

Dipartimento di

MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in SANITA' PUBBLICA Ciclo XXXIII

Curriculum in Percorso Executive - Fisiopatologia Clinica e Prevenzione delle Malattie

TITOLO TESI

AMILOIDOSI CARDIACA:

ANALISI DI PREVALENZA IN DUE STUDI MULTICENTRICI ITALIANI

Cognome RELLA Nome VALERIA

Matricola 055952

Relatore: Chiar.mo Prof. G. Grassi

Tutore: Chiar.mo Prof. G. Parati

Cotutore: Prof.ssa L. Crotti

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO BICOCCA

Dottorato in Sanità Pubblica

AMILOIDOSI CARDIACA:

ANALISI DI PREVALENZA IN DUE STUDI MULTICENTRICI ITALIANI

Relatore: Chiar.mo Prof. G. Grassi

Correlatore: Prof. G. Parati - Prof.ssa L. Crotti

Tesi di dottorato di: Dott.ssa V. Rella

INDICE

1. Definizione di Amiloidosi	5
2. Amiloidosi Cardiaca	6
2.1 Amiloidosi Cardiaca AL	7
2.2 Amiloidosi Cardiaca da Transtiretina	8
3. Clinica	9
4. Diagnosi	9
4.1 Esami Ematici	11
4.2 Elettrocardiogramma	11
4.3 Ecocardiogramma	12
4.4 Risonanza Magnetica Cardiaca	12
4.5 Scintigrafia con tracciante osseo	13
4.6 Biopsia	14
4.7 Test Genetici	14
5. Terapia	15
5.1 Amiloidosi Cardiaca AL	15
5.2 Amiloidosi Cardiaca da Transtiretina	17
5.2.1 Inibizione della sintesi di transtiretina	17
5.2.2 Stabilizzazione della transtiretina	19
5.2.3 Degradazione e rimozione delle fibre di amiloide	21
6. Prevenzione della morte cardiaca improvvisa	22
7. Studio 1:	
7.1 Razionale e obiettivo dello studio 1	23
7.2 Materiali e Metodi	23
7.3 Analisi Statistica	24
7.4 Risultati	24

7.5 Discussione dello studio 1	29
8. Studio 2:	
8.1 Razionale e obiettivo dello studio 2	31
8.2 Materiali e Metodi	32
8.3 Analisi Statistica	36
8.4 Risultati	37
8.5 Discussione dello studio 2	52
9. Conclusioni tratte dai due studi	55
10. Bibliografia	57

1. DEFINIZIONE DI AMILOIDOSI

Il termine amiloidosi indica un gruppo eterogeneo di condizioni patologiche che condividono una caratteristica: la deposizione di proteine autologhe fibrillari insolubili nello spazio extracellulare con conseguente alterazione architettónica e funzionale degli organi interessati. Le proteine implicate nel processo (fibrille di amiloide) variano in ciascun tipo di amiloidosi, ma hanno alcune proprietà comuni: un aspetto di sostanza amorfa al microscopio a luce normale; un'ultrastruttura composta da fibrille di diametro tra 7 e 10 nm costituita da amiloide e da altri fattori additivi come proteoglicani; la conformazione strutturale a foglietto β ripiegato, visibile alla spettroscopia a raggi infrarossi, che conferisce loro una peculiare birifrangenza verde al microscopio a luce polarizzata dopo colorazione con Rosso Congo.^{1 2 3} L'epidemiologia è difficile da definire dal momento che la diagnosi di amiloidosi è spesso tardiva o misconosciuta per la difficoltà nel valutare e riconoscere i sintomi d'esordio, di solito altamente aspecifici. Gli studi a riguardo, con dati che provengono da Centri di Riferimento, sono concordi nello stimare l'incidenza dell'amiloidosi sistemica intorno a 10 casi ogni milione di persone all'anno.^{4 5 6} L'amiloidosi da catene leggere (AL) è la forma più frequente con un'incidenza stimata in USA intorno a 7 casi ogni milione di persone all'anno, sebbene i risultati autoptici e lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche suggeriscano che l'amiloidosi da transtiretina (ATTR) sia in realtà la forma più comune. Seguono l'amiloidosi reattiva secondaria a infiammazione cronica (AA) e in ultimo le varianti sistemiche eredo-familiari meno frequenti. Secondo studi retrospettivi, eseguiti in Centri di Riferimento e per la difficoltà diagnostica sopra menzionata è verosimile che i numeri riportati rappresentino una sottostima del fenomeno reale.

L'amiloidosi può essere acquisita o ereditaria, sistemica o localizzata. La classificazione dell'amiloidosi si basa sulla natura della proteina precursore, dato che quest'ultima determina l'espressione fenotipica della malattia sia per quanto riguarda gli organi coinvolti che per le manifestazioni cliniche di tale coinvolgimento (Tabella 1).

Proteina amiloide	Precursore	Sistemica (S) o localizzata (L)	Sindrome o tessuti coinvolti
AL	Catene leggere Ig	S, L	Primaria Associata al mieloma
AH	Catene pesanti Ig	S, L	Primaria Associata al mieloma
ATTR	Transtiretina	S	Familiare (portoghese, giapponese, svedese) Senile sistemica
AA	(Apo) AA sierica	L? S	Tenosinovia Secondaria, reattiva
A β_2 M	β_2 microglobulina	S	Emodialisi cronica
AApoA1	Apolipoproteina A1	L? S	Giunture Familiare
AApoA2	Apolipoproteina A2	L	Aortica
AGel	Gelsolina	S	Familiare (renale) Familiare (finlandese)
ALys	Lisozima	S	Familiare
AFib	Fibrinogena catena α	S	Familiare
ACys	Cistatina C	S	Familiare (islandese)
A β	A β precursore proteico	L	Malattia di Alzheimer, invecchiamento Familiare (olandese)
APrP ^{Sc}	Proteina prionica	L	Encefalopatie spongiformi
ACal	(Pro)calcitonina	L	Tumori tiroidei a cellule C
AIAPP	"Islet amyloid polypeptide"	L	Isole di Langerhans Insulinomi
AANF	Fattore natriuretico atriale	L	Atri cardiaci
APro	Prolattina	L	Ipofisi dell'anziano Prolattinomi
AIns	Insulina	L	Iatrogena (siti di iniezione dell'insulina)
ALac	Lattoferrina	L	Cornea
AMed	Lactadherin	L	Media dell'aorta
ABri/ADan	Peptide ABri	L/S	Demenza familiare danese, britannica

Tabella 1. Classificazione dell'amiloidosi

2. AMILOIDOSI CARDIACA

Il coinvolgimento cardiaco, caratterizzato da un progressivo aumento dello spessore del miocardio ventricolare sinistro e destro, del setto interatriale e delle valvole atrioventricolari, dovuto al deposito di fibrille amiloide, è un riscontro piuttosto comune nei pazienti affetti da amiloidosi e prende il nome di amiloidosi cardiaca (AC). È infatti presente in circa il 70 % delle forme a catena leggera (AC AL), in alcune varianti della forma ereditaria da transtiretina (AC TTRm) e nella forma senile non mutata (AC TTRwt). Nel complesso l'amiloidosi cardiaca si presenta in queste tre forme nel 98 % dei casi, il restante 2 % è occupato da forme minori come la AA, l'amiloidosi da apolipoproteina A I, amiloidosi a catene pesanti e l'amiloidosi da peptide natriuretico atriale.

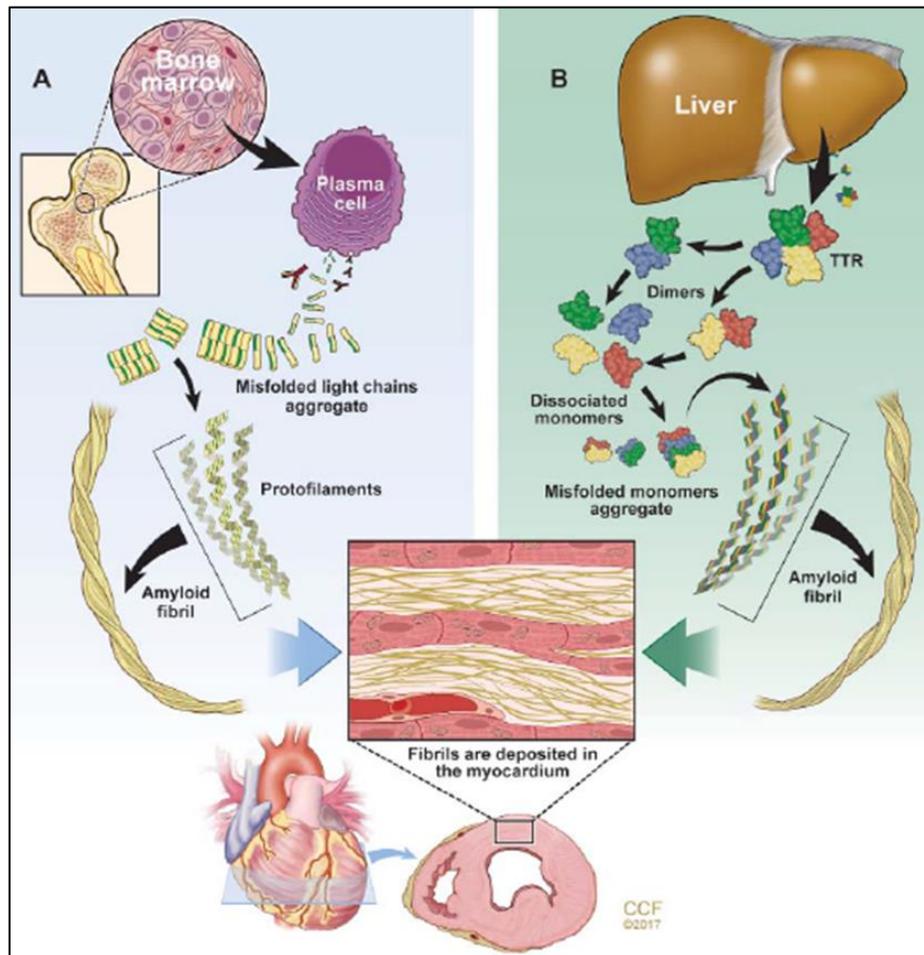


Figura 1. Genesi delle due forme più comuni di AC

2.1 AMILOIDOSI CARDIACA AL

L'amiloidosi cardiaca AL (AC AL) è la forma clinicamente significativa più comune, rappresentando 80 % dei casi, associata sempre a una discrasia plasmacellulare. E' infatti causata dalla proliferazione di un clone di plasmacellule che produce un eccesso di catene leggere, lambda (80 %) o kappa (20 %)⁷. E' stata diagnosticata quasi esclusivamente in soggetti di età superiore ai 40 anni⁸. Nel meccanismo patogenetico, insieme al misfolding, la formazione degli aggregati fibrillari e la loro deposizione nella matrice extracellulare, trova un ruolo la tossicità diretta delle catene leggere sui miociti⁹. Gli stadi iniziale sono caratterizzati da uno scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata, tuttavia un certo grado di

disfunzione sistolica è già presente e può essere evidenziata all'ecografia mediante la misurazione dello strain longitudinale e radiale¹⁰, con un tipico aspetto di risparmio apicale segno tuttavia poco accurato sia per sensibilità che specificità.

2.2 AMILOIDOSI CARDIACA DA TRANSTIRETINA

La transtiretina (TTR) è una proteina plasmatica, omotetramerica, prodotta dal fegato per il 95%, dai plessi corioidei e dall'epitelio pigmentato della retina per il restante 5% e funziona da trasportatore di tirosina e retinolo. Esistono due tipi di amiloidosi cardiaca legata alla transtiretina: la forma mutata (AC TTRm) responsabile del 18 % dei casi diagnosticati in vita e la forma wild type (AC TTRwt). Quest'ultima è probabilmente la forma di AC più comune e il dato è supportato da report autoptici che mostrano come la prevalenza sopra gli ottant'anni sia > 25%, e da studi che hanno impiegato tecniche diagnostiche non invasive che mostrano come in coorti selezionate la prevalenza raggiunge il 15 %.^{11 12 13}

In uno studio di pazienti con scompenso cardiaco a frazione d'eiezione preservata AC TTRwt è stata identificata nel 13 % dei casi¹⁴, mentre in un altro studio che ha preso in esame una coorte di pazienti affetti da HCM m-TTR è stata riscontrata nel 5 % dei casi¹⁵.

Ad oggi sono note più di 120 varianti nella TTRm che, insieme a una penetranza variabile, rendono ragione dell'eterogeneità fenotipica di questa malattia, che si può manifestare con un interessamento neurologico prevalente, cardiologico o misto^{16 17}.

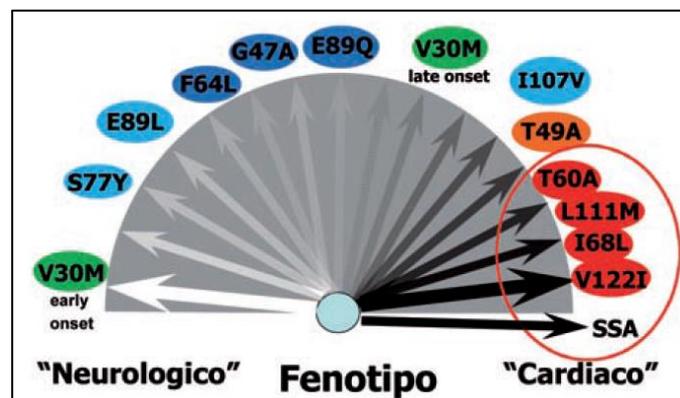


Figura 2. Spettro di correlazioni genotipo-fenotipo nella mTTR. Il fenotipo va da un interessamento esclusivamente neurologico ad uno cardiaco¹⁸

3. CLINICA

I pazienti con AC in genere mostrano insufficienza cardiaca con frazione d'eiezione conservata. La dispnea da sforzo è un sintomo comune, tuttavia, alcuni pazienti possono presentare insufficienza cardiaca destra con sintomi tipici come edema degli arti inferiori e ascite. Stanchezza e debolezza in realtà sono correlate a una bassa gittata cardiaca e sono spesso attribuite a sintomi non specifici dell'invecchiamento. A causa dell'aumento dello spessore delle pareti ventricolari, la prima diagnosi posta può essere quella di cardiomiopatia ipertrofica (HCM) con o senza ostruzione all'efflusso¹⁹. Una delle prime manifestazioni della amiloidosi cardiaca (CA) può essere la fibrillazione atriale, aritmia maggiormente presente nei pazienti con la forma TTRwt; anche l'ictus cardioembolico è frequentemente presente. La fibrillazione atriale può essere diagnosticata molti anni prima che venga presa in considerazione la diagnosi di amiloidosi cardiaca. Il blocco di branca e il blocco cardiaco completo (più comune nella forma TTR che in quella AL) possono portare all'impianto di un pacemaker. L'angina a coronarie indenni può essere presente e una rara presentazione potrebbe essere lo shock cardiogeno dovuto alla diffusione dell'ischemia. I pazienti anziani con CA possono presentare stenosi aortica low-flow-low-gradient²⁰. La sindrome del tunnel carpale bilaterale è presente nei pazienti con AL e TTR (più comune in TTRwt) e può precedere l'insufficienza cardiaca clinica di diversi anni²¹. La neuropatia periferica e autonoma possono verificarsi sia nella forma AL che in quella TTRm e non sono comuni nella forma TTRwt. Altri segni e sintomi della forma AL possono includere macroglossia e porpora periorbitale o entrambi (patognomica ma non frequente), proteinuria (in particolare nefrosica), claudicatio della mascella e sintomi gastrointestinali come diarrea e perdita di peso²².

4. DIAGNOSI

La diagnosi di amiloidosi cardiaca rappresenta una sfida per il clinico. Spesso infatti la diagnosi viene raggiunta a uno stadio già avanzato della patologia, sia per fattori legati alla malattia, che per fattori legati alla figura del medico. La presentazione clinica sfumata e aspecifica soprattutto nelle fasi iniziali, l'interdisciplinarietà di competenze a riguardo che include ematologia, nefrologia, neurologia e cardiologia, il fatto che per arrivare a una diagnosi è

necessario rivolgersi a centri di riferimento e l'errata credenza che si tratti di una patologia incurabile rendono ragione del fatto che nella pratica clinica quotidiana questa entità è spesso misconosciuta²³.

In uno studio su più di 500 pazienti con AL, 37 % dei quali con interessamento cardiaco, il tempo medio che intercorreva tra l'inizio dei sintomi e la diagnosi è risultato essere di 2 anni circa. 32 % dei pazienti ha riferito di essere stato visto da almeno 5 medici prima di essere diagnosticati correttamente. In particolare i cardiologi sono stati gli specialisti più volte consultati. Dati simili sono stati riportati anche per la AC TTR²⁴.

Per porre diagnosi di AC è quindi indispensabile un alto sospetto clinico. Particolare attenzione va prestata alla ricerca e all'individuazione, in pazienti con scompenso cardiaco, di elementi clinici, biochimici e strumentali caratteristici, indicati con il termine anglosassone di red flags (Tabella 2).

Il gold standard è la biopsia di tessuto cardiaco o extra- cardiaco con dimostrazione diretta di amiloide e tipizzazione mediante immunoistochimica o spettrometria a massa. Tuttavia in alcuni casi, l'integrazione tra esami laboratoristici, genetici e di imaging permette di fare diagnosi eziologica evitando un ulteriore approccio invasivo.

Pazienti anziani con ipertrofia ventricolare simmetrica soprattutto se in assenza di ipertensione.
ECG: bassi voltaggi del QRS
CLINICA (coinvolgimento extra cardiaco): storia di tunnel carpale bilaterale.
ECOCARDIOGRAMMA: Ipertrofia concentrica del VS e ipertrofia VD. Segni di infiltrazione: ispessimento del setto interatriale e delle valvole atrioventricolari, disturbi di conduzione AV, versamento pericardico circonferenziale. Funzione longitudinale del VS ridotta in presenza di FE conservata. Deformazione miocardica ridotta nei segmenti medio basali con risparmio apicale.
RISONANZA MAGNETICA: Segnale miocardico di T1 aumentato, volume extracellulare aumentato

Tabella 2. Red Flags per il sospetto di amiloidosi in pazienti ipertrofia ventricolare e/o scompenso cardiaco a frazione d'eiezione conservata in assenza di dilatazione del ventricolo sinistro

4.1 ESAMI EMATICI

La presenza di paraproteinemia monoclonale mediante dimostrazione di catene leggere libere all'immunofissazione sierica e urinaria, un alterato rapporto tra catene kappa/lambda (κ/λ 0.26 - 1.65) quantificate mediante il più sensibile s-FCL (serum free light chain assay)²⁵, nel contesto di un ecocardiogramma suggestivo, rafforza il sospetto di AC AL. L'insieme dei tre test ha una sensibilità del 99 %, offrendo la possibilità di un accurato rule out, per AC AL, in caso di triplice negatività. La presenza di un alterato rapporto tra catene libere da solo non è specifica per AC AL dal momento che fino al 5% della popolazione di età superiore a 65 anni è portatore di gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS)²⁶. Questo fatto può portare a una diagnosi errata di AC AL in pazienti in realtà affetti da AC TTR e concomitante MGUS (fino al 10 % di errore anche nei centri di riferimento)²⁷.

