

Carmen Lahuerta Pueyo

High Resolution Melting en el  
diagnóstico de Amiloidosis  
hereditaria por Transtiretina.  
Análisis de bases poblacionales y  
búsqueda de casos en nuestro  
medio.

Departamento

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y  
Toxicología

Director/es

Aibar Arregui, Miguel Ángel  
Menao Guillen, Sebastián

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

HIGH RESOLUTION MELTING EN EL  
DIAGNÓSTICO DE AMILOIDOSIS HEREDITARIA  
POR TRANSTIRETINA. ANÁLISIS DE BASES  
POBLACIONALES Y BÚSQUEDA DE CASOS EN  
NUESTRO MEDIO.

Autor

Carmen Lahuerta Pueyo

Director/es

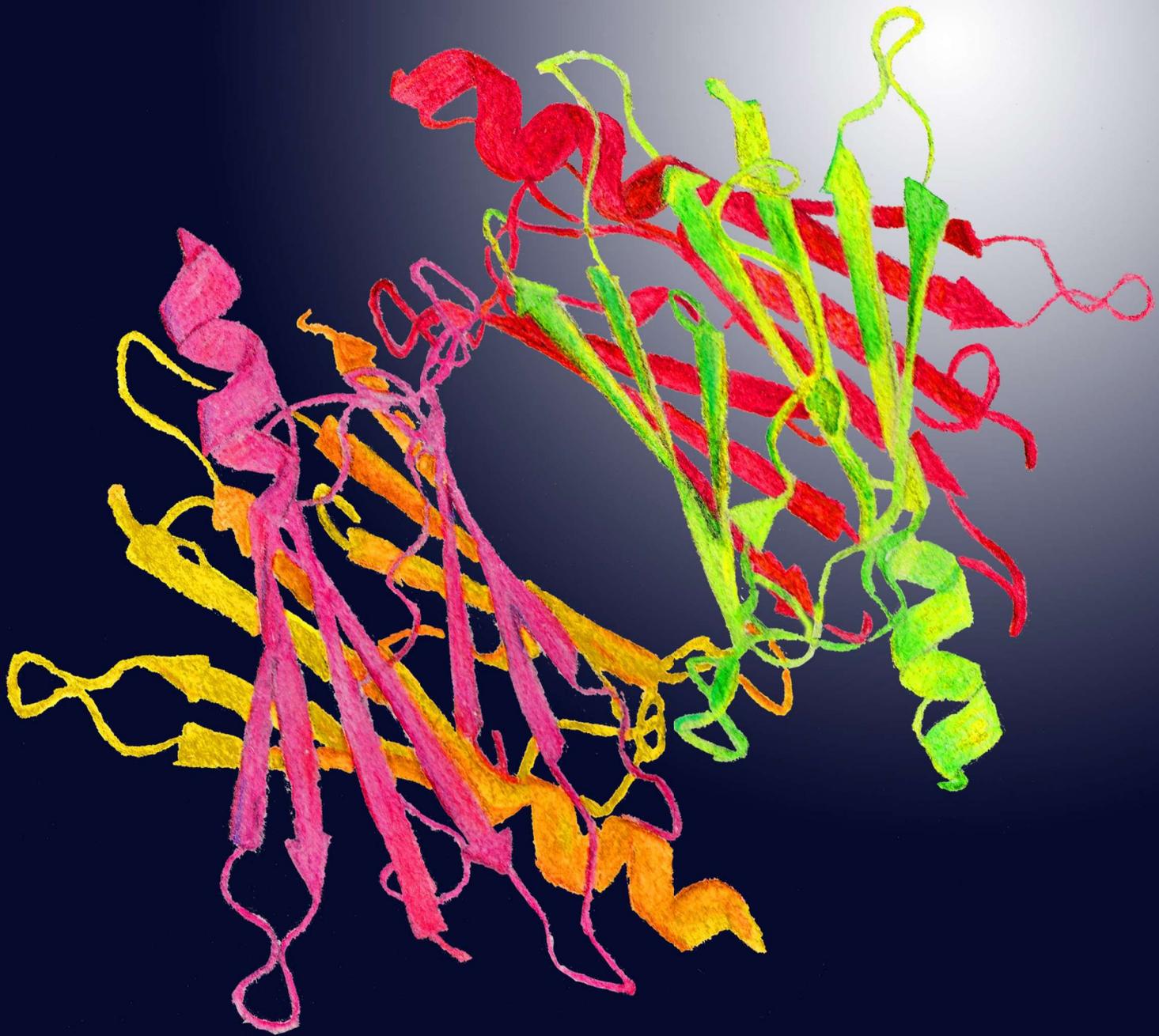
Aibar Arregui, Miguel Ángel  
Menao Guillen, Sebastián

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología

2019





**HIGH RESOLUTION MELTING EN EL DIAGNÓSTICO DE AMILOIDOSIS HEREDITARIA POR TRASTIRETINA.**

**Análisis de bases poblacionales y búsqueda de casos en nuestro medio.**

CARMEN LAHUERTA PUEYO  
TESIS DOCTORAL  
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, 2019









**Universidad  
Zaragoza**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense  
y Toxicología**

**TESIS DOCTORAL**

**HIGH RESOLUTION MELTING EN EL DIAGNÓSTICO DE  
AMILOIDOSIS HEREDITARIA POR TRANSTIRETINA.**

**Análisis de bases poblacionales y búsqueda de casos en nuestro medio.**

Memoria para optar al grado de doctor

Presentada por:

**Dña. CARMEN LAHUERTA PUEYO**

Bajo la dirección de los Doctores:

**Dr. SEBASTIÁN MENAO GUILLÉN**

**Dr. MIGUEL ÁNGEL AIBAR ARREGUI**

Marzo de 2019



**SEBASTIÁN MENAO GUILLÉN, PROFESOR ASOCIADO DE  
MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGÍA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**DECLARA**

Que la memoria presentada por Dña. Carmen Lahuerta Pueyo, con el título “High Resolution Melting en el diagnóstico de Amiloidosis hereditaria por Transtiretina. Análisis de bases poblacionales y búsqueda de casos en nuestro medio”, corresponde a un trabajo realizado bajo mi dirección. Terminada en esta fecha y revisado su contenido, estimo reúne las condiciones requeridas para optar al título de Doctor

Zaragoza, marzo de 2019

Fdo. Sebastián Menao Guillén



**MIGUEL ÁNGEL AIBAR ARREGUI, DOCTOR EN MEDICINA Y  
CIRUGÍA Y ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA DEL  
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO LOZANO BLESÁ**

**DECLARA**

Que la memoria presentada por Dña. Carmen Lahuerta Pueyo, con el título “High Resolution Melting en el diagnóstico de Amiloidosis hereditaria por Transtiretina. Análisis de bases poblacionales y búsqueda de casos en nuestro medio”, corresponde a un trabajo realizado bajo mi dirección. Terminada en esta fecha y revisado su contenido, estimo reúne las condiciones requeridas para optar al título de Doctor

Zaragoza, marzo de 2019

Fdo. Miguel Ángel Aibar Arregui



Soy de las que piensan que la ciencia

tiene una gran belleza.

