36. Wisniewski B, Wechalekar A. Confirming the Diagnosis of Amyloidosis. *Acta Haematol.* 2020;143(4):312-321. doi:10.1159/000508022

37. Vakil K, Voight J, Abidi KS, Mbai M, Sharma A, McFalls E. Functional Role of Amyloidosis in the Pathophysiology of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction and Cardiorenal Syndrome. *J Cardiovasc Dis.*:5.
38. Castiglione V, Franzini M, Aimo A, et al. Use of biomarkers to diagnose and manage cardiac amyloidosis. *Eur J Heart Fail.* 2021;23(2):217-230. doi:10.1002/ejhf.2113
39. Dittrich T, Benner A, Kimmich C, et al. Performance analysis of AL amyloidosis cardiac biomarker staging systems with special focus on renal failure and atrial arrhythmia. *Haematologica.* 2019;104(7):1451-1459. doi:10.3324/haematol.2018.205336
40. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2020 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am J Hematol.* 2020;95(7):848-860. doi:10.1002/ajh.25819
41. Palladini G, Milani P, Merlini G. Management of AL amyloidosis in 2020. Published online 2020:8.
42. Merlini G, Lousada I, Ando Y, et al. Rationale, application and clinical qualification for NT-proBNP as a surrogate end point in pivotal clinical trials in patients with AL amyloidosis. *Leukemia.* 2016;30(10):1979-1986. doi:10.1038/leu.2016.191
43. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J.* 2019;40(3):237-269. doi:10.1093/eurheartj/ehy462
44. Miller WL, Wright RS, McGregor CG, et al. Troponin levels in patients with amyloid cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation. *Am J Cardiol.* 2001;88(7):813-815. doi:10.1016/S0002-9149(01)01877-X
45. Apridonidze T, Steingart RM, Comenzo RL, et al. Clinical and Echocardiographic Correlates of Elevated Troponin in Amyloid Light-Chain Cardiac Amyloidosis. *Am J Cardiol.* 2012;110(8):1180-1184. doi:10.1016/j.amjcard.2012.05.061
46. Myhre PL, Claggett B, Ballantyne CM, et al. Association Between Circulating Troponin Concentrations, Left Ventricular Systolic and Diastolic Functions, and Incident Heart Failure in Older Adults. *JAMA Cardiol.* 2019;4(10):997. doi:10.1001/jamacardio.2019.3113
47. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, et al. Serum Cardiac Troponins and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide: A Staging System for Primary Systemic Amyloidosis. *J Clin Oncol.* 2004;22(18):3751-3757. doi:10.1200/JCO.2004.03.029

48. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Revised Prognostic Staging System for Light Chain Amyloidosis Incorporating Cardiac Biomarkers and Serum Free Light Chain Measurements. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):989-995. doi:10.1200/JCO.2011.38.5724
49. Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, et al. Prognostication of survival using cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2004;104(6):1881-1887. doi:10.1182/blood-2004-01-0390
50. Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nat Rev Dis Primer*. 2018;4(1):38. doi:10.1038/s41572-018-0034-3
51. Palladini G, Barassi A, Klersy C, et al. The combination of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) at presentation and changes in N-terminal natriuretic peptide type B (NT-proBNP) after chemotherapy best predicts survival in AL amyloidosis. *Blood*. 2010;116(18):3426-3430. doi:10.1182/blood-2010-05-286567
52. Pucci A, Aimo A, Musetti V, et al. Amyloid Deposits and Fibrosis on Left Ventricular Endomyocardial Biopsy Correlate With Extracellular Volume in Cardiac Amyloidosis. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(20):e020358. doi:10.1161/JAHA.120.020358
53. Larsen BT, Mereuta OM, Dasari S, et al. Correlation of histomorphological pattern of cardiac amyloid deposition with amyloid type: a histological and proteomic analysis of 108 cases. *Histopathology*. 2016;68(5):648-656. doi:10.1111/his.12793
54. Morioka M, Takashio S, Nakashima N, et al. Correlation Between Cardiac Images, Biomarkers, and Amyloid Load in Wild-Type Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(12):e024717. doi:10.1161/JAHA.121.024717
55. Leone O, Veinot JP, Angelini A, et al. 2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc Pathol*. 2012;21(4):245-274. doi:10.1016/j.carpath.2011.10.001
56. Basso C, Ronco F, Marcus F, et al. Quantitative assessment of endomyocardial biopsy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an in vitro validation of diagnostic criteria. *Eur Heart J*. 2008;29(22):2760-2771. doi:10.1093/eurheartj/ehn415

57. Fernández de Larrea C, Verga L, Morbini P, et al. A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidoses. *Blood*. 2015;125(14):2239-2244. doi:10.1182/blood-2014-11-609883
58. de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of Troponin T Detected With a Highly Sensitive Assay and Cardiac Structure and Mortality Risk in the General Population. *JAMA*. 2010;304(22):2503. doi:10.1001/jama.2010.1768
59. Weil BR, Suzuki G, Young RF, Iyer V, Canty JM. Troponin Release and Reversible Left Ventricular Dysfunction After Transient Pressure Overload. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(25):2906-2916. doi:10.1016/j.jacc.2018.04.029
60. Boldrini M, Cappelli F, Chacko L, et al. Multiparametric Echocardiography Scores for the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020;13(4):909-920. doi:10.1016/j.jcmg.2019.10.011
61. Frenzel H, Thormann J. Light Microscopic, Ultrastructural, and Immunohistochemical Studies. 85(6):7.
62. Smith RRL, Hutchins GM. Ischemic Heart Disease Secondary to Amyloidosis of Intramyocardial Arteries. :5.
63. Liao R, Jain M, Teller P, et al. Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts. *Circulation*. 2001;104(14):1594-1597.
64. Dittloff KT, Iezzi A, Zhong JX, Mohindra P, Desai TA, Russell B. Transthyretin amyloid fibrils alter primary fibroblast structure, function, and inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021;321(1):H149-H160. doi:10.1152/ajpheart.00073.2021
65. Shi J, Guan J, Jiang B, et al. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38 α MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(9):4188-4193. doi:10.1073/pnas.0912263107
66. Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M. Cytotoxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chains in cell culture. *Cell Death Dis*. 2010;1(11):e98-e98. doi:10.1038/cddis.2010.75
67. Mishra S, Guan J, Plovie E, et al. Human amyloidogenic light chain proteins result in cardiac dysfunction, cell death, and early mortality in zebrafish. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2013;305(1):H95-H103. doi:10.1152/ajpheart.00186.2013
68. Kraupp BG, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented dna (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A

cautionary note. *Hepatology*. 1995;21(5):1465-1468.
doi:10.1002/hep.1840210534

69. Arbustini E, Merlini G, Gavazzi A, et al. Cardiac immunocyte-derived (AL) amyloidosis: An endomyocardial biopsy study in 11 patients. *Am Heart J*. 1995;130(3):528-536. doi:10.1016/0002-8703(95)90362-3