Il danno renale è più comune nell' AC AL ma può essere presente anche nelle altre forme di AC come conseguenza dell'insufficienza cardiaca e fattori concomitanti, non da ultimo il fattore anagrafico.

Ad oggi non ci sono esami ematici capaci di indentificare oligomeri di TTR e diagnosticare AC TTR.

Di comune riscontro sono livelli di troponina cardiaca (cTn) e di peptide natriuretico (BNP), sproporzionatamente alti rispetto allo stato emodinamico, conseguenza dell'infiltrazione interstiziale, della distorsione dell'architettura tissutale con progressivo stiramento e danno cellulare. Per entrambi è stato dimostrato un valore prognostico negativo e in combinazione alla funzione renale per la TTR^{28 29} e alla presenza di catene libere nel sangue per la AC AL³⁰ sono stati proposti per lo sviluppo di score in grado di stadiare la AC.

4.2 ELETTROCARDIOGRAMMA

Segno elettrocardiografico caratteristico per la AC è basso rapporto tra voltaggi del QRS e spessore di parete. I bassi voltaggi dei complessi QRS sono tipici, ma meno osservati e la frequenza varia a seconda del tipo di AC (45 % per AC AL, 30% per wt TTR e 16-45 % per mTTR). Un altro segno elettrocardiografico suggestivo, riscontrato in circa due terzi dei pazienti, è la

presenza di pattern pseudo infartuali come la scarsa progressione dell'onda R nelle derivazioni precordiali e/o la presenza di onde Q patologiche, in assenza di pregressa necrosi³¹.

4.3 ECOCARDIOGRAFIA

L'ecocardiogramma è lo strumento diagnostico principale in quanto permette di evidenziare l'interessamento cardiaco. Le alterazioni che devono far pensare a un AC sono l'ipertrofia biventricolare, l'ingrandimento bi atriale, il pattern restrittivo al doppler, l'ispessimento del setto interatriale e delle valvole atrio ventricolari, un versamento pericardico di modesta entità non tamponante e un aumentata eco riflettenza delle pareti con aspetto granulare³².

L'infiltrazione del miocardio da parte dell'amiloide altera la fisiologica deformazione del ventricolo sinistro solitamente a livello dei segmenti medio basali, che porta alla formazione di un gradiente di deformazione baso-apicale tipico delle fasi iniziali e che tende a ridursi con il progredire della disfunzione ventricolare³³. Un altro indice che si è rivelato essere molto accurato nel distinguere AC da altre forme di cardiomiopatia ipertrofica è il rapporto tra frazione d'eiezione e strain longitudinale. La funzione longitudinale del ventricolo sinistro può essere depressa anche a fronte di una frazione d'eiezione conservata.

4.4 RISONANZA MAGENTICA NUCLEARE CARDIACA

La risonanza magnetica cardiaca fornisce informazioni dettagliate sulla presenza, localizzazione e distribuzione dell'ipertrofia con un'accuratezza maggiore rispetto all'ecocardiografia. Supera i limiti imposti dalla dipendenza alla finestra acustica e permette un miglior studio di alcune aree del cuore che in ecografia possono risultare difficili da visualizzare, come ad esempio l'apice del ventricolo sinistro e il ventricolo destro. È il gold standard per la definizione morfologica ed è in grado, attraverso tecniche di mappaggio e l'utilizzo di contrasto, di individuare all'interno del miocardio la presenza di infiltrazione, fibrosi, edema e di quantificare il volume extracellulare (VEC).

Negli stadi iniziali della malattia il segnale T1 e il VEC sono elevati ancora prima della comparsa di late gadolinium enhancement (LGE) e, sebbene questi non siano specifici, possono essere utili al sospetto diagnostico quando la probabilità per-test è alta^{34 35}. La quantità di VEC correla

con la quantità di infiltrazione di sostanza amiloide³⁶, momento patogenetico che precede la fibrosi, ed è stato dimostrato essere un predittore indipendente di mortalità³⁷. Nelle sequenze tardive con mezzo di contrasto sono stati identificati tre pattern di LGE: assente, subendocardico, transmurale a tipica distribuzione non coronarica. VEC a differenza di LGE è un parametro quantitativo e può essere utilizzato per il monitoraggio della terapia³⁸. Infine attraverso le immagini T2 pesate è possibile valutare la presenza di edema³⁹.

La RMN permette la distinzione della AC rispetto alla HCM e alle sue fenocopie e fornisce informazioni utili anche nel differenziare i due principali tipi di amiloidosi cardiaca. Il coinvolgimento del ventricolo destro, un maggiore VEC, l'estensione transmurale e la maggior intensità del LGE sono caratteristiche riscontrate più comunemente nell'AC TTR, mentre la presenza di edema è caratteristica più comune nella AC AL⁴⁰.

4.5 SCINTIGRAFIA OSSEA

La scintigrafia ossea con tecnezio (tecnezio 99m-3,3-difosfono-1,2 acido popanodicarbossile: 99m TC DPD, tecnezio 99m pirofosfato:99m TC PYP) ha una elevata accuratezza diagnostica per la AC TTR con sensibilità del 92 % e specificità del 95 %⁴¹. I traccianti ossei si legano a microcalcificazioni associate ai depositi di amiloide TTR con elevata affinità. La scintigrafia ossea permette inoltre di individuare il coinvolgimento cardiaco nella AC TTR prima ancora dell'ecocardiografia e l'accumulo del tracciante sembra correlare con il grado di compromissione cardiaca^{42 43}. Vista l'elevata specificità ed il fatto che i pochi falsi positivi sono risultati essere pazienti con AC AL, è stata proposta, se esclusa la presenza di componente monoclonale, la possibilità di fare diagnosi con certezza di AC TTR senza ricorrere alla biopsia⁴⁴. Dal fatto che il tracciante si accumula con esclusività in presenza di amiloide e con affinità diversa a seconda del tipo di amiloide, deriva la possibilità di utilizzare la scintigrafia ossea anche come strumento per fare diagnosi differenziale tra i due tipi più frequenti di AC. L'utilizzo del rapporto tra il segnale del tracciante accumulato nel miocardio e il segnale proveniente dal torace controlaterale normalizza per l'accumulo dei traccianti nei tessuti molli e nelle ossa. Falsi positivi possono quindi essere presenti nel caso di fratture ossee omolaterali, calcificazioni a carico delle valvole cardiache, del polmone e del seno.

Falsi negativi sono dovuti alla mancata affinità per il tracciante nei casi di TTR B, caratterizzati dall'assenza di frammenti C- terminali nei depositi fibrillari di transtiretina. Le fibrille di tipo B sono state individuate ad oggi solo nelle varianti Val30Met a insorgenza precoce e in pazienti portatori della mutazione Thr114Cys⁴⁵.

4.6 BIOPSIA

La biopsia endomiocardica è il gold standard per la diagnosi³¹. La biopsia dei tessuti extra cardiaci (grasso addominale e ghiandole salivari) ha una bassa sensibilità (73 % in AC AL e 50 % in AC TTR)⁴⁶, e se non può essere utilizzato per l'esclusione di malattia, nei casi positivi è utile come conferma definitiva evitando una procedura più invasiva.

Il campione istologico viene colorato con rosso Congo per dimostrare la presenza della patognomica birifrangenza verde, alla luce polarizzata. La tipizzazione del tipo di amiloide viene eseguita con metodiche di immunistochemica o mediante spettrometria di massa.

4.7 TEST GENETICI

Nella AC TTR i test genetici permettono di distinguere la forma wild type da quella mutata. Sono state ad oggi individuate più di 120 mutazioni che causano la TTRm, a trasmissione autosomica dominante. La variante più comune negli Stati Uniti è Val122Ile (circa 40%), responsabile di forme con fenotipo cardiaco, mentre Val30Met è la variante più comune nel resto de mondo responsabile di forme a prevalente fenotipo neurologico. Le varianti Ile68Leu e Leu11Met sono a fenotipo cardiaco con prognosi sfavorevole e presenti in Italia e Danimarca¹¹.

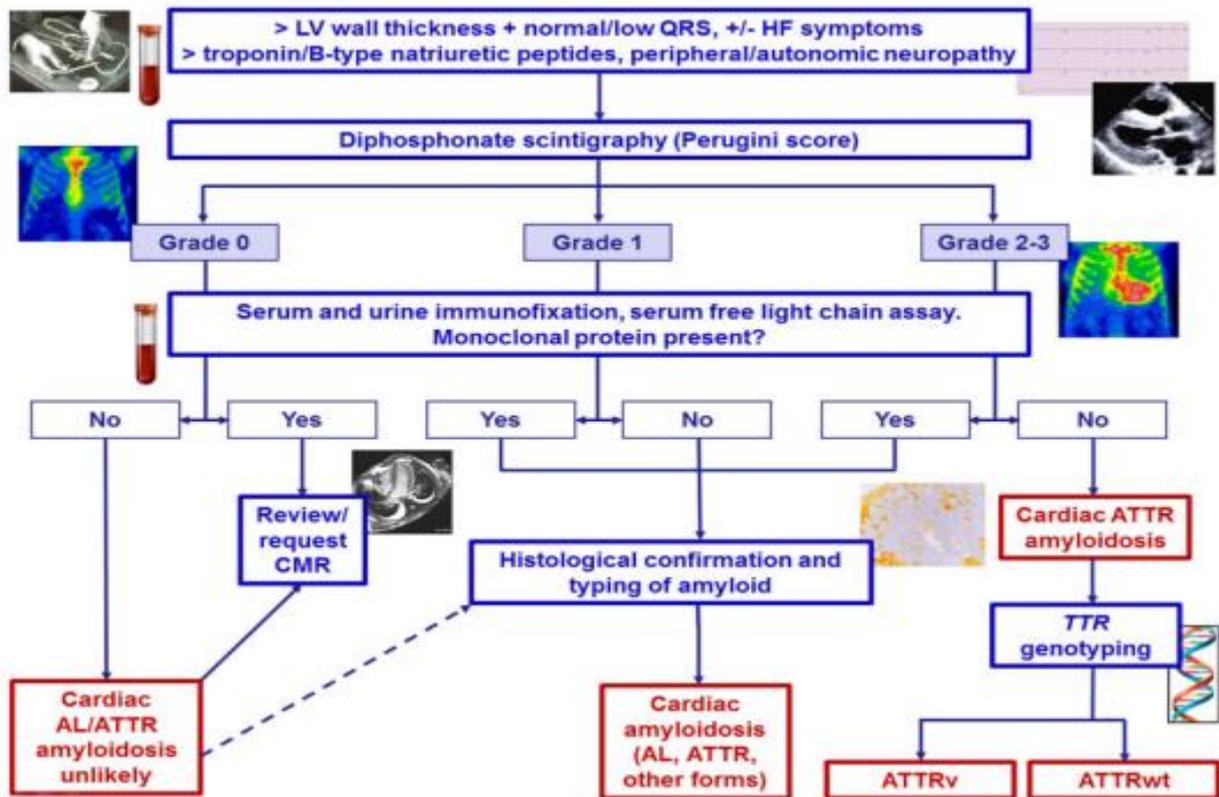


Figura 3. Algoritmo per la diagnosi di AC

5. TERAPIA

5.1 AMILOIDOSI CARDIACA AL

Nella AC AL le proteine precursore, le catene leggere, non sono prodotte in modo costitutivo, ma da un piccolo clone di plasmacellule indolente che può essere controllato, o possibilmente, eradicato. Nell'AC AL, la soppressione della sintesi dei precursori dell'amiloide, si è tradotta in significativi miglioramenti della sopravvivenza media che è quasi raddoppiata nell'ultimo decennio, con una percentuale significativa di pazienti (dal 30% al 40%) che sopravvivono oltre i 10 anni⁴⁷. Ulteriori miglioramenti nel risultato dovrebbero essere ottenuti dalla combinazione di chemioterapia con immunoterapie che promuovono il riassorbimento dei depositi di amiloide e da immunoterapie indirizzate sui cloni di plasmacellule. Gli obiettivi della terapia sono la rapida eliminazione del precursore dell'amiloide e un maggiore riassorbimento

dei depositi di amiloide, con lo scopo di migliorare rapidamente la funzione cardiaca per migliorare la qualità della vita dei pazienti e prolungarne la sopravvivenza. La sfida è fornire la terapia efficace massima tollerata in un paziente fragile che necessita di una risposta rapida e significativa. La ridotta riserva funzionale di organi coinvolti dall'amiloide aumenta la tossicità del trattamento nell'amiloidosi AL, rendendo critico un approccio al trattamento adattato al rischio.

Le strategie terapeutiche, mutate da quelle in uso per il mieloma multiplo, cambiano a seconda della fragilità del paziente, del grado di compromissione cardiaca, della risposta completa o parziale al trattamento e della tollerabilità del trattamento. L'efficacia del trattamento sulla mortalità è dipendente dallo stadio di malattia^{48 49}.

I regimi chemioterapici impiegati prevedono melphalan, ciclofosfamide, bortezomib, desametsone da soli o in combinazione. Il trapianto di cellule staminali autologhe ha mostrato risultati positivi quando associato alla chemioterapia in pazienti al I° e II° stadio di malattia⁵⁰. La terapia di supporto è vitale per guadagnare tempo, mentre la chemioterapia esercita la sua efficacia. Il coinvolgimento multisistemico con disfunzione cardiaca, renale e del sistema nervoso autonomo richiede un attento monitoraggio multidisciplinare. La morte cardiaca improvvisa è comune nei pazienti con amiloidosi cardiaca AL ed è generalmente causata dalla dissociazione elettromeccanica. Per questo motivo, i defibrillatori cardiaci impiantabili, sebbene possano interrompere con successo le aritmie, non hanno migliorato la sopravvivenza globale⁵¹. I dispositivi di assistenza ventricolare sinistra sono tecnicamente fattibili per i pazienti con grave insufficienza cardiaca da amiloidosi avanzata, ma la loro utilità clinica è incerta. I trapianti renali e cardiaci sono indicati in pazienti che presentano un coinvolgimento persistente e avanzato degli organi nonostante la chemioterapia ematologica. Il trapianto cardiaco può anche essere considerato in anticipo nei giovani pazienti con coinvolgimento cardiaco grave isolato e deve essere seguito da un'efficace chemioterapia per prevenire il ripetersi dell'amiloidosi nell'innesto⁵².

5.2 AMILOIDOSI CARDIACA DA TRANSTIRETINA

Il target terapeutico è la riduzione del burden amiloidotico e della compromissione cardiaca attraverso la soppressione, la stabilizzazione della proteina precursore e la rimozione dei depositi di amiloide (Figura 4).

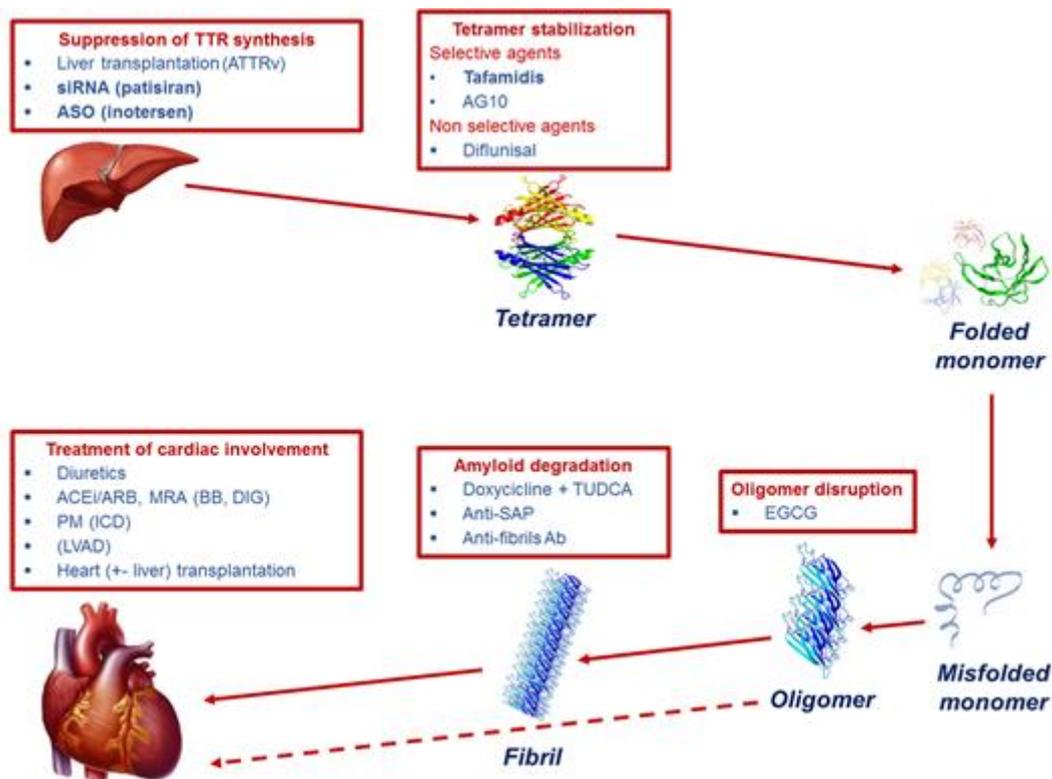


Figura 4. Target terapeutici nell'AC TTR

5.2.1 INIBIZIONE DELLA SINTESI DI TRANSTIRETINA

Il trapianto di fegato ortotopico è stato proposto per la prima volta nel 1990 come trattamento potenzialmente curativo della polineuropatia correlata alla TTRm. Il trapianto di fegato rimuove la fonte di molecole di TTR mutate e prolunga la sopravvivenza, con un tasso di sopravvivenza a 20 anni del 55,3%. Superiore indice di massa corporea, età più giovane (<50 anni), durata della malattia più breve, e le mutazioni VAL30MET vs. non-VAL30MET sono state identificate come predittori indipendenti di migliore sopravvivenza⁵³. Tuttavia, l'accumulo di tessuto di TTR può continuare dopo il trapianto di fegato, probabilmente perché le fibre di transtiretina precedentemente depositate favoriscono il successivo deposito di TTRwt. Questo

è stato dimostrato da uno studio autoptico dove il rapporto tra la quantità di TTR variante e wild type dopo trapianto si invertiva a favore della seconda⁵⁴. Inoltre, i pazienti con mutazione Val30Met sottoposti a trapianto di fegato hanno mostrato un aumento dello spessore del setto interventricolare al monitoraggio ecocardiografico seriato, indice di deposizione attiva di TTRwt nel cuore trapiantato⁵⁵. Il trapianto combinato di cuore e fegato è possibile in giovani pazienti con cardiomiopatia TTRm e studi su piccole coorti suggeriscono un esito prognostico migliore rispetto al solo trapianto cardiaco. D'altra parte, al momento non è chiaro se il trapianto di fegato sia necessario nella mutazione Val122Ile (cioè la più comune Mutazione TTR che causa cardiomiopatia). Disponibilità limitata di organi, esclusione dei pazienti più anziani e di quelli con malattia sistemica avanzata e rischi correlati all'intervento chirurgico e all'immunosoppressione permanente rappresentano ulteriori problemi al trapianto. Il trapianto di fegato non è un'opzione per i pazienti con TTRwt⁵⁶.