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico,  
también es un niño colocado ante fenómenos naturales  
que lo impresionan como un cuento de hadas.

*Marie Curie.*



A mi abuelo,  
quien supo transmitirme la importancia del conocimiento  
para poder ser una persona libre.



# AGRADECIMIENTOS

Quiero transmitir mis agradecimientos:

A mis directores de Tesis Dr. Sebastián Menao Guillén y Dr. Miguel Ángel Aibar Arregui, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su constante ayuda y consejos durante estos años.

A mi tutor, Dr Juan Pie, por estar disponible para lo que he necesitado.

Al profesor Víctor Sorribas y a todo el departamento de Toxicología por permitirme formar parte del grupo de investigación Toximol así como permitirme realizar parte de las labores de este trabajo en su laboratorio.

A Natalia Guillén, por su gran ayuda e interés en este proyecto, siempre dispuesta a ayudarme. Muchas gracias por tu amabilidad y profesionalidad.

A mis compañeros del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Lozano Blesa, por todo lo aprendido de ellos en estos años a nivel profesional y personal.

A María Ángel Julián, tutora de residentes del servicio y un pilar fundamental. A mis compañeras de residencia por su amistad y ayuda desinteresada.

Al personal del servicio de Biología Molecular, en especial a Teresa y Vivian, su ayuda ha sido fundamental en mi aprendizaje en este campo y en la realización de este trabajo.

Al servicio de Medicina Interna del H.C.U. Lozano Blesa por permitirme realizar una parte importante del trabajo en su servicio ofreciéndome siempre su colaboración.

A Anyuli Gracia y Esperanza Bueno por su implicación en este tema, su constante ayuda y ánimos en este proceso.

Al Dr. Miguel Ángel Torralba y su grupo, por su gran profesionalidad y por el interés que han tenido en el proyecto.

Al Doctor Yehia El-Miry y Carlos Sánchez del departamento de Fisiología de la Universidad de Salamanca, apasionados de la investigación quienes me enseñaron a disfrutar de cada momento de trabajo en el laboratorio.

A mi madre y mi hermana por la confianza que siempre tienen en mí. Dos mujeres inteligentes, luchadoras y generosas que hacen que el camino sea más fácil.

A Alejandro, por ayudarme día a día con cariño y paciencia. Por respetar todas las horas que he tenido que dedicar a este trabajo. Gracias por tu esfuerzo y comprensión en cada uno de los pasos que he dado.

A mi gran familia, Mercedes, Fernando, Carmen Yu y Pilar Fukui quienes me han animado en cada momento, han hecho que confiara en mí ayudándome siempre como a una hija.

A Alberto, Carmen, Leire y Patri, más que amigos son mi otra familia; gracias por compartir vuestros momentos conmigo.

# ABREVIATURAS

<b><sup>99m</sup>Tc-DPD</b>	Ácido <sup>99m</sup> Tc-3,3-difosfono-1,2-propanodi-carboxílico
<b>A<sub>230</sub></b>	Absorbancia a 230 nm
<b>A<sub>260</sub></b>	Absorbancia a 260 nm
<b>A<sub>280</sub></b>	Absorbancia a 280 nm
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>AA</b>	Proteína amiloide de proteína sérica A
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AL</b>	Proteína amiloide de inmunoglobulinas de cadena ligera
<b>Ala</b>	Alanina
<b>Arg</b>	Arginina
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>ATTR</b>	Proteína amiloide de transtiretina
<b>ATTRm</b>	Proteína amiloide de amiloidosis hereditaria por transtiretina
<b>ATTRwt</b>	Proteína amiloide de amiloidosis wild-type
<b>c.s.p.</b>	Cantidad suficiente para
<b>CEICA</b>	Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón
<b>Cp</b>	Ciclo umbral
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>Da</b>	Dalton
<b>ddNTP</b>	Didesoxinucleótido trifosfato
<b>DHPLC</b>	Denaturing high-performance liquid chromatography
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>DPN</b>	Puntuación modificada de discapacidad por polineuropatía
<b>DTT</b>	Ditioteitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ESP</b>	Exome sequencing project
<b>et al.</b>	Y otros
<b>ExAC</b>	Exome aggregation consortium
<b>FAC</b>	Cardiomiopatía amiloidótica familiar
<b>FAP</b>	Polineuropatía amiloidótica familiar
<b>FEVI</b>	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
<b>g</b>	Gramo
<b>GAGs</b>	Glucosaminoglicanos
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GnomAD</b>	Genome aggregation database
<b>HFpEF</b>	Insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada

<b>HGMD</b>	Human gene mutation database
<b>His</b>	Histidina
<b>HPR</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HRMA</b>	High-resolution melting analysis
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IC</b>	Insuficiencia cardiaca
<b>IECAS</b>	Inhibidores de la encima convertidora de angiotensina
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>ISA</b>	International Society of Amyloidosis
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Litro
<b>Leu</b>	Leucina
<b>Lys</b>	Lisina
<b>M</b>	Molar
<b>MAF</b>	Mínima frecuencia alélica
<b>Met</b>	Metionina
<b>mV</b>	Megavoltio
<b>NAC</b>	Centro Nacional de Amyloidosis
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NGS</b>	Next-generation Sequencing
<b>NHLBI</b>	National Heart, Lung, and Blood Institut
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>NT-proBNP</b>	Propéptido natriurético cerebral N-terminal
<b>OAS</b>	Oligonucleótidos antisentido
<b>PAAF</b>	Punción aspiración con aguja fina
<b>PAS</b>	Péptido amiloide sérico
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato-salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>Pro</b>	Prolina
<b>PVDF</b>	Polivinildifluoruro
<b>RBP</b>	Proteína transportadora de retinol
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAP</b>	Fosfatasa alcalina de camarón
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico

<b>SELDI-TOF</b>	Surface-enhanced laser desorption/ionization
<b>Ser</b>	Serina
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>SNV</b>	Single nucleotide variant
<b>SSCP</b>	Single stranded conformational polymorphism
<b>T<sub>4</sub></b>	Tiroxina
<b>TBE</b>	Tampón Tris, Borato y EDTA
<b>Thr</b>	Treonina
<b>Tm</b>	Temperatura de melting
<b>tof</b>	Tiempo de vuelo
<b>TOH</b>	Trasplante ortotópico de hígado
<b>Trp</b>	Triptófano
<b>TTR</b>	Transtiretina
<b>TUDCA</b>	Ácido tauroursodeoxicólico
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>V</b>	Voltios
<b>Val</b>	Valina
<b>μ</b>	Micra
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar



# ÍNDICE

## 1. Introducción

1.1 Amiloidosis sistémicas.....	3
1.1.1 Patogénesis y estructura amiloide.....	3
1.1.2 Clasificación y tipos de amiloidosis .....	6
1.2 Amiloidosis por transtiretina.....	10
1.2.1 Gen y proteína.....	10
1.2.2 Fisiopatología .....	11
1.2.3 Clasificación .....	14
1.2.3.1 Amiloidosis por transtiretina wild type.....	15
1.2.3.2 Amiloidosis hereditaria por transtiretina.....	16
1.2.4 Manifestaciones clínicas amiloidosis ATTR hereditaria .....	18
1.2.4.1 Polineuropatía amiloidótica familiar.....	19
1.2.4.2 Amiloidosis cardiaca familiar. ....	21
1.2.4.3 Amiloidosis leptomeníngea y oculoleptomeníngea .....	22
1.2.4.4 Fenotipos mixtos .....	23
1.2.5 Diagnóstico .....	25
1.2.5.1 Polineuropatía .....	25
1.2.5.2 Cardiopatía .....	25
1.2.5.3 Pruebas confirmatorias.....	27
1.2.5.4 Otras pruebas.....	28
1.2.6 Tratamiento .....	29
1.2.7 Comparativa Amiloidosis por transtiretina wild type -vs-genética.....	32
1.2.8 Situación actual: Infradiagnóstico de la amiloidosis ATTR .....	33
1.2.8.1 Estudio de prevalencia .....	33
1.2.8.2 Estudio de técnicas de screening.....	35

## 2. Hipótesis y objetivos

2.1	Hipótesis.....	41
2.2	Objetivos .....	42

## 3. Material y métodos

3.1	Diseño del estudio .....	45
3.2	Análisis de la base GnomAD .....	46
3.3	Estudio de amiloidosis ATTRm en nuestro medio.....	48
3.3.1	Selección de paciente .....	48
3.3.2	Obtención de muestras .....	50
3.3.3	Secuenciación del gen TTR.....	52
3.4	High-resolution melting analysis (HRMA).....	58
3.4.1	Procedimiento del ensayo HRMA .....	59
3.4.2	Análisis de resultados.....	61
3.5	Detección de la proteína en suero por Isoelectroenfoque .....	63
3.5.1	Eliminación de albúmina.....	64
3.5.2	Preparación del buffer de IEF .....	64
3.5.3	Aplicación de la muestra y rehidratación de la tira IEF .....	66
3.5.4	Detección inmunoespecífica de la proteína TTR .....	67

## 4. Resultados

4.1	Análisis de la base gnomAD.....	73
4.1.1	Variantes patológicas.....	74
4.1.2	Variantes probablemente patológicas.....	79
4.1.3	Variantes de significado incierto .....	80
4.1.4	Variantes probablemente benignas .....	82
4.1.5	Polimorfismos o variantes benignas.....	82

4.2	Estudio de los casos de amiloidosis ATTR en nuestro medio .....	83
4.2.1	Características generales de la muestra .....	83
4.2.2	Variantes génicas encontradas .....	87
4.3	Resultados HRMA.....	93
4.3.1	Resultados exón 2 .....	95
4.3.2	Resultados exón 3 .....	99
4.3.3	Resultados exón 4 .....	103
4.4	Detección de la proteína en suero por isoelectroenfoco .....	109
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	
5.1	Análisis de la base gnomAD.....	116
5.1.1	Variantes analizadas .....	116
5.1.2	Prevalencia de amiloidosis ATTRm.....	117
5.1.3	Variantes patogénicas más frecuentes.....	119
5.2	Estudio de los casos de amiloidosis ATTR en nuestro medio .....	127
5.2.1	Características generales de la muestra .....	127
5.2.2	Variantes génicas encontradas .....	129
5.3	Técnicas de screening genético .....	134
5.4	Detección de la proteína mutada en suero .....	137
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	
<b>8.</b>	<b>Índice de tablas</b>	
<b>9.</b>	<b>Índice de figuras</b>	
<b>10.</b>	<b>Anexos</b>	

## 11.Publicaciones

# **1.- INTRODUCCIÓN**



## 1.1 AMILOIDOSIS SISTÉMICAS

Amiloidosis es el nombre que recibe un grupo heterogéneo de enfermedades raras cuya característica común es el depósito extracelular de una proteína plegada erróneamente (proteína amiloide) que forma un material proteico insoluble, el cual se acumula en distintos órganos produciendo un daño progresivo sobre ellos (1).

La primera descripción de un paciente con amiloidosis fue realizada probablemente hace más de 300 años por Fonteyn en 1639, tras el estudio de la autopsia de un paciente joven. Rokitansky en 1842, realizó la primera descripción morfológica de estas alteraciones en diversos órganos y fue en 1854 cuando Rudolf Virchow introdujo el término “amiloide” (del griego Amylon, almidón) tras observar que estos precipitados extracelulares se volvían color marrón después de la incubación con yodo, al igual que ocurre con el almidón. A pesar de que los depósitos amiloides son proteínas en lugar de polisacáridos, los términos “amiloide” y “amiloidosis” se siguen utilizando para denominar a este grupo heterogéneo de enfermedades (2,3).