PATISIRAN, un oligonucleotide sintetico a doppio filamento che interferisce con la produzione di RNA della TTR anormale, riducendo così l'accumulo di tessuto di depositi di amiloide, è stato testato nello studio APOLLO, in 148 pazienti adulti TTRm con polineuropatia e ha mostrato un miglioramento della compromissione neurologica (valutati mediante 10 minute walking test e stato nutrizionale). Inoltre, è stata dimostrata una riduzione significativa di NT-proBNP e dello strain longitudinale del LV.

Nella sottopopolazione cardiaca dello studio APOLLO (n = 126; 56% della popolazione totale), il patisiran ha ridotto: lo strain medio globale di LVH (P = 0.017) (P = 0.015), NT-proBNP (P <.001), ed esiti cardiaci avversi (tassi di ricoveri cardiaci e morte per qualsiasi causa; HR, 0,54), rispetto al placebo al 18° mese, suggerendo che patisiran può arrestare o invertire la progressione delle manifestazioni cardiache dell'amiloidosi TTRm. Inoltre, in un'altra analisi post-hoc di questo studio, patisiran (n = 90) rispetto al placebo (n = 36) ha migliorato lo strain longitudinale globale a 18 mesi, con il maggiore aumento differenziale osservato nella regione basale (P = 0.006) e nessuna differenza significativa nelle regioni medie e apicali tra i gruppi⁵⁷. Questi risultati hanno portato all'approvazione di patisiran per il trattamento di adulti con polineuropatia correlata ad TTRm sia negli Stati Uniti che nell'Unione europea, sebbene

patيسان sia stato approvato in Europa solo per il trattamento della malattia da lieve a moderata (Fase 1–2).

INOTERSEN, è un inibitore oligonucleotide antisense a filamento singolo, che si lega selettivamente al mRNA di TTR mutata e wild type e ne previene la sintesi, riducendo così l'ulteriore deposizione di amiloide nei tessuti. E' stato testato nello studio NEURO-TTR in 112 su 172 partecipanti con AC TTRm. Inotersen ha migliorato il decorso della malattia neurologica e la qualità della vita in questi pazienti. Tuttavia, il farmaco ha causato un tasso più elevato di glomerulonefrite (3%) e trombocitopenia (3%), con un decesso associato a trombocitopenia di grado 4. Gli autori hanno suggerito che questi effetti avversi di inotersen possono essere gestiti efficacemente con un monitoraggio potenziato⁵⁸. Sulla base di questi risultati, inotersen è stato recentemente approvato nell'UE per il trattamento della polineuropatia in stadio 1 o 2 in pazienti adulti con TTRm ed è in fase di valutazione negli Stati Uniti e in Canada. Non sono attualmente disponibili risultati dell'effetto farmacologico sull'AC.

5.2.2 STABILIZZATORI DEI TETRAMERI DI TTR

TAFAMIDIS, un derivato dei benzotiazoli, è una piccola molecola che inibisce la dissociazione dei tetrameri TTR legando i siti di legame T4.

Nello studio multicentrico, randomizzato controllato, in doppio cieco di fase 3 TTR-ACT⁵⁹, 441 pazienti con cardiomiopatia da TTR (definita come anamnesi di HF, ipertrofia LV all'ecocardiografia o dimostrazione della deposizione di amiloide TTR) sono stati randomizzati in un rapporto 2: 1: 2 per ricevere tafamidis 80 mg, tafamidis 20 mg, o placebo per 30 mesi. Il trattamento con tafamidis è stato associato a una mortalità per tutte le cause inferiore rispetto al placebo [78 su 264 (29,5%) rispetto a 76 di 177 (42,9%); hazard ratio 0,70, intervallo di confidenza al 95% (CI) 0,51-0,96] e un tasso più basso di ricoveri cardiovascolari con un rapporto di rischio relativo di 0,68 (0,48 all'anno contro 0,70 all'anno; IC al 95% 0,56-0,81). Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier hanno mostrato che il tafamidis si è associato ad una riduzione della mortalità per tutte le cause, con le curve divergenti dopo circa 18 mesi di trattamento. Inoltre, il tafamidis era in grado di alleviare i sintomi, come dimostrato dal più

basso tasso di declino del 6MWT e dalla qualità della vita (misurata attraverso il Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire-Overall Summary) a 30 mesi (entrambi $P < 0,001$). Il farmaco era anche ben tollerato, con un'incidenza e un tipo di eventi avversi simili tra il tafamidis e il gruppo placebo; inoltre, diarrea e infezioni del tratto urinario, cioè eventi avversi comuni nei pazienti con TTR, erano meno comuni tra i pazienti trattati con tafamidis rispetto al placebo. È in corso una valutazione dettagliata degli effetti di tafamidis su NT-proBNP, troponine ed ecocardiogramma. Tra i sottogruppi di pazienti, tra cui TTRwt vs. TTRm, New York Heart Association (NYHA) Classe I – II vs. III e dose di tafamidis (80 mg vs. 20 mg), differenze in termini di mortalità per tutte le cause, frequenza di ricoveri per malattie cardiovascolari sono risultate a favore del tafamidis rispetto al placebo. Al contrario, tra i pazienti in classe NYHA al basale, quelli che hanno ricevuto il tafamidis hanno avuto tassi di ricovero più elevati, probabilmente a causa di una sopravvivenza più lunga durante una fase più grave della malattia⁵⁹.

Tafamidis è il primo farmaco in grado di modificare la malattia ad essere approvato per l'uso in pazienti adulti con polineuropatia TTRm in stadio precoce, mentre non arresta la progressione della malattia in pazienti con polineuropatia in stadio 2–3. È attualmente disponibile in Europa e Giappone per il trattamento della polineuropatia correlata ad TTRm. In seguito ai risultati del TTR AC, tafamidis ha ricevuto la designazione Breakthrough Therapy dalla FDA per il trattamento di pazienti con cardiomiopatia TTR, che può preludere a una valutazione accelerata di tafamidis come terapia per questa condizione.

AG10 è uno stabilizzatore di membrana che ha una sequenza aminoacidica simile a quella della TTR iper-stabilizzata della mutazione Thr119Met. È in corso uno studio di fase III in AC TTRm e TTRwt.

DIFLUNISAL è un farmaco antinfiammatorio non steroideo che si è dimostrato in grado di stabilizzare i tetrameri TTR in vitro. In uno studio randomizzato di Fase 3, 130 pazienti con TTR - FAP con neuropatia sintomatica sono stati assegnati in modo casuale a diflunisal 250 mg o placebo per via orale due volte al giorno per 2 anni⁶⁰. Questo studio ha dimostrato che diflunisal ha ridotto significativamente la progressione della compromissione neurologica e ha

conservato la qualità di vita, rispetto al placebo. Tuttavia, il diflunisal non ha avuto effetti benefici sul miglioramento dello stato cardiaco. Sebbene il dosaggio di diflunisal sia stato generalmente ben tollerato in questo studio, la sua attività inibitoria sulla cicloossigenasi può causare danni renali e gastrointestinali, come insufficienza renale, lesioni della mucosa gastrica, sovraccarico di volume e ipertensione. La possibilità di eventi avversi potenzialmente letali rimane una delle maggiori preoccupazioni. Pertanto, il diflunisal rimane da usare off-label nel trattamento di TTR-FAP.

TE VERDE. L'epigallocatechingallato, un noto polifenolo presente nel tè verde, può inibire la formazione di fibrille amiloide TTR e disaggregare i depositi di amiloide. Due studi osservazionali hanno rivelato che 12 mesi di consumo di tè verde hanno ridotto significativamente la massa del ventricolo sinistro dal 6 al 13% valutata con CMR in pazienti TTRwt-CA, suggerendo che gli estratti di consumo di tè verde hanno un effetto inibitorio sulla progressione della malattia^{61 62}. Tuttavia, questi studi sono studi osservazionali aperti e limitati a campioni di piccole dimensioni.

5.2.3 DEGRADAZIONE E RIMOZIONE DELLE FIBRE DI AMILOIDE

Diverse molecole idrofobiche sono efficaci nel destabilizzare e disaggregare le fibre amiloidi, e promuovono il riassorbimento dei depositi amiloidi da parte dei macrofagi tissutali. Le tetracicline, compresa la doxiciclina, si sono dimostrate in grado di causare una completa disaggregazione delle fibre amiloidi in vitro, generando specie molecolari non tossiche. La combinazione di doxiciclina e acido tauroursodesossicolico (TUDCA) ha un effetto più pronunciato, causando persino la completa eliminazione dell'amiloide dai tessuti nei modelli animali⁶³.

L'amiloide sierica P (SAP) è una glicoproteina plasmatica sintetizzata dal fegato, che stabilizza e protegge le fibrille amiloidi dalla degradazione proteolitica. Miridesap è una piccola molecola che lega SAP circolante e ne favorisce la clearance epatica. Inizialmente è stata dimostrata una riduzione del carico di amiloide nei tessuti; in seguito, è stato interrotto un

trail in fase 1 e da allora lo sviluppo della terapia con anticorpi anti-SAP si è interrotto e questo approccio non è più valutato. Al contrario, un anticorpo monoclonale progettato per colpire specificamente i depositi di amiloide TTR (PRX004) è entrato nella valutazione clinica con uno studio di fase 1 in corso su TTRm.

6. PREVENZIONE DELLA MORTE CARDIACA IMPROVVISA

Metà dei pazienti con amiloidosi cardiaca muore improvvisamente⁶⁴. La morte è spesso attribuita alla dissociazione elettromeccanica, ma in alcuni casi è descritta l'interruzione efficace di aritmie ventricolari sostenute con ICD. Aritmie ventricolari durante il monitoraggio ambulatoriale sono riportate nel 0,25% dei pazienti con AC AL⁶⁵, ma la loro presenza non sembra essere un fattore predittivo di SCD. Livelli elevati di troponine cardiache e di tipo NT-pro-BNP sono marker sensibili del coinvolgimento cardiaco e predicono un esito avverso nei pazienti con AC AL, ma non ci sono dati che suggeriscono che questi biomarcatori possano essere utilizzati per identificare i pazienti che potrebbero beneficiare di un ICD. Sulla base di tali dati limitati, in accordo con le linee guida ESC 2015 sulla prevenzione della morte cardiaca improvvisa l'ICD deve essere preso in considerazione nei pazienti con AC AL o AC TTRm che presentano aritmie ventricolari sostenute e con aspettativa di vita maggiore di 1 anno. Non ci sono dati sufficienti per fornire raccomandazioni sulla profilassi primaria⁶⁶.

STUDIO 1

Analisi di prevalenza della Amiloidosi Cardiaca in una popolazione di pazienti afferenti a centri di riferimento per sospetta cardiomiopatia ipertrofica

7.1 RAZIONALE E OBIETTIVO DELLO STUDIO 1

L'amiloidosi cardiaca è una malattia con un decorso, dalla diagnosi all'exitus, rapidamente progressivo in assenza di terapia. Nuovi farmaci in grado di modificare la prognosi e la qualità della vita stanno diventando disponibili come efficace opzione terapeutica, soprattutto se iniziati negli stadi precoci di malattia⁵⁹. Porre diagnosi di amiloidosi cardiaca può essere difficile, particolarmente se al di fuori dei Centri di Riferimento, dove una minor consapevolezza della malattia da parte del medico unita a una presentazione clinica del tutto aspecifica portano spesso all'attribuzione di una diagnosi errata o a ritardarla²³. Sebbene l'epidemiologia dell'amiloidosi cardiaca non sia stata ancora definita con certezza, recenti studi hanno dimostrato una prevalenza non trascurabile in specifiche coorti di pazienti^{14 15}. La manifestazione morfologica prevalente nell'amiloidosi cardiaca è l'ipertrofia ventricolare sinistra, tuttavia ad oggi in letteratura mancano dati che ne descrivano la prevalenza nella HCM.

L'obiettivo del nostro studio è stato descrivere la prevalenza dell'amiloidosi cardiaca nei pazienti di età ≥ 40 anni con diagnosi iniziale di cardiomiopatia ipertrofica, al fine di fornire una stima quantitativa di quei pazienti che potrebbero beneficiare di un trattamento specifico.

7.2 MATERIALI E METODI

Nel periodo dal 2014 al 2019 sono stati arruolati, nei centri di Firenze e Milano Auxologico, consecutivamente pazienti di età ≥ 40 anni con evidenza di ipertrofia ventricolare sinistra⁶⁷, posta in altri centri non specializzati nelle cardiomiopatie. I pazienti con età < 40 anni sono stati esclusi dallo studio poiché la prevalenza di CA in questa fascia di età è epidemiologicamente irrilevante⁶⁸.

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico di entrambi i centri per le cardiomiopatie e tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato.

DIAGNOSI DI AMILOIDOSI CARDIACA

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione clinica sistematica e test genetici mediante un pannello dedicato alle cardiomiopatie NGS (9 geni sarcomerici associati all'HCM, gene TTR e GLA)⁶⁹ e le varianti sono state classificate secondo le linee guida dell'American College of Genetics⁷⁰. È stata prestata particolare attenzione all'identificazione di sintomi, segni e dati clinici delle patologie che mimano HCM, compresi quelli relativi alla CA, sulla base di una valutazione sistematica delle red flags, come descritto nel secondo paragrafo dei risultati. Nei pazienti con sospetto clinico per CA, definiti dalla presenza di almeno una red flag (Tabella 3) sono stati eseguiti esami del sangue e delle urine (elettroforesi proteica, immunofissazione e dosaggio delle catene leggere libere nel siero) e scintigrafia con tracciante osseo. Nei pazienti con espansione monoclonale delle catene leggere libere, è stata eseguita la biopsia del tessuto addominale sottocutaneo. In un caso, è stato richiesto il sequenziamento di ApoA1 Sanger.

7.3 ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi in percentuale, media e deviazione standard o mediana con un intervallo interquartile. Il t-Student test è stato utilizzato per confrontare variabili continue mentre i dati categoriali sono stati valutati tra i gruppi con il X^2 test o con il test di Fisher, a seconda dei casi.

7.4 RISULTATI

Sono stati studiati un totale di 393 pazienti (60 ± 13 anni, 56% maschi) con una diagnosi iniziale di HCM (diagnosticata in altri centri non specializzati nelle cardiomiopatie) ed età ≥ 40 anni. I pazienti erano per lo più sintomatici, con una frazione d'eiezione (FE) di $65 \pm 7\%$; in particolare i pazienti con AC erano più sintomatici dei pazienti con HCM (Figura 5).

Dei 393 pazienti: 78 pazienti (20%) avevano una storia di fibrillazione atriale (FA) e 70 (18%) avevano un'ostruzione significativa del tratto di efflusso del ventricolo sinistro. Alla valutazione iniziale, solo 3 pazienti (0,8%) avevano un ICD e 10 (2,5%) un pacemaker (PM). (Tabella 3).

	Overall N = 393	HCM N = 352	CA N = 35	AFD N = 6
DEMOGRAPHICS				
Age at diagnosis	60±13	60±13	72±10**	55±7
<50	80 (23)	78 (22)	1 (2.8)**	1 (17)
>70	90 (26)	82 (23)	22 (62.8)**	1 (17)
Gender – men, N (%)	221 (56)	198 (54)	28 (80)**	5 (83)
CLINICAL CHARACTERISTICS				
NYHA				
I	191 (49)	180 (52)	6 (16)**	5 (83)
II	161 (41)	143 (40)	17 (50)**	1 (17)
III	41 (11)	29 (9)	12 (34)**	0
PM/ICD	13 (3.7)	10 (3.8)	2 (6.3)	1 (17)
History of AF	75 (22)	62 (20)	13 (41)**	1 (17)
ECG AND HOLTER MONITORING				
AF at diagnosis	75 (22)	69 (22)	6 (19)	0
AVB>II	5 (1.4)	1 (0.3)	4 (13)**	0
NSVT	25 (7.3)	18 (5.7)	7 (21.8)**	1 (17)
Pauses (>3s)	5 (1.4)	3 (0.93)	2 (6.25)	0
ECHOCARDIOGRAFIC EVALUATION				
LAD, mm	46±21	43±7	62±31**	41±3
LVMWT, mm	18±3	18±3	19±4*	17±2
LVEDD, mm	44±7	46±6	43±4**	42±4
Posterior Wall, mm	9±4	9±2	11±4**	10±4
PAPs, mmHg	30±12	26±10	39±14	22±6
EF, %	61±6	65±7	55±9**	59±9
e/e'	12.0±3.5	13.0±5.5	11.1±4.5*	12.1±2.5

Tabella 3. Caratteristiche cliniche basali dei pazienti del nostro studio con età superiore a 40 ed iniziale diagnosi di HCM. P values <0.05 è indicato da *, mentre P values <0.001 con **

HCM: cardiomiopatia ipertrofica; CA: amiloidosi cardiaca; AFD: malattia di Anderson Fabry; PM: Pacemaker; ICD: defibrillatore impiantabile; AF: fibrillazione atriale; AVB: blocco atrioventricolare; NSVT: tachicardia ventricolare non sostenuta; LAD: diametro atrio sinistro; LVMWT: massimo spessore del ventricolo sinistro; LVEDD: diametro telediastolico del ventricolo sinistro; PAP: pressione arteriosa polmonare; EF: frazione d'iezione.