### 1.1.1. PATOGÉNESIS Y ESTRUCTURA AMILOIDE

Las proteínas (o fragmentos de proteínas) responsables de los depósitos amiloides suelen ser de tamaño pequeño, entre 10-15 kDa (3). Las causas por las cuales estas proteínas solubles pasan a ser precursoras amiloidogénicas no están del todo esclarecidas pero se han descrito varios mecanismos (1,4,5), que pueden darse de manera aislada o asociarse unos con otros:

1. La proteína puede tener tendencia natural a adoptar una conformación patogénica, que se vuelve más evidente con la edad, ocurre por ejemplo con la transtiretina en amiloidosis senil o con el péptido natriurético auricular.
2. Alta concentración de la proteína en suero durante un largo periodo de tiempo, como ocurre por ejemplo en pacientes dializados con la concentración de la proteína beta-2-microglobulina o la proteína sérica A en pacientes con infecciones crónicas o enfermedad reumatológica.

3. Modificación de la estructura de la proteína por mutaciones, como ocurre en la amiloidosis genética por transtiretina.

En cuanto a la estructura de los depósitos amiloides, todos tienen una estructura similar. Están compuestos mayoritariamente por un núcleo formado por el denominado componente fibrilar y en menor medida por péptido amiloide sérico y glucosaminoglicanos (3,4).

- **Componente fibrilar.**

Todos los depósitos amiloides están formados en su mayoría por un componente fibrilar, el cual presenta una estructura común de lámina beta plegada. Está compuesto por polímeros insolubles que provienen de proteínas solubles (una proteína distinta en cada tipo de amiloidosis), las cuales adquieren una estructura secundaria de cadena  $\beta$ . Las cadenas  $\beta$  se ensamblan por puentes de hidrógeno dando lugar a láminas  $\beta$ , las cuales a su vez se ensamblan formando láminas  $\beta$  cruzadas y generan protofibras (o protofilamentos), fibras (o filamentos) y finalmente fibras maduras. Esta estructura fibrilar, es insoluble y muy resistente a la proteólisis, tiene además la capacidad de unirse a la tinción Rojo Congo mostrando birrefringencia verde cuando se observa bajo luz polarizada al microscopio electrónico, lo que permite su identificación en el laboratorio (5). (Figura 1).

- **Componente no fibrilar.**

Necesario para la formación y estabilización de las fibras. Está formado principalmente por:

- Péptido amiloide sérico (PAS): deriva de una glicoproteína plasmática de síntesis hepática y que forma parte de la familia de las pentraxinas. Tiene gran afección por el componente fibrilar uniéndose a él en un proceso calcio dependiente. El PAS protege a las fibras de la proteólisis haciéndolas resistentes a la degradación (6).

- Glucosaminoglicanos (GAGs) como heparán sulfato y dermatán sulfato, unidos de forma no covalente a las fibrillas. Interaccionan con los componentes de la matriz extracelular como laminina, entactina y colágeno IV.

Forma una estructura que facilita la fase inicial de la nucleación y puede tener un papel importante en la localización del depósito amiloide (3,4).

- Apolipoproteína E: componente habitual de los depósitos amiloides, sin embargo su función no está bien establecida. Actúa como mediador de la deposición de amiloide y la estabilidad del depósito. Actúa probablemente como chaperona patológica al alterar la conformación de las proteínas amiloidogénicas (7,8).

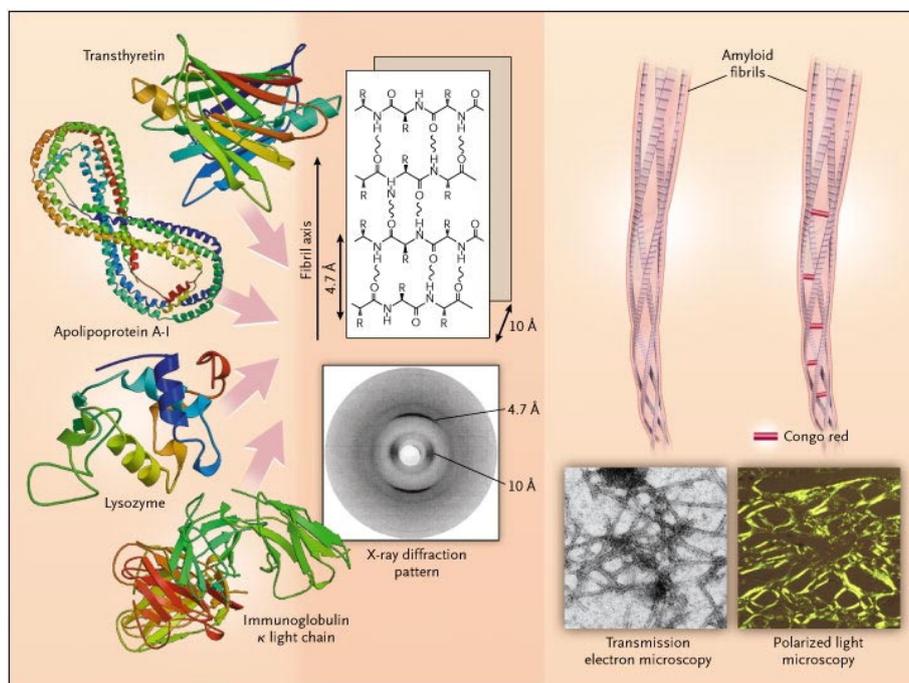


Figura 1. Formación de depósitos amiloides. Adaptado de Merlini et al. (9)

### 1.1.2. CLASIFICACIÓN Y TIPOS DE AMILOIDOSIS

Clásicamente, los distintos tipos de amiloidosis se han clasificado según el cuadro clínico que producen pero la actual clasificación se basa en la proteína responsable de la enfermedad. Esta actual nomenclatura propuesta por The Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis (ISA) indica que los depósitos de amiloide se deben clasificar según la proteína precursora (10). Para denominar a la proteína precursora, se utiliza la mayúscula A de amiloide, como primera letra de designación seguida por la denominación de la proteína. Así por ejemplo cuando el depósito amiloide deriva de inmunoglobulinas de cadena ligera, la proteína amiloide recibe el nombre de AL y la enfermedad será amiloidosis AL. Si la proteína implicada es la transtiretina, ésta recibe el nombre de ATTR y la enfermedad será amiloidosis ATTR.

Además de esta nomenclatura basada en la proteína fibrilar específica de cada tipo, las amiloidosis pueden ser por un lado sistémicas o localizadas dependiendo del lugar donde se produce el depósito amiloide y por otro según sean hereditarias o adquiridas (11).

Hay muchos tipos de amiloidosis producidos cada uno por el depósito de una proteína diferente, pero destacan por ser más comunes la amiloidosis primaria o AL, la amiloidosis secundaria o AA y la amiloidosis por depósitos de transtiretina (ATTR).

En la amiloidosis AL, se depositan cadenas ligeras *kappa* (75% de los casos) o *lambda* (25%) producidas por un clon de células plasmáticas medulares, pudiendo aparecer en pacientes con mieloma múltiple o algunos linfomas (12,13). Afecta principalmente a riñón (órgano afectado en el 75% de los casos), seguido de corazón (50-60%) y en menor medida a sistema nervioso periférico y autónomo, tejidos blandos, hígado y tracto gastrointestinal. Tras el diagnóstico la media de supervivencia es de entre 6 y 12 meses, siendo la afectación cardíaca el factor pronóstico más importante.

La Amiloidosis AA está producida por el depósito de la proteína sérica A (SSA), una apolipoproteína de alta densidad que actúa como reactante de fase aguda, se sintetiza en el hígado en respuesta a citocinas proinflamatorias.

Se relaciona con procesos que cursan con inflamación crónica como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal o la fiebre reumática entre otros. La manifestación más frecuente es fracaso renal seguido de afectación hepática. Presentan una mediana de supervivencia de 3-4 años. Su incidencia ha ido disminuyendo progresivamente en los países occidentales probablemente en relación con la mejora de los tratamientos de dichas patologías (13,14).

En la amiloidosis por transtiretina la proteína responsable de la enfermedad es la transtiretina (TTR), proteína que participa en el transporte de tiroxina y retinol en sangre. Se produce fundamentalmente en el hígado (>95%), y en menor medida en los plexos coroideos y en el epitelio pigmentario de la retina. Es una proteína con una tendencia natural a formar fibrillas amiloides que se depositan en los tejidos causando daño tisular y toxicidad celular (15).

La TTR puede producir dos tipos de amiloidosis, una está asociada al envejecimiento y se denomina variante senil o “Wild Type ATTR” (ATTRwt) produciendo fundamentalmente patología cardíaca y síndrome del túnel del carpo. El otro tipo es debido a mutaciones del gen *TTR* que conducen a la producción de una proteína defectuosa que es la causante de la enfermedad, en este segundo caso las manifestaciones más importantes se producen a nivel cardíaco y del sistema nervioso (3).

Hay pocos estudios sobre epidemiología de la amiloidosis publicados (13), uno de los que más casos aglutina es el recogido por el Centro Nacional de Amiloidosis (NAC) de Reino Unido, donde se recogen 5100 casos de amiloidosis desde 1987 hasta 2012 (1).

Según estos autores, la frecuencia de amiloidosis AL en su centro se mantiene estable a lo largo de estos años, en torno al 67% de todos los casos de amiloidosis. En lo referido a la amiloidosis AA, su incidencia ha disminuido significativamente a lo largo de estos años, desde el 32 % de los casos en los años 1987-1995 al 6.8% en el periodo de 2009-2012. Por último, los datos de amiloidosis por ATTR muestran una tendencia al alza, de pocos casos en el primer periodo de este estudio (0.2%) a un 6.4% en 2012 para la forma ATTRwt, mientras que en el caso de amiloidosis ATTRm el porcentaje se cifra en el 6.6% de los casos de amiloidosis (1).

Estas tres entidades (amiloidosis AL, amiloidosis AA y amiloidosis ATTR) son las más estudiadas pero son muchas las proteínas que se han identificado como amiloidogénicas. Hasta el momento hay descritas al menos 36 proteínas causantes de enfermedad y gracias a los últimos avances técnicos de estudio de proteínas basados en la espectrometría de masas se sugiere que prácticamente cualquier proteína podría, en circunstancias concretas, producir enfermedad (10). (Tabla 1)

Proteína fibrilar	Proteína precursora	Sistémico o localizado	Adquirido o hereditario	Órganos diana
<b>AL</b>	Inmunoglobina de cadena ligera	S, L	A, H	Todos los órganos, excepto el SNC
<b>AH</b>	Inmunoglobina de cadena pesada	S, L	A	Todos los órganos, excepto el SNC
<b>AA</b>	(Apo) Amiloide sérico A	S	A	Todos los órganos, excepto el SNC
<b>ATTR</b>	Transtiretina, wild type	S	A	Corazón principalmente en hombres, ligamentos, tendón.
	Transtiretina, variantes	S	H	SNP, SNA, corazón, ojo, leptomeninges.
<b>A<math>\beta</math>2M</b>	$\beta$ 2-Microglobulina, wild type	S	A	Sistema musculoesquelético
	$\beta$ 2-Microglobulina, variantes	S	H	SNA
<b>AApoAI</b>	Apolipoproteína A I, variantes	S	H	Corazón, hígado, riñón, SNP, testículos, laringe, piel.
<b>AApoAII</b>	Apolipoproteína A II, variantes	S	H	Riñón
<b>AApoAIV</b>	Apolipoproteína A IV, wild type	S	A	Riñón.
<b>AApoCII</b>	Apolipoproteína C II, variantes	S	H	Riñón
<b>AApoCIII</b>	Apolipoproteína C III, variantes	S	H	Riñón
<b>AGel</b>	Gelsolina, variantes	S	H	SNP, cornea
<b>ALys</b>	Lisozima, variantes	S	H	Riñón

Tabla 1. Proteínas amiloidogénicas. A, adquirido; H, hereditario; L, localizado; S, sistémico; SNA, sistema nervioso autónomo; SNC, sistema nervioso central; SNP, sistema nervioso periférico. Adaptado de Sipe et al. (10)