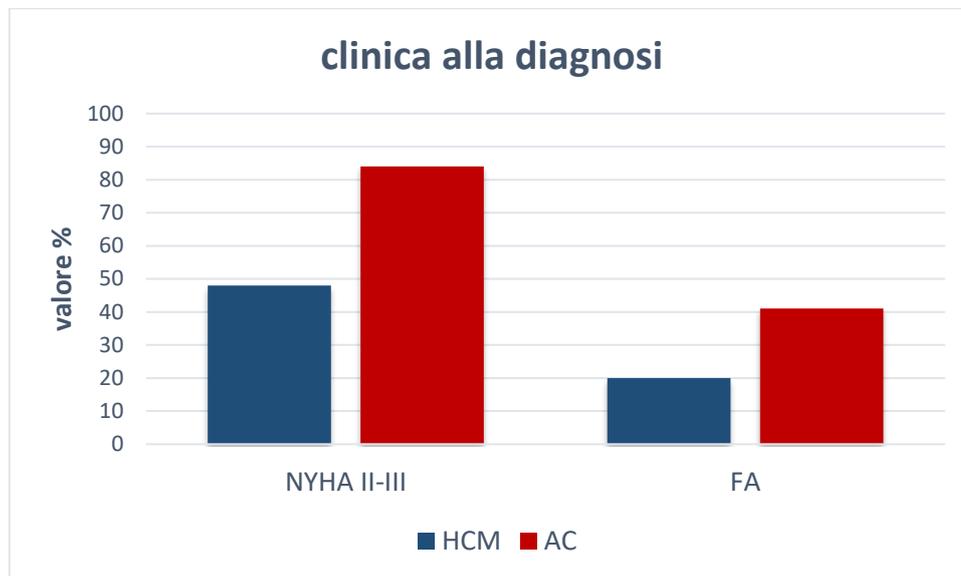


Figura 5. HCM: Hypertrophic cardiomyopathy; AC amiloidosi cardiaca; FA fibrillazione atriale; NYHA: New York Heart Association.

A seguito dell'esecuzione del test genetico con pannello NGS, 289 pazienti (73%) avevano almeno una variante probabile/patogenetica, di cui 265 (67%) con varianti sui geni per le proteine sarcomeriche e 11 (3%, 44-89 anni) con varianti del gene TTR. Inoltre, 6 pazienti (1,5%, 42-72 anni) presentavano varianti patogenetiche del gene GLA associate alla malattia di Fabry (AFD). Un altro paziente, di 72 anni, senza variante del gene TTR ma con storia familiare di CA e malattia renale cronica (CKD), è stato sequenziato sul gene ApoA1 ed è stata identificata una variante patogenetica (Leu75Pro). Pertanto, a 12 pazienti (3,5%) è stata diagnosticata l'amiloidosi cardiaca su base genetica.

Dei 104 (26%) pazienti con genetica negativa, 29 pazienti con almeno una red flag per amiloidosi cardiaca sono stati sottoposti a ulteriori approfondimenti. Le caratteristiche principali considerate sono state: livelli di pro-BNP sproporzionatamente aumentati (n = 5), pregressa sindrome del tunnel carpale (n = 6), versamento pericardico (n = 9), ipertrofia ventricolare sinistra simmetrica (n = 8), aumentata ecoriflettenza del miocardio con aspetto granuloso (n = 17), bassi voltaggi ECG (n = 11), blocco atrioventricolare > II (n = 5), malattia renale cronica (n = 4) (Figura 6).

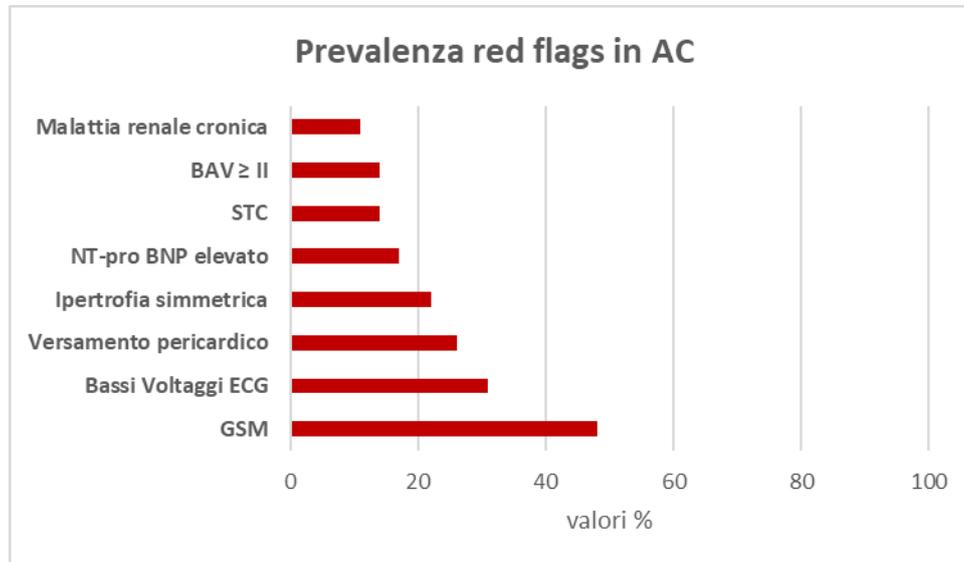


Figura 6. Prevalenza red flags nei pazienti con amiloidosi cardiaca (AC). BAV = blocco atrioventricolare, STC sindrome del tunnel carpale, GSM = granular sparkling myocardium (aspetto granulare del miocardio all'ecocardiogramma).

Ciò ha portato all'identificazione di 23 ulteriori casi di AC, tra cui 3 AL-CA e 20 wt-TTR CA. I restanti 87 pazienti senza segni suggestivi per AC sono stati classificati come HCM senza mutazioni identificabili (Figura 7).

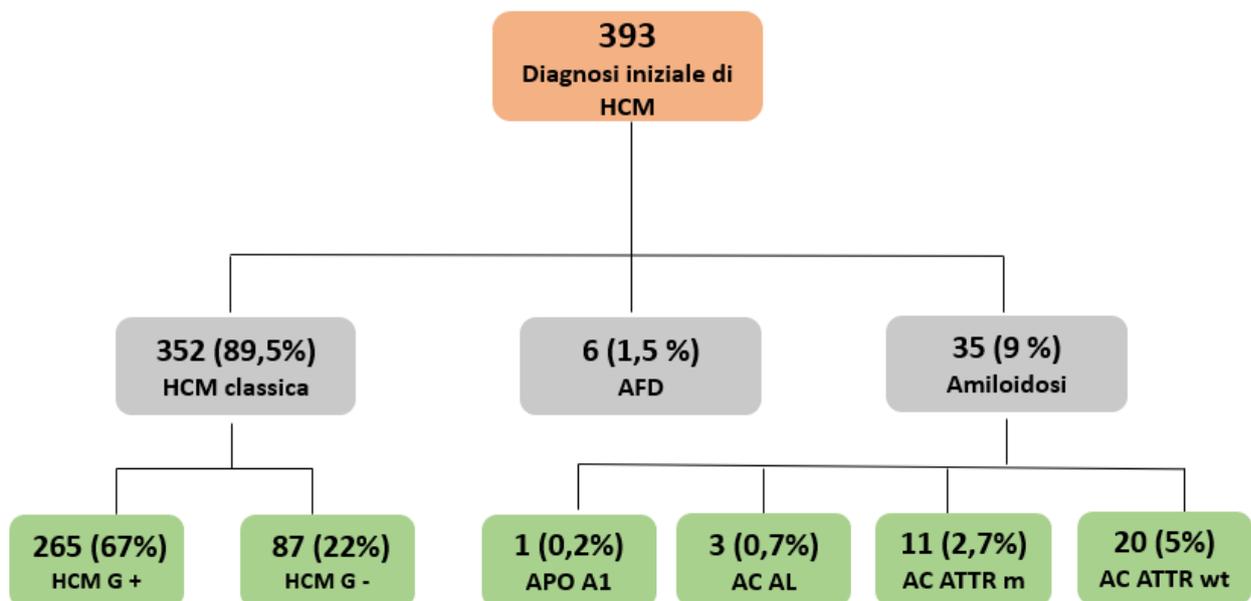


Figura 7. Eziologia dei pazienti dello studio

Pertanto complessivamente, dei 393 pazienti studiati, 35 (9%) sono stati diagnosticati con AC (Tabella 4).

AC	SESSO	ETA' ALLA DIAGNOSI	MOTIVO della VISITA	TC	NT-proBNP	PM/ICD	FA	BAV	SMS	SMP	Granular Sparkling	FE	TVNS
ATTR m	M	89	FA	-		-	-	-	17	8	+	41	-
ATTR m	F	52	screening	-	19082	-	-	-	15	11	+	63	-
ATTR m	M	44	screening	-	780	-	-	-	16	7	-	36	-
ATTR m	M	77	sintomi SC	-	2976	-	-	-	17	13	+	53	-
ATTR m	M	60	incidentale	+	990	-	-	-	15	9	-	66	-
ATTR m	M	70	sintomi SC	-	600	-	-	-	15	7	+	64	-
ATTR m	M	52	sintomi SC	-	3349	-	-	-	18	8	+	61	-
ATTR m	M	69	sintomi SC	-	3826	-	-	+	23	18	-	66	-
ATTR m	F	62	incidentale	-	1203	-	-	-	21	10	+	60	-
ATTR m	F	80	sintomi SC	+	5330	-	-	-	18	9	-	60	+
ATTR m	M	64	FA	-	3466	-	+	-	19	12	-	40	+
ATTR wt	M	68	incidentale	-	887	-	-	-	18	16	-	40	+
ATTR wt	M	74	sintomi HF	-	2780	-	-	-	22	15	+	52	-
ATTR wt	F	81	incidentale	-		-	-	+	15	13	-	65	-
ATTR wt	M	79	sintomi SC	-	3461	-	-	-	18	10	-	43	+
ATTR wt	M	73	sintomi SC	+	469	-	-	-	21	11	-	65	+
ATTR wt	M	69	sintomi SC	+	2766	-	-	-	14	12	-	52	-
ATTR wt	M	83	sintomi SC	-		+	-	+	16	14	-	63	-
ATTR wt	M	86	sintomi SC	-		-	-	-	19	9	+	60	-
ATTR wt	M	84	sintomi SC	+	5498	-	+	-	21	10	-	51	+
ATTR wt	M	86	sintomi SC	-	1986	-	+	-	15	12	+	63	-
ATTR wt	M	75	sintomi SC	-	5330	-	-	-	26	9	+	51	-
ATTR wt	M	78	sintomi SC	-	8976	-	-	-	19	12	+	48	-
ATTR wt	M	71	sintomi SC	-		-	-	-	20	18	+	60	+
ATTR wt	M	89	FA	-	12098	-	+	-	24	8	-	51	-
ATTR wt	M	78	FA	-	9012	-	+	-	26	4	-	71	-
ATTR wt	M	72	sintomi SC	-	7889	-	+	-	24	9	+	52	-
ATTR wt	M	73	sintomi SC	+	469	-	-	-	26	9	+	55	-
ATTR wt	M	73	incidentale	-	1080	-	-	-	19	15	-	51	+
ATTR wt	F	70	incidentale	-	279	-	-	-	22	11	-	65	-
ATTR wt	M	84	incidentale	-	2321	-	-	-	20	12	+	55	-
AL	M	64	incidentale	-	1158	-	-	-	15	12	+	40	-
AL	F	54	sintomi SC	-		+	-	-	20	20	-	60	-
AL	M	68	sintomi SC	-		-	+	-	15	10	-	53	-
APO A1	F	72	screening	-	2350	-	-	-	15	11	+	40	-

Tabella 4. Caratteristiche clinico-strumentali dei pazienti con amiloidosi cardiaca (AC). TC = sindrome del tunnel carpale. BAV = blocco atrioventricolare \geq II grado. FA = fibrillazione atriale. SMS = spessore massimo del setto interventricolare. SMP = spessore massimo della parete posteriore. FE = frazione d'eiezione. TVNS = tachicardia ventricolare non sostenuta.

La prevalenza di AC aumenta con l'età: 1/81 (1%) all'età di 40-49 anni, 2/111 (2%) all'età di 50-59 anni, 8/93 (9%) all'età di 60-69 anni, 15/67 (21%) all'età di 70-79 anni e 9/35 (26%) a età \geq 80 (p per trend $<0,01$) (Figura 8). Dei 192 pazienti di età <60 anni, solo 3 avevano AC (2%, 2 AL-CA, 1 m-TTR CA), mentre nei 102 di età ≥ 70 , 21 (21%) avevano AC. I pazienti con AC erano più anziani (72 ± 10 vs 59 ± 13 anni, p $<0,01$), con maggiore prevalenza di AF (13, 41% vs 62,

20%; $p < 0,01$) e EF inferiore ($55 \pm 9\%$ vs $65 \pm 7\%$, $p < 0,01$). Come previsto, i pazienti con AL-CA erano più giovani (62 ± 13) rispetto a AC TTRm (66 ± 12) e AC TTRwt (77 ± 8) ($p < 0,01$).

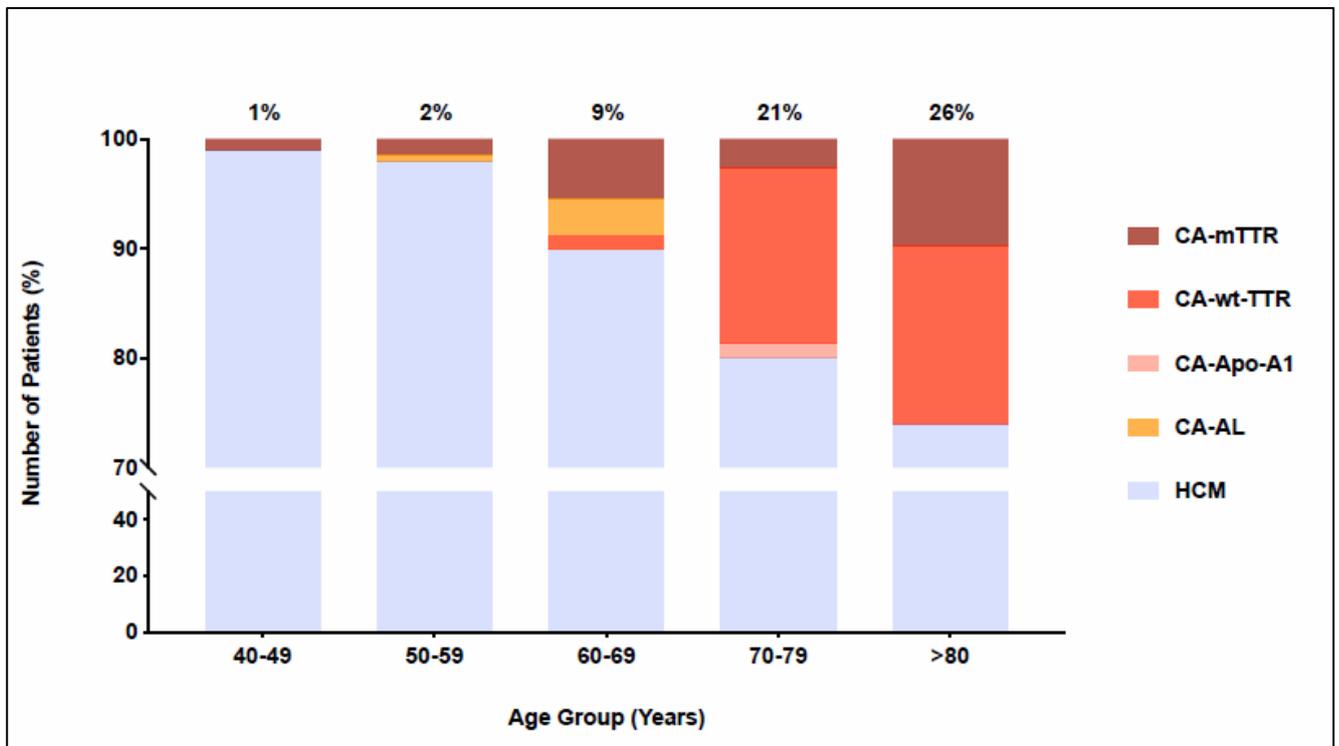


Figura 8. Prevalenza dei tipi più frequenti di amiloidosi cardiaca nella popolazione di pazienti con HCM suddivisi per età

7.5 DISCUSSIONE STUDIO 1

L'amiloidosi cardiaca è una malattia causata dal deposito di proteine fibrillari insolubili nello spazio extracellulare del tessuto miocardico che porta ad alterazioni strutturali e funzionali del cuore. La prognosi seppure diversa per le varie forme di amiloidosi cardiaca è complessivamente infausta, con exitus per insufficienza d'organo e arresto cardio circolatorio.

Diversi trial clinici hanno dimostrato l'efficacia di terapie in grado di modificare il decorso della malattia in termini sia di morbilità che di mortalità, soprattutto se introdotte nelle fasi iniziali. Tuttavia la diagnosi di amiloidosi cardiaca resta una sfida per il medico a causa dell'intrinseca

natura aspecifica della clinica e del percorso diagnostico che non può prescindere da un approccio multidisciplinare. In accordo con questa asserzione, dati inizialmente provenienti da report autoptici suggeriscono come l'amiloidosi cardiaca sia un'entità sotto diagnosticata e il recente impiego della scintigrafia con tracciante osseo continua a mostrare una prevalenza non trascurabile dell'amiloidosi cardiaca da transtiretina in gruppi di pazienti selezionati. Conoscere la reale prevalenza di amiloidosi cardiaca resta una sfida e al contempo un'urgenza poiché permette al medico di determinare il grado di sospetto clinico, elemento indispensabile per una diagnosi corretta e tempestiva. In virtù della sua particolare estrinsecazione fenotipica, la popolazione di pazienti con cardiomiopatia ipertrofica rappresenta una coorte ideale per lo screening di questa malattia.

Nel nostro studio, che ha esaminato una coorte di 393 pazienti consecutivi presentatisi con una diagnosi iniziale di HCM all'età di ≥ 40 anni, AC è risultata essere la fenocopia più comune, interessando il 9% della popolazione dello studio. La prevalenza di AC era correlata all'età, che variava dall'1%, tra 40 e 49 anni, al 26% sopra gli 80 anni. La malattia di Anderson Fabry è stata diagnosticata nel 1.5%, in accordo con i dati riportati in letteratura⁷¹. Dei 35 pazienti con AC, 12 sono stati diagnosticati mediante test genetici (pannello per le cardiomiopatie NGS in tutti tranne uno con ApoA1 che ha richiesto una diagnostica individualizzata) e, nei 23 pazienti con mutazione negativa, sulla base delle red flags sono state avviate ulteriori indagini che hanno portato all'identificazione di 20 pazienti con AC TTRwt e 3 pazienti con AC AL.