Proteína fibrilar	Proteína precursora	Sistémico o localizado	Adquirido o hereditario	Órganos diana
<b>ALECT2</b>	Factor quimiotáctico de leucocitos 2	S	A	Riñón
<b>AFib</b>	Cadena Fibrinógeno $\alpha$ .	S	H	Riñón
<b>ACys</b>	Cistatina C	S	H	SNP, piel
<b>ABri</b>	ABriPP	S	H	SNC
<b>ADan</b>	ADanPP	L	H	SNC
<b>A<math>\beta</math></b>	Proteína precursora A $\beta$ , wild type	L	A	SNC
	Proteína precursora A $\beta$ , variante	L	H	SNC
<b>A<math>\alpha</math>Syn</b>	$\alpha$ -Sinucleína	L	A	SNC
<b>ATau</b>	Tau	L	A	SNC
<b>APrP</b>	Proteína priónica, wild type	L	A	ECJ, síndrome insomnio fatal
	Proteína priónica variantes	L, S	H	ECJ, GSS, síndrome insomnio fatal, SNP
<b>ACal</b>	(Pro)calcitonina	L	A	Tumores de tiroides de células C
<b>AIAPP</b>	Polipéptido amiloide de los islotes	L	A	Islotes de Langerh, SNA, insulinomas.
<b>AANF</b>	Factor natriurético auricular	L	A	Aurícula cardíaca
<b>APro</b>	Prolactina	L	A	Prolactinomas hipofisarios
<b>AIns</b>	Insulina	L	A	Iatrogénico, inyección local
<b>ASPC</b>	Proteína surfactante pulmonar	L	A	Pulmón
<b>AGal7</b>	Galectina 7	L	A	Piel
<b>ACor</b>	Corneodesmosina	L	A	Epitelio cornificado, folículos capilares
<b>AMed</b>	Lactaderina	L	A	Media de aorta
<b>AKer</b>	Querato-epitelina	L	A	Cornea
<b>ALac</b>	Lactoferrina	L	A	Cornea
<b>AOAAP</b>	Proteína odontogénica asociada a ameloblasto.	L	A	Tumores odontogénicos.
<b>ASem1</b>	Semenogelina 1	L	A	Vesícula seminal
<b>AEnf</b>	Enfurvitida	L	A	Iatrogénica

Continuación tabla 1. Proteínas amiloidogénicas. A, adquirido; ECJ, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; GSS, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker; H, hereditario; L, localizado; S, sistémico; SNA, sistema nervioso autónomo; SNC, sistema nervioso central; SNP, sistema nervioso periférico. Adaptado de Sipe et al. (10)

## 1.2. AMILOIDOSIS POR TRANSTIRETINA

**1.2.1 GEN Y PROTEINA** La amiloidosis por transtiretina es una enfermedad rara, caracterizada por el depósito de transtiretina como se ha explicado anteriormente.

El gen de la TTR de aproximadamente 7 Kb, está localizado en el brazo largo del cromosoma 18 (18q12.1). Está compuesto por 4 exones de unas 200 bases cada uno. El exón 1 codifica para el péptido señal formado por 20 aminoácidos y para los primeros tres residuos de la proteína madura. El exón 2 codifica para los aminoácidos 4 – 47, el exón 3 para los aminoácidos 48 – 92 y el exón 4 del 93 – 127 (16).

La proteína resultante, de aproximadamente 55 kDa, tiene una conformación tetramérica formada por cuatro monómeros iguales. Cada monómero está formado por 127 aminoácidos y contiene dos láminas beta antiparalelas (cada lámina formada por dos hebras beta) y una pequeña zona de alfa hélice. Cada dos monómeros se unen mediante puentes de hidrógeno formando un dímero y posteriormente dos dímeros se asocian mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno para formar el tetrámero (17,18).

La transtiretina se encuentra en sangre a una concentración de 3–7  $\mu\text{M}$  donde se encarga de transportar la hormona tiroxina. Es un transportador secundario ya que la tiroxina se transporta principalmente (aproximadamente un 65%) unida a la globulina fijadora de tiroxina (TBG). En la zona interna del tetrámero queda un canal hidrofóbico en el cual se encuentran dos puntos de unión para la tiroxina, como estos sitios de unión presentan una cooperatividad negativa, solo una molécula de T4 puede ser transportada por cada TTR (15). También participa en el transporte de retinol en asociación con la proteína transportadora de retinol (RBP), en la superficie de la proteína se encuentran cuatro receptores de unión de la proteína transportadora de retinol, pero por impedimento estérico cada molécula solo transportará dos moléculas de retinol (15,17). (Figura 2)

Además de estar presente en sangre, también está a bajas concentraciones (0.1–0.4  $\mu\text{M}$ ) en líquido cefalorraquídeo donde es el principal transportador de tiroxina (15).