Suddividendo poi la popolazione in base all'età di presentazione, siamo stati in grado di distinguere 3 pattern eziologici: prima dei 60 anni, la diagnosi di AC era limitata all'AC TTRm, con pazienti in gran parte asintomatici, identificati dai test genetici NGS e, in due casi, ad AL-CA. Questo dato che mostra un'insorgenza relativamente precoce dell'AC TTRm è in linea con quanto già descritto in letteratura¹⁷. Nella classe di età 60-69 anni, la prevalenza di AC TTRm è aumentata (4/35, oltre a 1 wt-CA, 3 AL-CA) e i pazienti erano più spesso sintomatici. A partire dall'età di 70 anni, erano rappresentati entrambi i pazienti con TTR-wt e TTR-m, con una chiara prevalenza della prima (19/35). Questo risultato evidenzia la necessità di una valutazione sistematica delle red flags dell'AC nei pazienti indirizzati a centri di riferimento per HCM di età > 60 anni. Sulla base del modello epidemiologico sopra descritto, nei pazienti più giovani che sono spesso asintomatici

e senza chiari segni di sospetto clinico, il pannello per le cardiomiopatie NGS, incluso il gene della TTR rappresenta un importante meccanismo di sicurezza per prevenire la mancata diagnosi dell'AC geneticamente determinata, l'eziologia più rappresentata in questo gruppo.

La presenza di red flags permette di porre un sospetto diagnostico con un'accuratezza non ancora definita in letteratura e il riscontro di amiloidosi cardiaca in assenza di chiari indizi resta una possibilità a favore del fatto che i dati epidemiologici siano sottostimati. I nostri risultati, confrontati con i dati presenti in letteratura, mostrano un'elevata prevalenza di AC TTR oltre una certa età, tale da suggerire un maggiore impiego di metodiche di secondo livello come la scintigrafia con tracciante osseo, sempre più diffusa e con un costo relativamente basso.

I dati di questo lavoro sono stati pubblicati su *International Journal of Cardiology* con il titolo: *Prevalence of cardiac amyloidosis among adult patients referred to tertiary centers with an initial diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy.*

STUDIO 2

Analisi di prevalenza della Amiloidosi Cardiaca nella popolazione generale, con età ≥ 55 anni, in pazienti afferenti agli ambulatori di ecocardiografia

8.1 RAZIONALE E OBIETTIVO DELLO STUDIO 2

Alla luce di questa prima esperienza e date le implicazioni della diagnosi precoce sulla terapia, il passo successivo è stato quello di allargare le analisi di prevalenza ad una popolazione più generale. Risulta fondamentale una consapevolezza e una diagnosi precoce anche da parte di centri non dedicati che non dispongano di una pronta esecuzione di esami mirati come la risonanza magnetica cardiaca o il test genetico.

L'obiettivo del nostro secondo studio è stato stimare la prevalenza dell'AC in Italia attraverso l'impiego di strumenti diagnostici prevalentemente non invasivi, dotati di elevata accuratezza diagnostica (esami ematici mirati e scintigrafia ossea) e di determinare l'accuratezza diagnostica dei parametri ecocardiografici suggestivi per AC.

8.2 MATERIALI E METODI

Questo studio multicentrico nazionale ha coinvolto 13 Centri (Trieste, Siena, Pisa, Roma, Bologna, Ferrara, Milano, Brescia, Pavia, Genova, Torino, Bari, Napoli), avviato l'01/10/2019 e proseguito fino al 31/05/2021 o fino al completamento della fase 1 e della fase 2 da parte di tutti i Centri Partecipanti.

Lo studio è stato suddiviso in due fasi: 1) fase osservazionale (screening ecocardiografico) e 2) fase diagnostica (iter diagnostico mirato per pazienti con parametri ecocardiografici suggestivi per AC).

Fase 1: osservazionale (valutazione della prevalenza del sospetto ecocardiografico di amiloidosi). Per un periodo di studio di 15 giorni sono stati valutati tutti gli ecocardiogrammi consecutivi eseguiti in soggetti ≥ 55 anni presso i laboratori di ecocardiografia dei Centri partecipanti.

Ogni Centro ha avuto come obiettivo quello di eseguire almeno 300 esami ecocardiografici in pazienti ≥ 55 anni durante il periodo di arruolamento.

È stato riportato il motivo d'invio del paziente, il quesito diagnostico o la diagnosi con cui il paziente afferiva al Laboratorio di Ecocardiografia. In questo modo si potrà poi calcolare sia una prevalenza generale di AC nella popolazione che afferisce ai laboratori di ecocardiografia, sia prevalenze selettive, utilizzando come denominatore le varie diagnosi cliniche-ecocardiografiche con cui il paziente viene riferito.

Questa parte dello studio è osservazionale, non richiede una valutazione clinica, né interferisce con i percorsi clinico-diagnostici di ogni paziente.

I Centri coinvolti hanno dovuto raggiungere la valutazione di almeno 3000 pazienti con età ≥ 55 anni nel periodo identificato.

Il sospetto ecocardiografico di AC risultava soddisfatto in presenza delle tre seguenti caratteristiche:

1. spessore del setto interventricolare maggiore o uguale a 13 mm negli uomini e 12 mm nelle donne;
2. frazione di eiezione maggiore o uguale a 50%;

3. volume telediastolico ventricolare sinistro indicizzato minore o uguale a 85 mL/m².

Inoltre doveva essere presente almeno 1 tra i seguenti criteri addizionali:

- a) aspetto “granular sparkling” miocardico definito come trama granulare con aspetto omogeneamente iperecoriflettente del miocardio;
- b) versamento pericardico di qualsiasi entità;
- c) spessore del setto interatriale (≥ 5 mm);
- d) pattern diastolico restrittivo (T dec E <120 o T dec ≤ 150 e E/A ≥ 2) o elevate pressioni di riempimento (E/E'15);
- e) aspetto “apical sparing”, se presenti immagini adeguate (anche per analisi offline) per l'analisi del Global Longitudinal Strain (GLS);
- f) aumentato spessore (>5 mm) dei foglietti della valvola mitrale e/o tricuspide.

Sono stati definiti, sulla base dei criteri addizionali, tre gruppi con sospetto crescente di AC in base alla presenza delle red flags ecocardiografiche suggestive: sospetto basso (1 reperto); sospetto intermedio (2 reperti); sospetto elevato (≥ 3 reperti).

Sono stati esclusi i pazienti con le seguenti caratteristiche:

- a) pazienti con età < 55 anni;
- b) pazienti che non soddisfano tutti e 3 i criteri di elevato sospetto ecocardiografico di AC;
- c) pazienti che presentano i 3 criteri di elevato sospetto ecocardiografico di AC, ma non soddisfano nessun criterio ecocardiografico addizionale

Fase 2: diagnostica (valutazione della prevalenza di amiloidosi ed elaborazione di uno score clinico/ecografico predittivo della malattia).

I pazienti con sospetto ecocardiografico di AC identificati nella prima fase sono stati sottoposti ad una nuova valutazione clinica, valutando nello specifico l'anamnesi del paziente (storia di neuropatia autonoma, sensitiva e motoria, macroglossia, sincope e insufficienza renale cronica), il tracciato elettrocardiografico (ritardi di conduzione, disturbi del ritmo, pattern pseudoinfartuale e bassi voltaggi), gli esami ematici e urinari (comprendenti il dosaggio di troponina ad elevata sensibilità e peptidi natriuretici, elettroforesi proteica, immunofissazione

sierica/urinaria, dosaggio catene leggere libere kappa e lambda) e infine la scintigrafia con tracciante osseo (Figura 9).

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato allo studio.

<p>Storia clinica</p>	<p>Macroglossia</p> <p>Sindrome tunnel carpale</p> <p>Ipotensione ortostatica</p> <p>Sincope</p> <p>Insufficienza renale cronica</p> <p>Neuropatia periferica</p>
<p>Elettrocardiogramma</p>	<p>Fibrillazione atriale/Flutter atriale</p> <p>Tachicardia ventricolare non sostenuta</p> <p>Bassi voltaggi</p> <p>Pseudonecrosi ECG</p>
<p>Esami ematici</p>	<p>Emocromo, creatinina</p> <p>Esame delle urine</p> <p>Elettroforesi sierica, Immunofissazione sierica/urinaria</p> <p>Catene kappa e lambda</p> <p>BNP o NT-proBNP</p> <p>Troponina I o T ad alta sensibilità</p>
<p>Scintigrafia ossea</p>	<p>Tecnezio pirofosfato (99mTc-PYP) o</p> <p>Tc-99m-3,3-difosfono-1,2-propanodicarbossilicacido (99mTc-DPD)</p> <p>o</p> <p>99mTc-Idrossimetilene difosfonato (99mTc-HMDP)</p>

Figura 9. Esami clinici, laboratoristici e strumentali raccolti in fase 2.

8.3 ANALISI STATISTICA

Sono state calcolate statistiche descrittive tra i gruppi di studio. Le variabili continue sono state espresse come mediana con intervallo interquartile. Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test U di Mann-Whitney per le variabili continue e il test Chi quadrato (χ^2) o il test esatto di Fisher per le variabili dicotomiche, a seconda dei casi. Un valore $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto software statistico IBM SPSS Statistics 24.0 (New York, NY) versione 20. Nella fase 2 dello studio del nostro Centro sono state calcolate statistiche descrittive tra i gruppi di studio. Quando tutti i centri avranno completato la fase 2, i dati verranno uniti e verrà stimata la prevalenza di AC (con particolare attenzione all'ATTR-AC) tra i pazienti sottoposti a ecocardiografia di routine. Inoltre, verrà utilizzata un'analisi di regressione logistica per chiarire l'associazione della presenza di AC con i sottogruppi di studio (cioè ecocardiogrammi a basso-intermedio-elevato sospetto per AC). L'analisi della curva ROC sarà eseguita per determinare l'accuratezza delle red flags ecocardiografiche di AC, sia isolatamente che in combinazione.

8.4 RISULTATI

Sono stati eseguiti 5315 ecocardiogrammi, di cui 1169 esami hanno soddisfatto i criteri d'inclusione per gli ecocardiogrammi AC-compatibili (ovvero spessore del setto interventricolare maggiore o uguale a 13 mm negli uomini e 12 mm nelle donne, frazione di eiezione maggiore o uguale a 50% e volume telediastolico ventricolare sinistro indicizzato minore o uguale a 85 mL/m²) (Figura 10).

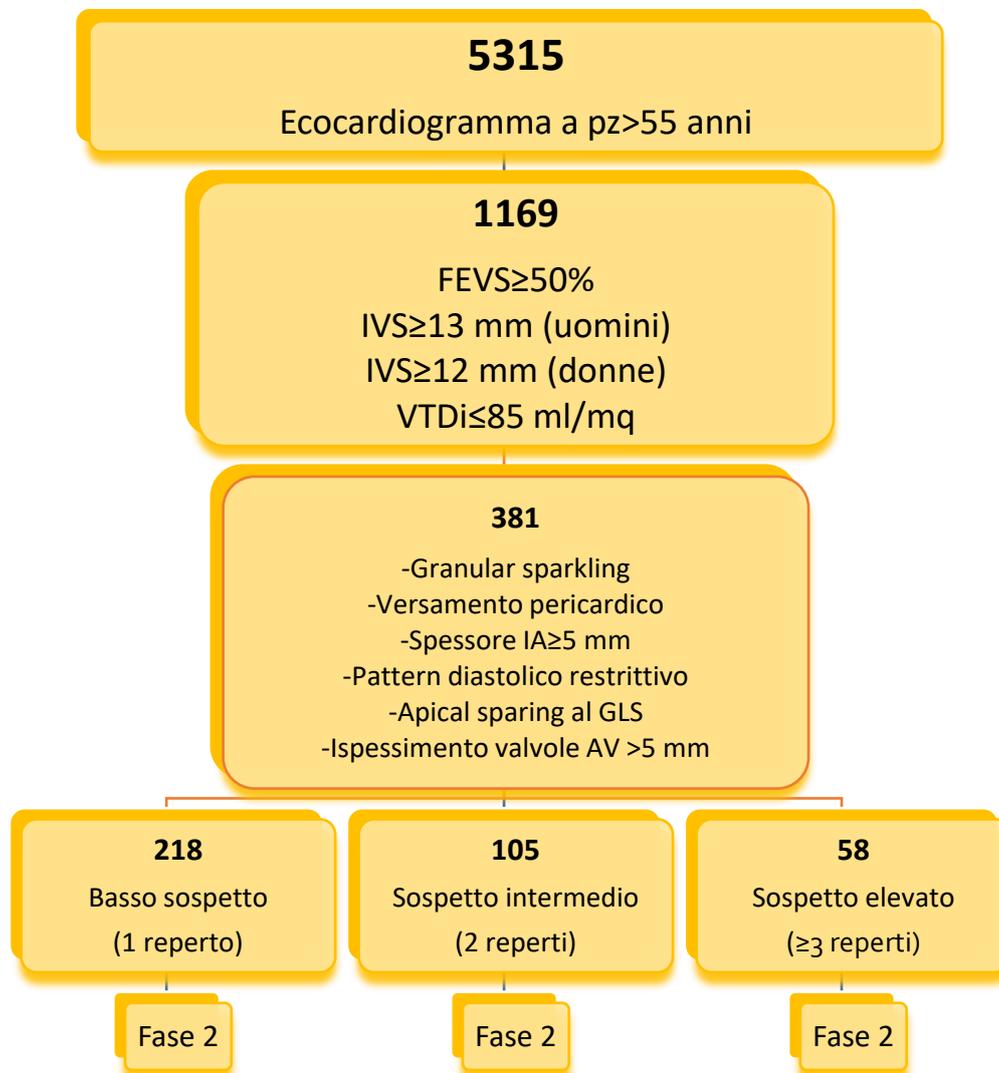


Figura 10: Disegno dello studio multicentrico. Legenda: AC, Amiloidosi cardiaca; IVS, setto interventricolare; iEDV, volume telediastolico indicizzato; FEVS, frazione eiezione ventricolo sinistro.

Tra questi, 381 esami (7,2% della popolazione esaminata; 33% degli ecocardiogrammi compatibili con AC) hanno avuto almeno 1 reperto compatibile con AC e sono stati inclusi nella popolazione dello studio: 218 (57%) pazienti avevano un basso sospetto di AC, 105 (28%) un sospetto intermedio e 58 (15%) un sospetto elevato (Figura 11).

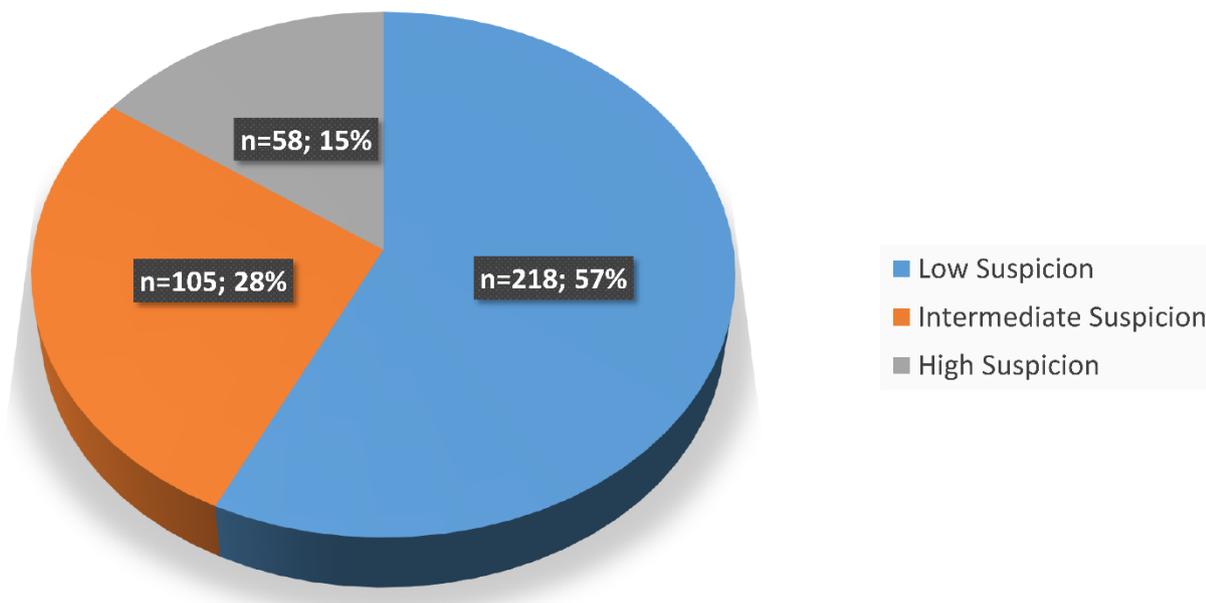


Figura 11: Popolazione dello studio suddivisa in base al sospetto ecocardiografico di AC (basso, intermedio, alto).

Le indicazioni cliniche più comuni all'esecuzione dell'ecocardiogramma in questi pazienti erano scompenso cardiaco (19,7%), cardiopatia ischemica (15,2%) e valvulopatia severa o precedente sostituzione valvolare chirurgica o percutanea (12,6%). Le indicazioni non comprese nell'elenco sono state raccolte nel campo "altro" e hanno rappresentato il 15,7% dei casi (Figura 12).

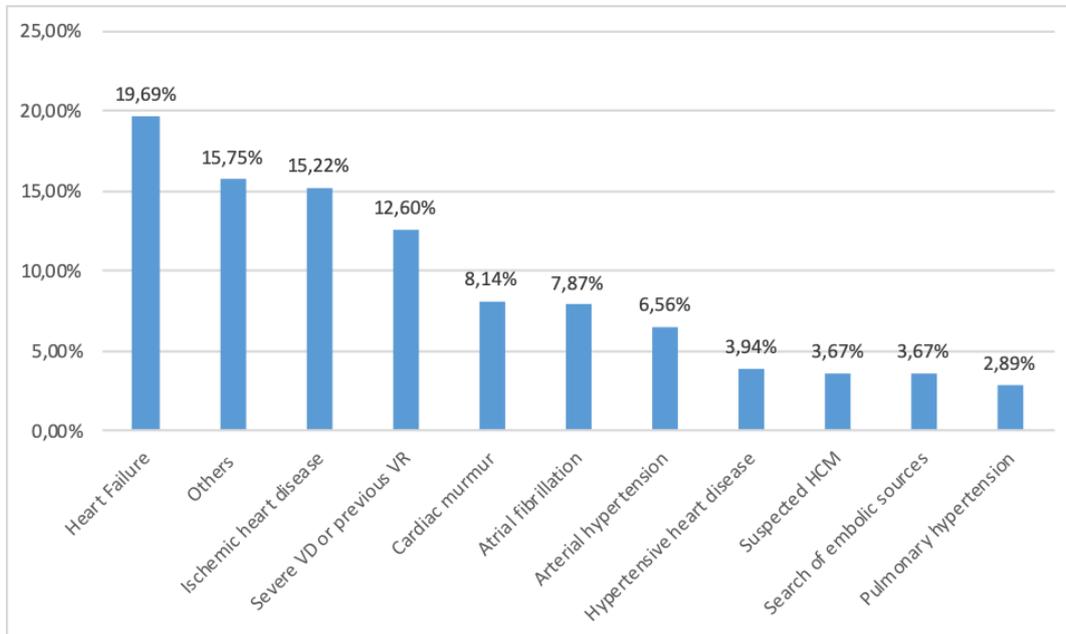


Figura 12: Indicazioni cliniche all'ecocardiografia nella popolazione in studio.

Le caratteristiche al basale della popolazione in studio sono riassunte nella Tabella 5.

L'età media era di 77 anni e il 50% rappresentato da uomini (191/381 pazienti). Il numero di pazienti ricoverati e ambulatoriali era simile (rispettivamente 44% e 56%).

Parametri	N°	Tutti (n=381)	1 Reperto (n=218, 57%)	2 Reperti (n=105, 28%)	≥ 3 Reperti (n=58, 15%)	P value
Età	381	77 [70 - 83]	78 [70 - 83]	78 [71 - 83]	76 [68 - 84]	0,607
Maschi,%	381	191 (50%)	106 (49%)	49 (47%)	36 (62%)	0,135
Scompenso cardiaco,%	381	75 (19.7%)	37 (17%)	19 (18%)	19 (33%)	0.024
Scompenso cardiaco e FA,%	381	105 (27.6%)	56 (26%)	25 (24%)	24 (41%)	0.036
IVS, mm	381	13 [13 - 15]	14 [13 - 15]	13 [13 - 14]	14 [13 - 15]	0,192
IVS max, mm	381	14 [13 - 15]	14 [13 - 15]	13 [13 - 14]	15 [13 - 15]	0,063
EDVi, ml/m2	358	51 [43 - 59]	49 [41 - 59]	52 [45 - 61]	52 [47 - 58]	0,044
E/E'	311	14 [10 - 18]	11 [8 - 17]	12 [10 - 18]	15 [12 - 19]	0,002
LVEF,%	381	59 [55 - 64]	61 [55 - 65]	55 [55 - 60]	55 [50 - 55]	<0.001
Disfunzione VD,%	370	35 (10%)	10% (20/209)	9% (9/104)	11% (6/57)	0,924
Spessore parete libera VD,mm	227	7 [5 - 9]	5 [4-8]	6 [4-8]	8 [7- 10]	<0.001
Diametro AS,mm	342	42 [37 - 47]	43 [38 - 50]	42 [38 - 46]	39 [36 - 43]	<0.001
Valvulopatia moderata-severa,%	373	174 (47%)	47% (99/210)	47% (49/105)	45% (26/58)	0,952
Rigurgito mitralico,%	172	82 (48%)	34% (33/97)	67% (33/49)	62% (16/26)	<0.001

Parametri	N°	Tutti (n=381)	1 Reperto (n=218, 57%)	2 Reperti (n=105, 28%)	≥ 3 Reperti (n=58, 15%)	P value
Rigurgito tricuspidale,%	173	56 (32%)	29% (28/98)	39% (19/49)	35% (9/26)	0,444
Rigurgito aortico,%	172	32 (19%)	14% (14/98)	25% (12/49)	23% (6/26)	0,262
Rigurgito polmonare,%	173	4 (2%)	3% (3/98)	2% (1/49)	0% (0/26)	0,646
Stenosi mitralica %	173	4 (2%)	4% (4/98)	0% (0/49)	0% (0/26)	0,209
Stenosi aortica,%	174	80 (46%)	55% (54/99)	37% (18/49)	31% (8/26)	0,030
PAPs>35 mmHg,%	337	139 (41%)	52% (93/180)	33% (33/100)	23% (13/57)	<0.001
PAPs,mmHg	337	35 [28 - 44]	36 [30 - 46]	31 [27 - 42]	30 [25 - 35]	0,003
VCI>21 mm,%	330	38 (12%)	13% (24/180)	10% (9/93)	9% (5/57)	0.519
VCI,mm	331	16 [13-18]	15 [12 - 18]	16 [13 - 18]	17 [15 - 20]	0,026

Tabella 5: Fase 1. Caratteristiche della popolazione con ecocardiogramma sospetto per amiloidosi, in base al numero di reperti ecocardiografici suggestivi.

Red flags ecocardiografiche suggestive di AC

La Figura 13 mostra la distribuzione delle red flags ecocardiografiche suggestive di AC nella popolazione in studio. L'ispessimento del setto interatriale (45%) è stato il reperto ecocardiografico suggestivo più frequente seguito da versamento pericardico e pattern diastolico restrittivo (31%, entrambi), granular sparkling del miocardio (24%), ispessimento valvole AV (20%) e "apical sparing" all'analisi speckle-tracking (66/341 pazienti, 20%). Non è stata riscontrata alcuna differenza di genere nella prevalenza delle red flags ecocardiografiche suggestive,

sebbene gli uomini abbiano avuto una maggior tendenza all'ispessimento del setto interatriale, seppur non significativa, rispetto alle donne (49,2% vs 39,7%; $p = 0,062$).

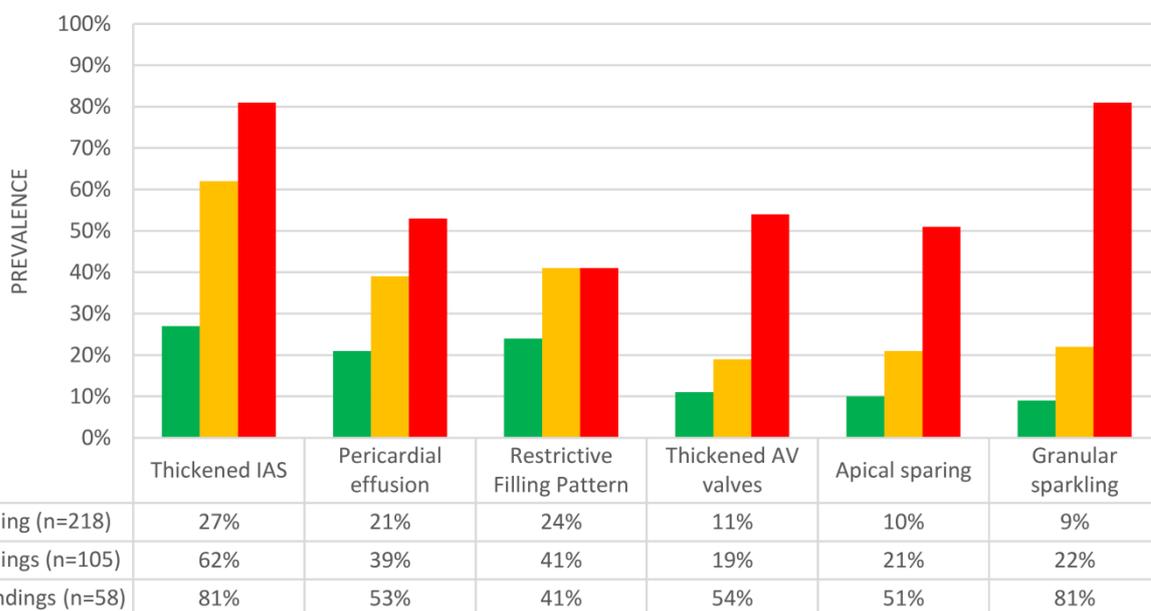
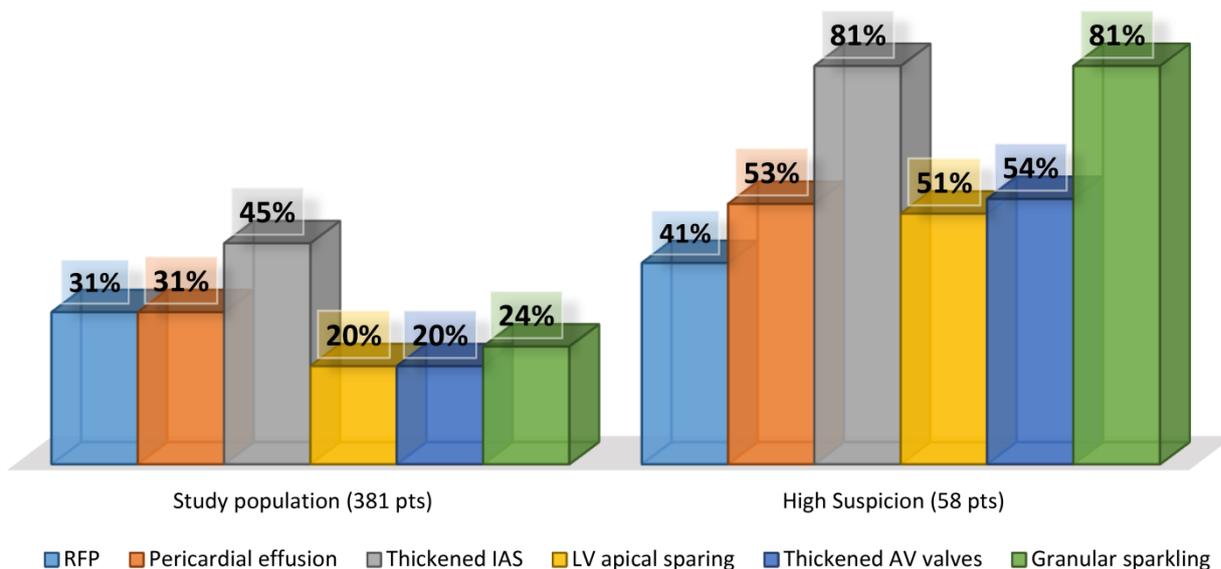


Figura 13: Prevalenza di reperti ecocardiografici suggestivi tra i sottogruppi della popolazione in studio. Legenda: AV, atrioventricolare; IAS, setto interatriale; LV, ventricolare sinistro; RFP, pattern diastolico restrittivo.

Rispetto ai pazienti ambulatoriali, i pazienti ricoverati avevano più frequentemente un pattern diastolico restrittivo (41,2% vs 23,4%; $p < 0,001$) e "l'apical sparing" (32% vs 9%; $p < 0,001$). Al contrario, i pazienti ambulatoriali presentavano tassi più elevati d'ispessimento del setto

interatriale (56% vs 30,2%; $p<0,001$) e delle valvole AV (23,7% vs 14,4%; $p=0,024$) e una tendenza all'aumento della frequenza di granular sparkling (27,3% vs 19,2%; $p=0,066$). La Figura 14 mostra la prevalenza delle red flags ecocardiografiche in base ai gruppi di età (<70 anni, 70-79 anni, 80-89 anni, ≥ 90 anni): l'ispessimento del setto interatriale diminuiva con l'età, mentre la prevalenza di pattern di riempimento ventricolare restrittivo aumentava con l'invecchiamento.

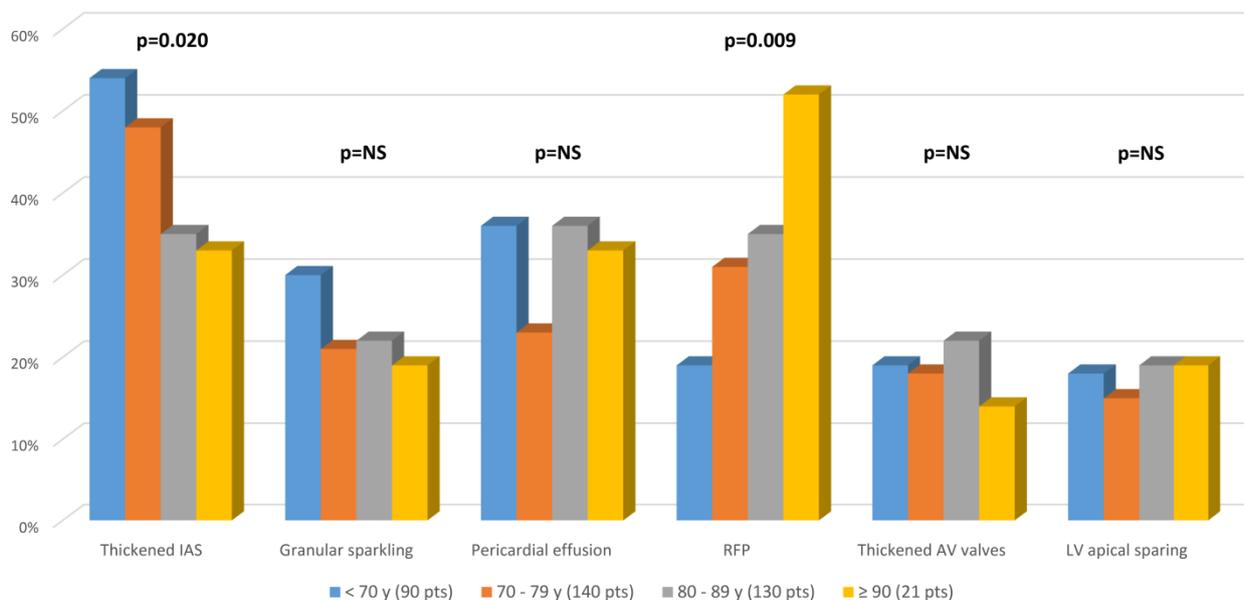


Figura 14: Prevalenza di reperti ecocardiografici suggestivi in base ai gruppi di età. Legenda: AV, atrioventricolare; IAS, Setto interatriale, NS, non significativo; RFP, pattern diastolico restrittivo.

Pazienti con elevato sospetto ecocardiografico di AC (≥ 3 red flags)

La tabella 6 mostra le caratteristiche dei 58 pazienti ad elevato sospetto ecocardiografico di AC. Di questi più della metà (56%) erano pazienti ambulatoriali e più frequentemente erano uomini (62% vs 48%, $p=0,048$). Le red flags ecocardiografiche suggestive più frequenti sono state: l'ispessimento del setto interatriale (81%, 47/58 pazienti), il granular sparkling (81%, 47/58 pazienti) e l'ispessimento delle valvole AV (54%, 31/57 pazienti) (Figura 13).

È interessante notare che, rispetto a quelli con sospetto AC basso e intermedio, i pazienti con elevato sospetto si sono presentati più frequentemente per scompenso cardiaco (SC) (33% vs 17%, $p=0,007$) e SC con FA (41% vs 25%, $p=0,011$), FEVS più bassa (55% vs 60%, $p<0,001$), più alto rapporto E/E' (15 vs 10,5, $p=0,017$), maggior diametro atriale sinistro (4,3 cm vs 3,9 cm, $p<0,001$), maggior spessore della parete libera ventricolare destra (0,8 cm vs 0,6 cm, $p<0,001$), pressione

sistolica polmonare stimata più bassa (30 mmHg vs 35 mmHg, $p=0,030$) e vena cava inferiore più grande (1,7 cm vs 1,5 cm, $p=0,009$). La prevalenza delle valvulopatie era simile tra i sottogruppi.

Parametri	N°	Tutti (n=381)	≤2 Reperti (n=323, 85%)	≥ 3 Reperti (n=58, 15%)	P value
Età	381	77 [70 - 83]	78 [70 - 83]	76 [68 - 84]	0,356
Maschi,%	381	191 (50%)	155 (48%)	36 (62%)	0,048
Scompenso cardiaco,%	381	75 (19.7%)	56 (17%)	19 (33%)	0.007
Scompenso cardiaco e FA,%	381	105 (27.6%)	81 (25%)	24 (41%)	0.011
IVS, mm	381	13 [13 - 15]	13 [13 - 15]	14 [13 - 15]	0,537
IVS max, mm	381	14 [13 - 15]	13 [13 - 15]	15 [13 - 15]	0,427
EDVi, ml/m2	358	51 [43 - 59]	52 [47 - 58]	52 [47 - 58]	0,124
E/E'	311	14 [10 - 18]	11 [8 - 17]	15 [12 - 19]	0,017
LVEF,%	381	59 [55 - 64]	60 [55 - 65]	55 [50- 55]	<0.001
Disfunzione VD,%	370	35 (10%)	9% (29/313)	11% (6/57)	0,765
Spessore parete libera VD,mm	227	7 [5 - 9]	6 [4-8]	8 [7- 10]	<0.001
Diametro AS, mm	342	42 [37 - 47]	39 [36 - 43]	43 [38 - 48]	<0.001

Parametri	N°	Tutti (n=381)	≤2 Reperti (n=323, 85%)	≥ 3 Reperti (n=58, 15%)	P value
Volume AS, ml	320	72 [57 - 97]	73 [57 - 97]	68 [55 - 91]	0,448
Valvulopatia moderata-severa,%	373	174 (47%)	47% (148/315)	45% (26/58)	0,762
Rigurgito mitralico,%	172	82 (48%)	45% (66/146)	62% (16/26)	0,124
Rigurgito tricuspideale,%	173	56 (32%)	32% (47/147)	35% (9/26)	0,791
Rigurgito aortico,%	172	32 (19%)	18% (26/147)	23% (6/26)	0,514
Rigurgito polmonare,%	173	4 (2%)	3% (4/147)	0% (0/26)	0,395
Stenosi mitralica,%	173	4 (2%)	3% (4/147)	0% (0/26)	0,395
Stenosi aortica,%	174	80 (46%)	49% (72/148)	31% (8/26)	0,092
PAPs>35 mmHg,%	337	139 (41%)	45% (126/280)	23% (13/57)	<0.001
PAPs, mmHg	337	35 [28 - 44]	35 [28 - 45]	30 [25 - 35]	0,030
VCI >21 mm,%	330	38 (12%)	12% (33/273)	9% (5/57)	0,476
VCI, mm	331	16 [13 - 18]	15 [13 - 18]	17 [15 - 20]	0,009

Tabella 6: Fase 1. Caratteristiche della popolazione ad elevato sospetto di AC (≥3 reperti).

Seconda fase: prevalenza amiloidosi cardiaca (risultati preliminari del nostro Centro IAI)

Nel nostro Centro dopo lo screening ecocardiografico eseguito nella prima fase dello studio sono stati selezionati 34 pazienti con quadro ecocardiografico sospetto per AC e almeno una red flag. Nel campione dei 34 pazienti: 56% circa era di sesso maschile con età media 77 anni. Di questi: 19 pazienti (56%) presentavano 1 reperto suggestivo, 6 pazienti (18%) con rischio intermedio e 9 pazienti (26,4%) con elevato sospetto ecocardiografico per AC (Tabella 7).