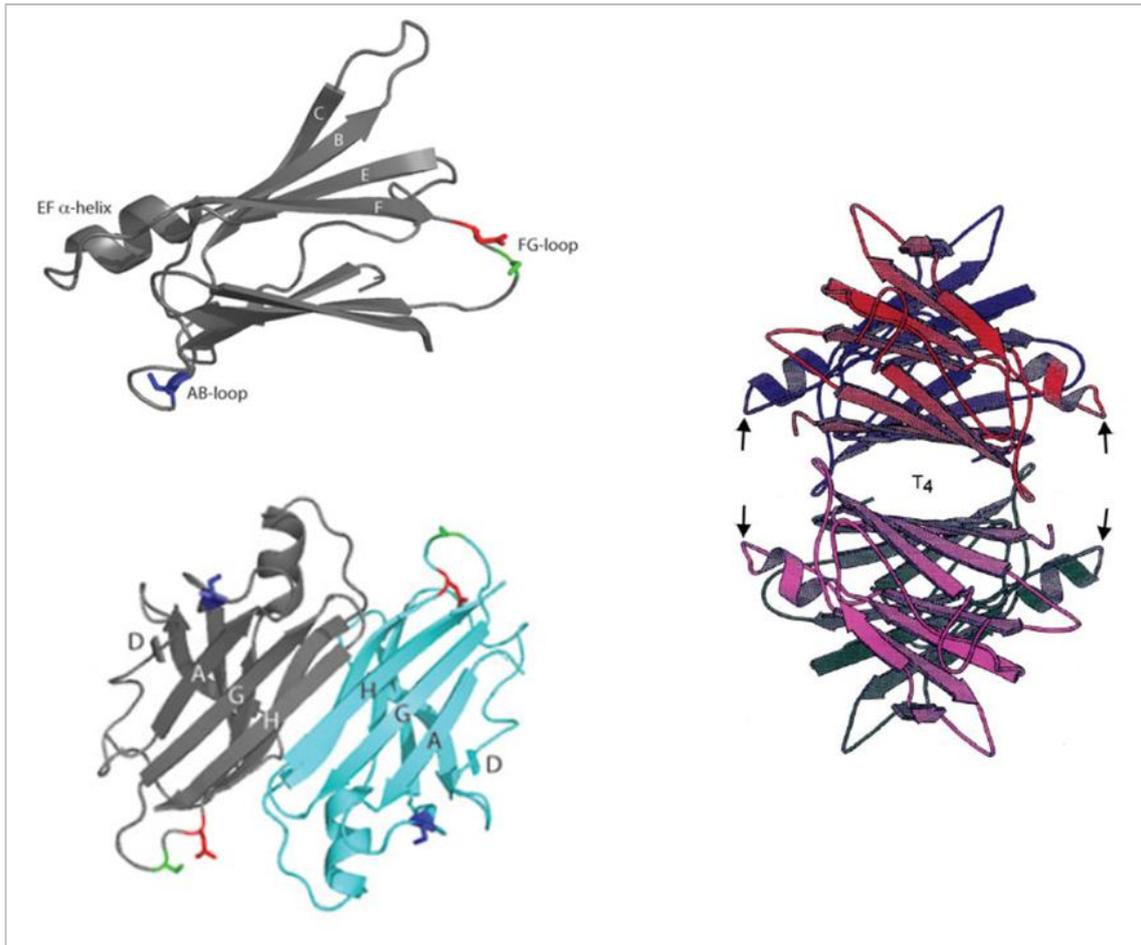


Figura 2. Estructura de la transtiretina. A, monómero; B, dímero; C, tetrámero. Las flechas indican el lugar de unión de RBP/Retinol.

Adaptado de Mangrolia et al y Benson et al.

La mayoría de las teorías propuestas para explicar la patogénesis de la enfermedad describen que en el proceso amiloidogénico primero el tetrámero debe disociarse en dímeros y posteriormente en sus monómeros. Los monómeros adoptan una conformación intermedia y se autoensamblan formando agregados solubles, los cuales constituyen las fibras amiloides insolubles que van acumulándose extracelularmente y causando daño en los tejidos (19,20). (Figura 3)



Figura 3. Mecanismo de formación de los depósitos amiloides en la amiloidosis por transtiretina:

Se han propuesto distintos mecanismos que intentan explicar el punto clave de la formación de los depósitos amiloides:

#### A. Cinética de disociación del tetrámero de TTR en monómeros.

La mayoría de los estudios señalan que la disociación del tetrámero puede ser uno de los pasos críticos en el proceso amiloidogénico. La disociación de los tetrámeros empieza por la separación dímero-dímero, afectando a los lugares de unión de la tiroxina, y posteriormente y más rápidamente se disocian a monómeros (21). El resultado de las diferentes mutaciones se traduce en la modificación de la cinética de disociación del tetrámero (22,23). El aumento de la velocidad de disociación, podría estar relacionado con la variabilidad en la edad de inicio de la enfermedad o con la agresividad de los síntomas en algunos de los casos (24,25).

#### B. Estabilidad del monómero intermedio.

Esta teoría se centra en el estudio del monómero no-nativo resultante de la disociación del tetrámero (26,27). Se explica que si el monómero no-nativo tiene poca estabilidad termodinámica tendrá mayor tendencia a adoptar una conformación más propensa a formar agregados solubles responsables de la formación de fibras. Así las mutaciones con monómeros no-nativos más inestables serán las más patógenas.

### C. Reconstrucción del tetrámero versus agregación.

Una vez se generan los monómeros, estos están en equilibrio entre agregación (formación de depósitos insolubles) y reconstrucción del tetrámero original. Recientes estudios sobre la influencia de este equilibrio demuestran que la TTRwt se reconstruye en tetrámero a una velocidad mucho mayor que la p.Val50Met. Con lo cual, cuanto menor sea esta velocidad de reconstrucción, más se facilitará el acumulo de monómeros in vivo (28).

Tanto los depósitos de material amiloide, como los productos intermedios formados en el proceso de la amiloidosis parece que son capaces de producir citotoxicidad. Estos pueden desencadenar una respuesta de estrés intracelular, creándose un ambiente pro-inflamatorio que resulta en daño oxidativo y muerte celular (29,30).

El inicio de la enfermedad está estrechamente relacionado con la desestabilización del tetrámero, ya sea como consecuencia de una mutación puntual o asociado a procesos del envejecimiento (31). El envejecimiento es un punto clave, tanto en la amiloidosis ATTRwt como algunos tipos de amiloidosis hereditaria que producen síntomas a edades tardías (como por ejemplo la variante p.Val142Ile); la oxidación de proteínas asociada al envejecimiento se ha estudiado en distintos modelos, en los que se ha concluido que las isoformas oxidadas estudiadas (TTRwt y TTR-Val142Ile) presentan menor estabilidad termodinámica y producen mayor efecto citotóxico que las no oxidadas (29,32).

La velocidad de disociación del tetrámero como paso determinante en la patogénesis de la enfermedad es ampliamente aceptado, pero debemos pensar que el potencial patogénico viene determinado además por la combinación de diversos factores como puede ser modificadores ambientales, epigenéticos, etc., ya que por ejemplo una misma mutación puede presentar fenotipos muy distintos según la población en la que se presenta, como ocurre en el caso de p.Val50Met (33–35). Se han propuesto diferentes factores que pueden influir en el inicio y el curso de la enfermedad como son variaciones genéticas en regiones no codificantes, alteraciones en proteínas con función de chaperona o deficiencias en el sistema ubiquitina-proteosoma; mecanismos estudiados también en otras enfermedades degenerativas como Parkinson, Alzheimer o Huntington (36–38).

Otro factor a tener en cuenta en la amiloidosis por transtiretina y que también influye en el inicio de la enfermedad y en los síntomas, es la composición que presenta el depósito amiloide. Al analizar depósitos amiloides de pacientes p.Val50Met, Westemar y sus colaboradores, describen dos tipos de depósitos distintos. Por un lado el tipo A, formado por fragmentos C-terminal de la proteína además de TTR completa; el otro tipo, tipo B formado solo por proteína completa. Sugieren que al menos hay dos mecanismos que podrían estar asociados a distintos fenotipos de enfermedad y que debería ser estudiado más ampliamente (31, 39,40).(Tabla 2)

	Tipo A	Tipo B
<b>Composición depósito amiloide</b>	Fragmentos c-terminal TTR completa	TTR completa
<b>Tipo de amiloidosis asociado</b>	ATTRwt / ATTRm	ATTRm
<b>Inicio de la enfermedad</b>	Tardío	Precoz
<b>Afinidad por Rojo Congo</b>	Baja	Alta
<b>Afectación cardiaca</b>	Si	No

Tabla 2. Tipos de depósitos amiloides de transtiretina y sus características.