Parametri	N°	Tutti (n=34)	1 Reperto (n=19, 56%)	2 Reperti (n=6, 17,6%)	≥ 3 Reperti (n=9, 26,4%)
Età	34	77,8 (9,5)	77,2 (8,2)	71,6 (11,3)	86,3 (6,6)
Maschi,%	34	19 (55,9)	7 (36,8%)	4 (66,6%)	8 (89%)
Paz. ambulatoriale	34	14 (41,2)	8 (42%)	4 (66,6%)	2 (22,2%)
IVS, mm	34	14 (1,9)	13,7 (1,5)	12,8 (0,7)	15,2 (2,4)
EDVi, ml/m2	34	56,7 (11,4)	55,5 (12,3)	59,2 (6,7)	57,5 (12,7)
E/E'	31	13,4 (5,4)	12 (5,4)	13,2 (4,6)	17,2 (4,9)
LVEF, %	34	61 (6,2)	62,8 (6,3)	59,5 (5,6)	58,8 (5,8)
Disfunzione VD (FAC <35%)	27	5 (18,5%)	0 (0%)	2 (33,3%)	3 (33,3%)
Spessore parete libera VD, mm	31	5,2 (1,8)	5 (2,1)	4,7 (1)	5,7 (1,5)
Diametro AS, mm	33	44,3 (7,6)	42,1 (7,9)	44,6 (7,6)	48,7 (5,5)
Valvulopatia moderata-severa, %	33	10 (30,3%)	9 (47,3%)	0 (0%)	1 (11,1%)
Rigurgito mitralico,%	33	3 (9,1%)	2 (10,5%)	0 (0%)	1 (11,1%)

Parametri	N°	Tutti (n=34)	1 Reperto (n=19, 56%)	2 Reperti (n=6, 17,6%)	≥ 3 Reperti (n=9, 26,4%)
Rigurgito tricuspidale,%	33	4 (12,1%)	4 (21%)	0 (0%)	0 (0%)
Rigurgito aortico,%	33	2 (6,1%)	2 (10,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Rigurgito polmonare,%	33	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Stenosi mitralica %	33	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Stenosi aortica,%	33	1 (3%)	1 (5,2%)	0 (0%)	0 (0%)
PAPs >35 mmHg,%	27	16 (59,2%)	7 (36,8%)	2 (33,3%)	7 (77,8%)
VCI >21 mm,%	33	7 (21,2%)	3 (15,7%)	1 (16,7%)	3 (33,3%)
VCI, mm	33	18 (5,8)	17,2 (6,8)	18,2 (5,7)	19,8 (3,4)

Tabella 7: Caratteristiche della popolazione del nostro Centro (Istituto Auxologico Italiano) con ecocardiogramma sospetto per amiloidosi, in base al numero di reperti ecocardiografici suggestivi. Per le variabili continue i risultati sono riportati come media (deviazione standard); per le variabili categoriche come numero assoluto (% del totale).

Come illustrato in Tabella 7, i pazienti con un maggior numero di reperti sospetti per amiloidosi cardiaca sono maschi (89%) di età più avanzata (età media 86,3 anni). Da un punto di vista ecografico tali pazienti si presentano con una frazione di eiezione più bassa, un'alterazione della funzione diastolica più marcata, un maggiore ingrandimento atriale sinistro e pressione polmonare sistolica più elevata.

Di questi 34 pazienti, 3 sono deceduti e 17 non hanno voluto proseguire l'iter diagnostico per timore a recarsi in ospedale durante il periodo pandemico. I restanti 14 pazienti hanno proseguito

la valutazione clinica e l'iter diagnostico (Figura 15).

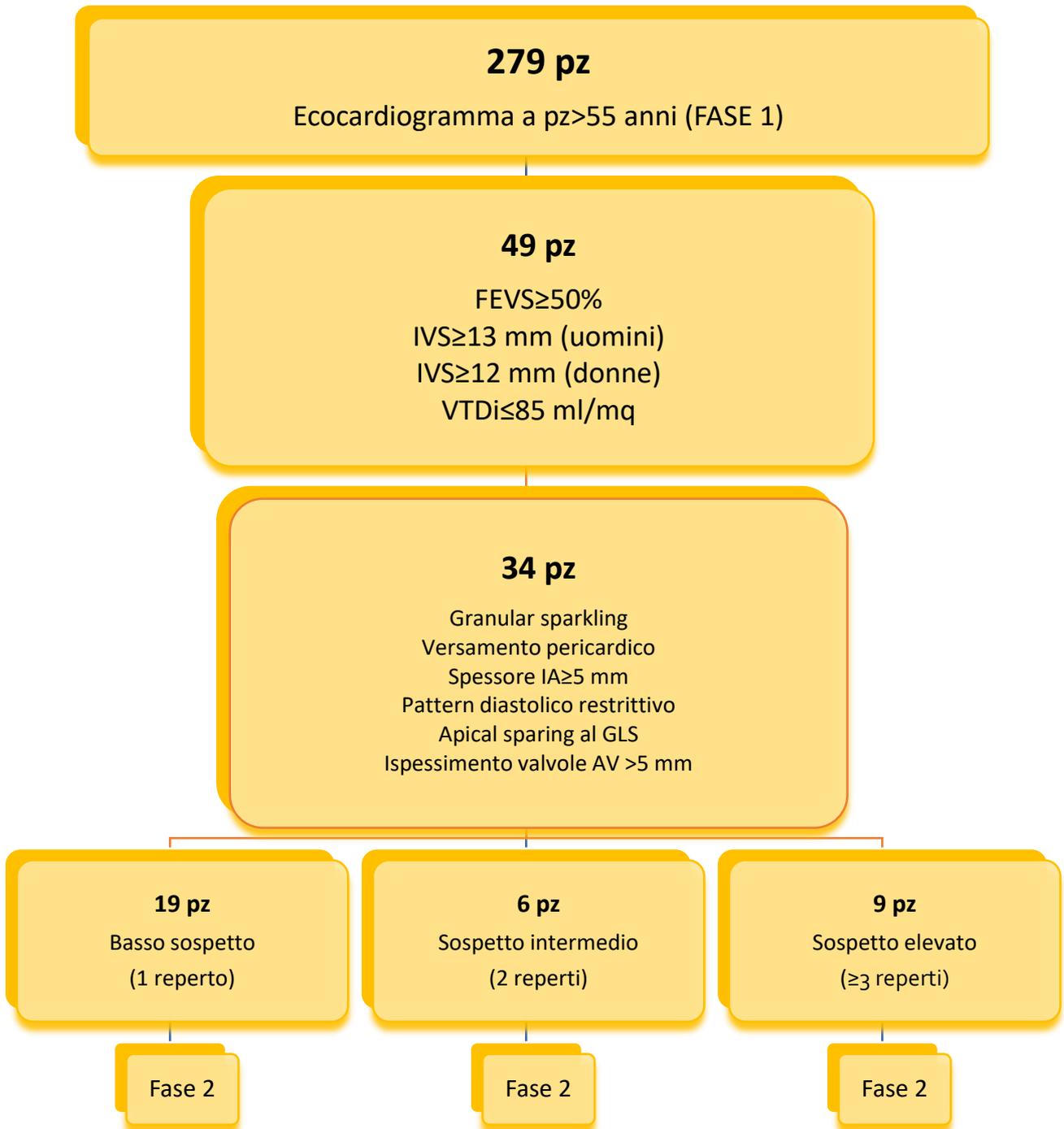


Figura 15. Disegno dello studio nel nostro Centro.

Nel campione dei 14 pazienti che hanno proseguito l'iter diagnostico: 8 (57,1%) erano di sesso maschile, di età ≥ 78 anni ed erano perlopiù pazienti ricoverati in ospedale.

Dal punto di vista clinico nessun paziente presentava macroglossia, neuropatia periferica e ipotensione ortostatica; 3 pazienti avevano un pregresso tunnel carpale (21,4%), 1 paziente storia di sincope (7,1%) e 5 avevano insufficienza renale cronica (35,7%).

Dal punto di vista aritmico: di aritmie sopraventricolari (FA/FLA) ne soffrivano 10 pazienti (71,4%), 3 pazienti (21,4%) avevano storia di aritmie ventricolari non sostenute mentre nessun paziente aveva storia di aritmie ventricolari sostenute.

Dal profilo elettrocardiografico 1 solo paziente (7,1%) presentava dei bassi voltaggi al tracciato; in questo paziente è stata successivamente fatta diagnosi di AC.

Dagli esami ematochimici si è evidenziata una tendenza ad aumentati valori di BNP/NT-proBNP, dato che poi è risultato molto elevato nei pazienti con AC.

I reperti più frequenti presenti agli esami ecocardiografici sono stati: pattern restrittivo (57,1%), aspetto granular sparkling (50%), ispessimento del setto interatriale (37,5%) e versamento pericardico (21,4%).

Infine, 12 pazienti si sono sottoposti a scintigrafia con tracciante osseo che è risultata positiva in 2 pazienti (15,4%) (Tabella 8).

La diagnosi di AC è stata quindi posta a 2 pazienti.

In particolare, il primo paziente era un uomo di 82 anni ricoverato in ospedale per scompenso cardiaco con una storia di tunnel carpale, IRC, FA ed episodi di TVNS. Agli esami ematici aveva un valore di NT-proBNP molto elevato, rialzo della creatinina e una normale elettroforesi proteica. All'esame ecocardiografico presentava ispessimento del setto interatriale, pattern restrittivo, apical sparing al GLS e aspetto "granular sparkling", in assenza di versamento pericardico.

Il secondo paziente invece era un uomo di 97 anni ricoverato in ospedale per il medesimo motivo con una storia di IRC e FA. Al tracciato ECG presentava dei bassi voltaggi e agli esami ematochimici presentava una componente monoclonale di tipo IgG con proteinuria di Bence-Jones. Le caratteristiche ecocardiografiche erano sovrapponibili al primo paziente.

La diagnosi di AC è stata quindi posta a 2 pazienti con età >80 anni, entrambi ricoverati in ospedale per scompenso cardiaco con storia di IRC e FA/FLA. Le modificazioni del tracciato

elettrocardiografico erano presenti solo per un paziente rappresentate dai bassi voltaggi. Dal profilo ematochimico un paziente presentava componente monoclonale all'elettroforesi proteica con proteinuria di Bence-Jones.

Il quadro ecocardiografico era sovrapponibile per i due pazienti con ispessimento del setto interatriale, disfunzione diastolica di tipo restrittivo, aspetto "granular sparkling" e presenza di apical sparing al GLS. Nessuno dei due pazienti presentava versamento pericardico.

Seconda fase: prevalenza amiloidosi cardiaca (analisi preliminari nella popolazione generale):

Da una analisi preliminare della popolazione inclusa nella fase 1 è emerso che 206 dei 381 pazienti con ecocardiogramma suggestivo per AC sono andati incontro alla fase 2. I motivi principali di non prosecuzione dei 175 pazienti sono stati: decesso in 53 casi e rifiuto in 85 casi.

La diagnosi di amiloidosi cardiaca è stata effettuata in 64 pazienti sui 206 (31%). Nello specifico, 52 pazienti (25,5%) e 12 pazienti (5,7%) hanno ricevuto diagnosi di AC-TTR e AC AL rispettivamente.

I risultati preliminari della fase 2 mostrano quindi che in una coorte di pazienti non selezionati con età ≥ 55 anni e con ecocardiografia suggestiva per AC il 31% hanno ricevuto una diagnosi di amiloidosi cardiaca. L' AC TTR è stata predominante, ma anche l'AC AL è risultata in una quota non trascurabile di casi.

Parametri	N°	Tutti (n=14)
Età	14	77,8 (10,1)
Maschi,%	14	8 (57,1%)
Paz. ambulatoriale	14	4 (28,5%)
Tunnel carpale bilaterale	14	3 (21,4%)
Granular sparkling	14	7 (50%)
Versamento pericardico	14	3 (21,4%)
IAS ≥ 5 mm	13	6 (37,5%)
Pattern restrittivo	14	8 (57,1%)
Apical sparing	13	2 (12,5%)
Ispessimento valvole AV		
(>5 mm)	14	0 (0%)
Macroglossia	14	0 (0%)
Ipotensione ortostatica	14	0 (0%)
Neuropatia periferica	14	0 (0%)
IRC	14	5 (35,7%)
Sincope	14	1 (7,1%)
FA/FLA	14	10 (71,4%)
TVNS	14	3 (21,4%)
TVS/FV	14	0 (0%)
Bassi voltaggi	14	1 (7,1%)
Pseudonecrosi ECG	14	0 (0%)

Parametri	N°	Tutti (n=14)
Creatinina	10	1,4 (0,4)
Proteinuria	10	1 (6,2%)
NT-proBNP (> 400 ng/L) o BNP (> 100 ng/L)	11	8 (72,7%)
TnT hs (14 ng/L)	8	4 (50%)
EF proteine (presenza CM)	12	2 (16,7%)
Proteinuria Bence -jones	9	2 (22,2%)
Scintigrafia con tracciante osseo	13	2 (15,4%)

Tabella 8: Fase 2. Caratteristiche della popolazione dell'Istituto Auxologico Italiano con ecocardiogramma sospetto per amiloidosi, in base al numero di reperti ecocardiografici suggestivi. Per le variabili continue i risultati sono riportati come media (deviazione standard); per le variabili categoriche come numero assoluto (% del totale).

8.5 DISCUSSIONE STUDIO 2

Il nostro secondo lavoro si propone dunque come un allargamento del campione precedentemente analizzato, con esiti sovrapponibili rafforzando i risultati pubblicati.

I principali risultati della fase 1 di questo studio nazionale possono essere riassunti come segue:

- a) più del 7% dei pazienti ≥ 55 anni sottoposti a ecocardiografia e il 33% dei pazienti con cuore non dilatato, ipertrofico con FEVS conservata ha red flags ecocardiografiche suggestive di AC;
- b) i pazienti ad elevato sospetto ecocardiografico di AC (≥ 3 reperti) rappresentano l'1% dei pazienti ≥ 55 anni sottoposti a ecocardiografia, mentre se si considera solo i pazienti con cuore non dilatato, ipertrofico con FEVS conservata questa percentuale sale al 4,9%;
- c) i pazienti con elevato sospetto ecocardiografico di AC hanno come quesito diagnostico più frequente lo scompenso cardiaco con FEVS conservata (HFpEF);
- d) l'ispessimento del setto interatriale è la red flag più frequente di AC in tutti i gruppi di età.

Questi risultati rivestono quindi un ruolo importante nell'orientare l'attività dei laboratori ecocardiografici, poiché aumentano la sensibilità nel riconoscere i segni peculiari della malattia.

Finora, gli studi epidemiologici finalizzati ad indagare la prevalenza di AC si sono concentrati su

popolazioni specifiche (HFpEF, stenosi della valvola aortica, sindrome del tunnel carpale, cardiomiopatia ipertrofica) con una stima variabile nella diagnosi della malattia.

Va comunque sottolineato che attualmente l'iter diagnostico è consigliato in pazienti con diagnosi di insufficienza cardiaca⁷², soprattutto se a frazione d'eiezione conservata (HFpEF), o presenza di red flags e spessore parietale aumentato, più che in una popolazione meno selezionata come in questo studio.

Un documento di consenso pubblicato da un panel di esperti e le più recenti linee guida^{73 74} pongono indicazione allo screening per AC in tutti i pazienti con ipertrofia settale ≥ 12 mm e ≥ 1 red flag. Tali indagini dovrebbero comprendere una scintigrafia con tracciante osseo ed esami tra i quali l'elettroforesi proteica e l'immunofissazione delle proteine sieriche ed urinarie con ricerca delle catene libere.

Questo studio rappresenta il più grande screening di massa che ha misurato la proporzione di soggetti con sospetto ecocardiografico basso, intermedio ed elevato di AC nella popolazione generale. Questi risultati potrebbero dunque suggerire la necessità di modificare l'attuale approccio dei laboratori ecocardiografici in modo da riconoscere le red flags di AC per ottenere una diagnosi il più precoce possibile. Questo ha un importante risvolto sul timing di inizio della terapia.

Identificazione di pazienti a diversi livelli di sospetto ecocardiografico di AC

Recentemente si è assistito ad un aumento delle diagnosi di AC, grazie all'identificazione clinica e all'utilizzo della scintigrafia con tracciante osseo nella valutazione dei pazienti con ipertrofia cardiaca. La popolazione degli anziani si è mostrata come la parte più colpita. Al contrario, nel nostro studio i pazienti con ecocardiogrammi suggestivi di AC avevano una distribuzione simile in tutti i gruppi di età > 55 anni. Ciò che è stato notato inoltre è che l'ispessimento del setto interatriale era meno frequente negli anziani e quindi questo reperto poteva porre il sospetto di AC anche nella popolazione più giovane.

Nel gruppo ad elevato sospetto per AC vi sono degli elementi importanti che fanno orientare per una mancata diagnosi di AC. In primo luogo, la maggioranza dei pazienti in questo gruppo erano uomini; questo era già stato osservato nel registro internazionale Transthyretin Amyloid

Outcomes Survey (THAOS) dove gli uomini riportavano un aumentato rischio di malattia rispetto alle donne. In secondo luogo, il motivo dell'esame ecocardiografico era lo scompenso cardiaco a FE preservata (HFpEF), a volte con coesistente FA. Nella recente letteratura infatti viene riportato come nel 13% dei pazienti >60 anni con ipertrofia del ventricolo sinistro, ospedalizzati a causa di HFpEF abbiano una diagnosi di amiloidosi cardiaca da transtiretina⁷⁵. In terzo luogo, i reperti ecocardiografici più frequenti in questo gruppo sono stati l'ispessimento del setto interatriale, granular sparkling e ispessimento delle valvole atrioventricolari. Nella popolazione ad elevato sospetto il reperto "apical sparing" risulta più frequente rispettivamente di 5 e 2,5 volte rispetto ai gruppi con sospetto basso e intermedio. Infine, i pazienti con elevato sospetto ecocardiografico di AC presentavano frequentemente pressioni di riempimento del ventricolo sinistro più elevate con atrio sinistro più dilatato e significativa ipertrofia ventricolare destra non spiegata da malattie della valvola o ipertensione polmonare.

La presenza di uno o due reperti ecocardiografici isolati non costituisce necessariamente un alto sospetto di AC, soprattutto in assenza d'ipertrofia cardiaca. Infatti questi reperti dovrebbero essere considerati in combinazione con l'anamnesi del paziente, la valutazione clinica e gli esami di laboratorio. È ragionevole però inviare i pazienti con ecocardiogrammi a basso-intermedio rischio di AC a follow-up cardiologico.

Questo studio fornisce ai laboratori di ecocardiografia delle informazioni che potrebbero essere d'aiuto nell'identificare i pazienti a più alto rischio di AC non riconosciuti nella pratica clinica. Devono essere valutati approfonditamente i pazienti di ogni fascia d'età e soprattutto i pazienti di sesso maschile con un HFpEF con evidenza d'ipertrofia cardiaca. L'analisi delle immagini dovrebbe comprendere anche una valutazione accurata dei reperti ecocardiografici più frequenti di AC come l'ispessimento del setto interatriale, che si è mostrato come il reperto più comune di AC in tutte le età.

I risultati di questo studio sono stati pubblicati su *European Journal of Preventive Cardiology* in un articolo dal titolo "A national survey on prevalence of possible echocardiographic red flags of amyloid cardiomyopathy in consecutive patients undergoing routine echocardiography: study design and patients characterization-the first insight from the AC-TIVE Study".

La fase 2 di questo studio fornirà informazioni sull'accuratezza diagnostica di ciascuna red flag di AC utilizzata isolatamente e in combinazione, migliorando la selezione dei pazienti per ulteriori test.

Per quanto concerne i dati del nostro centro i pazienti con ecocardiogrammi suggestivi di AC avevano un'età maggiore di 75 anni ed erano perlopiù pazienti ricoverati in ospedale. Dati che si sono confermati anche nel gruppo ad elevato sospetto per AC. In quest'ultimo gruppo il motivo per l'esecuzione dell'esame ecocardiografico era rappresentato per tutti i pazienti dallo scompenso cardiaco a FE preservata (HFpEF), a volte con coesistente FA. I reperti ecocardiografici più frequenti sono stati l'aspetto granular sparkling, l'apical sparing e il pattern restrittivo presenti in tutti i pazienti, la presenza di versamento pericardico in più della metà dei casi e l'ispessimento del setto interatriale nel 50% dei pazienti.

Più della metà dei pazienti screenati nella prima fase dello studio hanno rifiutato di proseguire le indagini della fase 2, che ha avuto inizio a marzo 2020, periodo in cui è insorta la pandemia da Covid-19. La fase pandemica ha verosimilmente contribuito alla volontà dei pazienti a non eseguire visite ed esami per il timore del contagio.

9 CONCLUSIONI TRATTE DAI DUE STUDI

Tra i pazienti con diagnosi iniziale di cardiomiopatia ipertrofica afferiti a Centri di Riferimento per le Cardiomiopatie, l'AC è la malattia non riconosciuta più comune con una prevalenza complessiva del 9%, e che aumenta con l'età (dall'1% nella fascia di età tra i 40-49 anni al 26% sopra gli 80 anni). Indagini genetiche cliniche e di routine specifiche (incluso il gene per la TTR) per AC devono essere prese in considerazione in tutti i pazienti che presentano un fenotipo HCM dopo i 50-60 anni. L'età alla diagnosi potrebbe diventare un elemento discriminante, anche in assenza di altre red flags, nel raccomandare la scintigrafia ossea e indagini di secondo livello. Tuttavia ulteriori dati sono necessari per individuare con maggiore sicurezza un limite anagrafico preciso.

Inoltre, nella popolazione generale ≥ 55 anni più del 7% ha almeno un reperto ecocardiografico suggestivo di AC e l'ispessimento del setto interatriale è quello più frequente. I pazienti con elevato

sospetto di AC (≥ 3 reperti) rappresentano l'1% della popolazione generale e il 4,9% di quelli con cuore non dilatato, ipertrofico e con FE normale.

I laboratori di ecocardiografia rivestono quindi un ruolo importante nel saper riconoscere precocemente pazienti con AC sulla base delle red flags ecocardiografiche. I pazienti ad elevato sospetto per la patologia dovrebbero poi essere indirizzati ad iter diagnostico specifico, mentre i pazienti con sospetto basso e intermedio dovrebbero seguire un follow up cardiologico nell'eventualità di uno sviluppo di malattia.

In seguito allo sviluppo di trattamenti che modificano il decorso dell'amiloidosi cardiaca per lo più efficaci nella fase precoce della malattia, l'implementazione di adeguati sforzi di screening per la AC è diventata una priorità clinica. I risultati di questi studi danno un contributo importante alla definizione epidemiologica e alla possibilità di individuare coorti di pazienti con elevata prevalenza migliorando la resa diagnostica per questa malattia alla quale viene ormai offerta una possibilità di cura sempre più concreta.

10 BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Merlini, G. & Bellotti, V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 349, 583–96 (2003).
 - ² Dovidchenko, N. V, Leonova, E. I. & Galzitskaya, O. V. Mechanisms of amyloid fibril formation. *Biochemistry. (Mosc).* 79, 1515–27 (2014).
 - ³ Falk, R. H. & Skinner, M. The systemic amyloidoses: an overview. *Adv. Intern. Med.* 45, 107–37 (2000).
 - ⁴ Wisniowski, B. *et al.* The epidemiology of amyloidosis in Queensland, Australia. *Br. J. Haematol.* 186, 829–836 (2019).
 - ⁵ Pinney, J. H. *et al.* Systemic amyloidosis in England: an epidemiological study. *Br. J. Haematol.* 161, 525–32 (2013).
 - ⁶ Hemminki, K., Li, X., Försti, A., Sundquist, J. & Sundquist, K. Incidence and survival in non-hereditary amyloidosis in Sweden. *BMC Public Health* 12, (2012).
 - ⁷ Falk, R. H., Alexander, K. M., Liao, R. & Dorbala, S. AL (Light-Chain) Cardiac Amyloidosis: A Review of Diagnosis and Therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 68, 1323–1341 (2016).
 - ⁸ Pathology, J. M.-C. & 2015. Cardiac amyloidosis: pathology, nomenclature, and typing. *Elsevier*.
 - ⁹ Guan, J. *et al.* Lysosomal dysfunction and impaired autophagy underlie the pathogenesis of amyloidogenic light chain-mediated cardiotoxicity. *embopress.org*.
 - ¹⁰ Lo, Q. *et al.* Alterations in regional myocardial deformation assessed by strain imaging in cardiac amyloidosis. *Echocardiography* 33, 1844–1853 (2016).
 - ¹¹ Mankad, A. K. & Shah, K. B. Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Current Cardiology Reports* 19 (2017).
 - ¹² Tanskanen, M. *et al.* Senile systemic amyloidosis affects 25% of the very aged and associates with genetic variation in alpha2-macroglobulin and tau: A population-based autopsy study. *Ann. Med.* 40, 232–239 (2008).
 - ¹³ Falk, R. H. Tafamidis for transthyretin amyloid cardiomyopathy: the solution or just the beginning of the end? doi:10.1093/eurheartj/ehy697.
 - ¹⁴ González-López, *et al.* Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. Heart J.*

-
- ¹⁵ Damy, T., Costes, B. & Hagège, et al. Prevalence and clinical phenotype of hereditary transthyretin amyloid cardiomyopathy in patients with increased left ventricular wall thickness. *Eur. Heart J.*
- ¹⁶ Maurer et al. Maurer: Genotype and phenotype of transthyretin cardiac. *European heart journal* 246–254.
- ¹⁷ Rapezzi, C. & Al, A. et. Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on. *Eur. Heart J.* (2012).
- ¹⁸ Longhi, S. & Gagliardi, et al. La cardiomiopatia amiloidotica correlata alla transtiretina: alla ricerca del trattamento eziologico. *giornaledicardiologia.it* (2014).
- ¹⁹ Mesquita, E. T., Jorge, A. J. L., Souza, C. V. & Andrade, T. R. de. Cardiac Amyloidosis and its New Clinical Phenotype: Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Arq. Bras. Cardiol.* 109, 71–80 (2017).
- ²⁰ Sperry, B. W., Jones, B. M., Vranian, M. N., Hanna, M. & Jaber, W. A. Recognizing Transthyretin Cardiac Amyloidosis in Patients With Aortic Stenosis: Impact on Prognosis. *JACC: Cardiovascular Imaging* 9, 904–906 (2016).
- ²¹ Nakagawa, M. et al. Carpal tunnel syndrome: a common initial symptom of systemic wild-type TTR (TTRwt) amyloidosis. *Amyloid* 23, 58–63 (2016).
- ²² Dubrey, S. The clinical features of immunoglobulin light-chain (AL) amyloidosis with heart involvement. *QJM* 91, 141–157 (1998).
- ²³ Rapezzi, C. et al. Cardiac amyloidosis: the great pretender. *Heart Fail. Rev.* 20, 117–124 (2015).
- ²⁴ Lousada, I., Comenzo, R. L., Landau, H., Guthrie, S. & Merlini, G. Light Chain Amyloidosis: Patient Experience Survey from the Amyloidosis Research Consortium. *Adv. Ther.* 32, 920–8 (2015).
- ²⁵ Halushka, M. K. et al. Optimization of Serum Immunoglobulin Free Light Chain Analysis for Subclassification of Cardiac Amyloidosis. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 8, 264–268 (2015).
- ²⁶ Dispenzieri, A. et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet* 375, 1721–1728 (2010).
- ²⁷ Lachmann, H. J. et al. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *N. Engl.*

J. Med. 346, 1786–91 (2002).

²⁸ Grogan, M. *et al.* Natural History of Wild-Type Transthyretin Cardiac Amyloidosis and Risk Stratification Using a Novel Staging System. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 1014–1020 (2016).

²⁹ Gillmore, J. D. *et al.* A new staging system for cardiac transthyretin amyloidosis. *Eur. Heart J.* 39, 2799–2806 (2018).

³⁰ Kumar, S. *et al.* Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J. Clin. Oncol.* 30, 989–95 (2012).

³¹ Maurer, M. S., Elliott, P., Comenzo, R., Semigran, M. & Rapezzi, C. Addressing common questions encountered in the diagnosis and management of cardiac amyloidosis. *Circulation* 135, 1357–1377 (2017).

³² Falk, R. H. & Quarta, C. C. Echocardiography in cardiac amyloidosis. *Heart Fail. Rev.* 20, 125–131 (2015).

³³ Liu, D. *et al.* Longitudinal strain bull’s eye plot patterns in patients with cardiomyopathy and concentric left ventricular hypertrophy. *European Journal of Medical Research* 21, (2016).

³⁴ Karamitsos, T. D. *et al.* *Noncontrast T1 Mapping for the Diagnosis of Cardiac Amyloidosis.*

³⁵ Messroghli, D. R. *et al.* Clinical recommendations for cardiovascular magnetic resonance mapping of T1, T2, T2 and extracellular volume: A consensus statement by the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) endorsed by the European Association for Cardiovascular Imaging (EACVI). *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 19, (2017).

³⁶ Barison, A. *et al.* Measurement of myocardial amyloid deposition in systemic amyloidosis: Insights from cardiovascular magnetic resonance imaging. *J. Intern. Med.* 277, 605–614 (2015).

³⁷ Banypersad, S., Fontana, M., ... V. M.-E. heart & 2014, undefined. T1 mapping and survival in systemic light-chain amyloidosis. *academic.oup.com.*

³⁸ Richards, D. B. *et al.* Therapeutic clearance of amyloid by antibodies to serum amyloid P component. *N. Engl. J. Med.* 373, 1106–1114 (2015).

³⁹ Chacko, L., Martone, R., Cappelli, F. & Fontana, M. Cardiac Amyloidosis: Updates in Imaging. *Curr. Cardiol. Rep.* 21, (2019).

⁴⁰ Dzung, J. N. *et al.* *CMR-Based Differentiation of AL and TTR Cardiac Amyloidosis.* (2014). doi:10.1016/j.jcmg.2013.08.015.

-
- ⁴¹ Treglia, G. *et al.* Diagnostic accuracy of bone scintigraphy in the assessment of cardiac transthyretin-related amyloidosis: a bivariate meta-analysis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 45, 1945–1955 (2018).
- ⁴² Rapezzi, C. *et al.* Role of ^{99m}Tc-DPD Scintigraphy in Diagnosis and Prognosis of Hereditary Transthyretin-Related Cardiac Amyloidosis. (2011). doi:10.1016/j.jcmg.2011.03.016.
- ⁴³ Glaudemans, A. W. J. M. *et al.* Bone scintigraphy with ^{99m}technetium-hydroxymethylene diphosphonate allows early diagnosis of cardiac involvement in patients with transthyretin-derived systemic amyloidosis. *Amyloid* 21, 35–44 (2014).
- ⁴⁴ Gillmore, J. D. *et al.* Nonbiopsy diagnosis of cardiac transthyretin amyloidosis. *Circulation* 133, 2404–2412 (2016).
- ⁴⁵ Pilebro, B. *et al.* ^{99m}Tc-DPD uptake reflects amyloid fibril composition in hereditary transthyretin amyloidosis. *Ups. J. Med. Sci.* 121, 17–24 (2016).
- ⁴⁶ Fine, N. M. *et al.* Yield of noncardiac biopsy for the diagnosis of transthyretin cardiac amyloidosis. *Am. J. Cardiol.* 113, 1723–1727 (2014).
- ⁴⁷ Muchtar, E. *et al.* Improved outcomes for newly diagnosed AL amyloidosis between 2000 and 2014: Cracking the glass ceiling of early death. *Blood* 129, 2111–2119 (2017).
- ⁴⁸ D'Souza, A., Dispenzieri, A., ... B. W.-J. of C. & 2015, undefined. Improved outcomes after autologous hematopoietic cell transplantation for light chain amyloidosis: a Center for International Blood and Marrow Transplant. *ncbi.nlm.nih.gov*.
- ⁴⁹ Palladini, G., Sachchithanatham, S., Blood, P. M.- & 2015, undefined. A European collaborative study of cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone in upfront treatment of systemic AL amyloidosis. *Am Soc Hematol*.
- ⁵⁰ Santhorawala, V. *et al.* Long-term outcome of patients with AL amyloidosis treated with high-dose melphalan and stem cell transplantation: 20-year experience. *Blood* 126, 2345–2347 (2015).
- ⁵¹ Hôpital, D. H. & Mondor, et al. Outcome and incidence of appropriate implantable cardioverter-defibrillator therapy in patients with cardiac amyloidosis. *Eur. Heart J.* (2016). doi:10.1016/j.ijcard.2016.07.254.
- ⁵² Davis, M. K. *et al.* Outcomes after heart transplantation for amyloid cardiomyopathy in the modern era. *Am. J. Transplant.* 15, 650–658 (2015).

-
- ⁵³ Ericzon: Liver transplantation for hereditary transthyret. *JACC: Cardiovascular Interventions*.
- ⁵⁴ Yazaki, M. *et al.* Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs onto myocardium in FAP patients. *Am. J. Transplant.* 7, 235–242 (2007).
- ⁵⁵ Okamoto, S. *et al.* Development of cardiomyopathy after liver transplantation in Swedish hereditary transthyretin amyloidosis (TTR) patients. *Amyloid* 18, 200–205 (2011).
- ⁵⁶ Sakamoto, T. *et al.* Sack: Treatment options for severe cardiac amyloidosis: *Eu. cardiothor.*
- ⁵⁷ Adams, D. *et al.* Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 379, 11–21 (2018).
- ⁵⁸ Benson, M. D. *et al.* Inotersen treatment for patients with Hereditary transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 379, 22–31 (2018).
- ⁵⁹ Maurer, M. S. *et al.* Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 379, 1007–1016 (2018).
- ⁶⁰ Berk, J. L. Berk: Repurposing diflunisal for familial amyloid. *hematology* (2017).
- ⁶¹ Kristen, A. V. *et al.* Green tea halts progression of cardiac transthyretin amyloidosis: An observational report. *Clin. Res. Cardiol.* 101, 805–813 (2012).
- ⁶² Kristen, A. Green tea extract as a treatment for cardiac amyloidosis. *Clinical Research in Cardiology* (2012).
- ⁶³ Cardoso, I., Martins, D., Ribeiro, T., Merlini, G. & Saraiva, M. J. Synergy of combined doxycycline/TUDCA treatment in lowering Transthyretin deposition and associated biomarkers: studies in FAP mouse models. *J. Transl. Med.* 8, 74 (2010).
- ⁶⁴ Falk, R. H., Rubinow, A. & Cohen, A. S. Cardiac arrhythmias in systemic amyloidosis: correlation with echocardiographic abnormalities. *J. Am. Coll. Cardiol.* 3, 107–113 (1984).
- ⁶⁵ Palladini, G. *et al.* Holter monitoring in AL amyloidosis: prognostic implications. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 24, 1228–33 (2001).
- ⁶⁶ Priori, S. G. *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death the Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *European Heart Journal* 36, 2793–2867 (2015).

-
- ⁶⁷ Zamorano, J. L. *et al.* 2014 ESC guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The task force for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 35, 2733–2779 (2014).
- ⁶⁸ Rapezzi, C. *et al.* Systemic cardiac amyloidoses: Disease profiles and clinical courses of the 3 main types. *Circulation* 120, 1203–1212 (2009).
- ⁶⁹ Mazzarotto, F., Girolami, F., Boschi, B., ... F. B.-V. & 2018, undefined. Two decades of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy in a single center: The additive value of extended next-generation sequencing panels. *Elsevier*.
- ⁷⁰ Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics. *nature.com*.
- ⁷¹ Elliott, P. *et al.* Prevalence of Anderson-Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: The European Anderson-Fabry Disease Survey. *Heart* 97, 1957–1960 (2011).
- ⁷² Ronald M Witteles, Sabahat Bokhari, Thibaud Damy, Perry M Elliott, Rodney H Falk, Nowell M Fine, Mariana Gospodinova, Laura Obici, Claudio Rapezzi, Pablo Garcia-Pavia. Screening for Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy in Everyday Practice. doi:10.1016/j.jchf.2019.04.010. Epub 2019 Jul 10.
- ⁷³ Pablo Garcia-Pavia, Claudio Rapezzi, Yehuda Adler, Michael Arad, Cristina Basso, Antonio Brucato, Ivana Burazor, Alida L P Caforio, Thibaud Damy, Urs Eriksson, Marianna Fontana, Julian D Gillmore, Esther Gonzalez-Lopez, Martha Grogan, Stephane Heymans, Massimo Imazio, Ingrid Kindermann, Arnt V Kristen, Mathew S Maurer, Giampaolo Merlini, Antonis Pantazis, Sabine Pankuweit, Angelos G Rigopoulos, Ales Linhart. Diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis. A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. doi: 10.1002/ejhf.2140. Epub 2021 Apr 7
- ⁷⁴ 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021 Sep 21;42(36):3599-3726. doi: 10.1093/eurheartj/ehab368.
- ⁷⁵ González-López E, Gallego-Delgado M, Guzzo-Merello G, De Haro-Del Moral FJ, Cobo-Marcos M, Robles C, et al. Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J* 2015. doi:10.1093/eurheartj/ehv338.