### 1.2.3 CLASIFICACIÓN

La transtiretina se asocia a dos tipos de amiloidosis, una está asociada al envejecimiento y se denomina variante senil o “Wild Type ATTR” (ATTRwt), el segundo tipo es la amiloidosis familiar (ATTRm) que es debida a variantes en el gen de la TTR que conducen a la producción de una proteína defectuosa.

### 1.2.3.1 Amiloidosis por transtiretina Wild Type

La amiloidosis senil, actualmente denominada amiloidosis ATTRwt (10) es una enfermedad adquirida producida por el acumulo extracelular de transtiretina no mutada (41). La transtiretina tiene una tendencia natural a formar depósitos amiloides, puede desestabilizarse aunque no existan mutaciones en el gen *TTR*, e ir acumulándose extracelularmente llegando a causar daño en diversos tejidos especialmente a nivel cardiaco.

La amiloidosis ATTRwt se asocia al envejecimiento, aparece en pacientes mayores de 60 años, siendo la población afectada en un 88.8% hombres y mayoritariamente caucásicos (42,43).

La prevalencia de esta enfermedad es desconocida, pero varios estudios indican que es una entidad infradiagnosticada (44,45). Los casos registrados de amiloidosis ATTRwt están en aumento debido tanto al envejecimiento de la población como al avance de nuevas técnicas diagnósticas, como por ejemplo la gammagrafía con <sup>99m</sup>Tc-DPD (46). Los estudios disponibles que apoyan la hipótesis del infradiagnóstico son:

- Estudios post-mortem reflejan que la prevalencia de depósitos amiloides de ATTRwt en personas mayores de 80 años es del 25% (47).
- El 25% de las personas mayores de 80 años con complicaciones cardiacas, presentan depósitos de ATTRwt (48).
- El 5% de los pacientes con insuficiencia cardiaca con fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) preservada, presentan depósitos de ATTR (49).
- El 13% de los pacientes mayores de 60 años con insuficiencia cardiaca con FEVI preservada y con hipertrofia ventricular izquierda, tienen amiloidosis ATTRwt (44).

En cuanto a la presentación clínica, esta enfermedad tiene una progresión más lenta y mayor supervivencia que el tipo hereditario o la amiloidosis primaria. Los pacientes padecen una enfermedad más indolente, con mínima polineuropatía e insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada. La media de supervivencia desde el inicio de los síntomas es de unos 6 años, cifra que disminuye a menos de 3 años, si contamos desde la fecha del diagnóstico (41,50).

Principalmente, se manifiestan síntomas a nivel cardíaco, siendo las manifestaciones más frecuentes la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada, seguida de arritmias y defectos de la conducción cardíaca (51,52). Como signo inicial, muchos de los pacientes presentan síndrome del túnel del carpo, habitualmente bilateral. Este síndrome aparece entre 10 y 15 años antes que los síntomas cardíacos y se estima que en el 34% de los pacientes con síndrome de túnel del carpo idiopático, hay depósitos de ATTRwt (42,53).

Debe tenerse presente este diagnóstico en cualquier paciente con insuficiencia cardíaca con FEVI preservada junto a hipertrofia ventricular, especialmente en pacientes sin historia de HTA o valvulopatías significativas (52,54,55).

Ante un paciente con sospecha de amiloidosis cardíaca, el diagnóstico diferencial deberá hacerse entre amiloidosis AL y amiloidosis por ATTR hereditaria, ya que estas entidades son los principales tipos de amiloidosis con afectación cardíaca (43).

### **1.2.3.2. Amiloidosis hereditaria por transtiretina**

La amiloidosis hereditaria ATTR es una enfermedad rara descrita por primera vez en 1952 por Andrade en Portugal, por lo que esta enfermedad recibe también el nombre de Enfermedad de Andrade (56). Este neurólogo describió un grupo de pacientes con polineuropatía amiloidótica familiar (TTR-FAP) portadores de la mutación p.Val50Met. En las siguientes décadas se describieron otros focos en Japón y en Suecia. Lo que en principio parecía una enfermedad endémica, gracias a los avances en las técnicas de diagnóstico ahora se diagnostica por todo el mundo (13,57).

La enfermedad se produce por mutaciones en el gen de la transtiretina, localizado en el cromosoma 18 (18q12.1). Este gen se divide en 4 exones y a pesar de ser de pequeño tamaño, se han descrito más de 130 variantes alélicas, de las cuales la mayoría son amiloidogénicas. Tan solo 15 de estas variantes no están asociadas a enfermedad (58).

La amiloidosis ATTRm se divide fundamentalmente en dos grandes grupos, dependiendo de la clínica. Se clasifica como polineuropatía amiloidótica familiar (FAP o enfermedad de Andrade) o como cardiomiopatía amiloidótica familiar (FAC) (41,59) Esta clasificación no es del todo correcta, ya que muchos casos son formas mixtas o llegan a afectar también a otros órganos como se expondrá más adelante (60).

La mutación p.Val50Met es la mayor representante de FAP, es la variante mejor estudiada y casi la única encontrada en las zonas denominadas endémicas. La prevalencia de esta variante es variable según la zona geográfica, en zonas endémicas como Portugal es de 1/538 individuos; en Japón, Brasil o Suecia la prevalencia va desde 1/1000 a 1/10000 habitantes. En EEUU la prevalencia es de 1/100.000 individuos y en Europa es menor a 1/100.000 habitantes (33,61,62).

Centrándonos en España, se han observado focos de pacientes en Mallorca donde la prevalencia es de 5 por cada 100.000 habitantes y en Valverde del Camino (Huelva) aunque en esta zona no se dispone de datos de prevalencia (63).

Por otro lado, la mutación mayoritaria en la amiloidosis cardiaca ATTRm es la p.Val142Ile. Esta mutación es mucho más frecuente que ninguna otra, observándose sobre todo en pacientes con ascendencia africana. Entre el 3-4% de la población africana/afroamericana es portadora de p.Val142Ile, mientras que en población caucásica o latina la frecuencia es inferior al 0.5% (33).

La edad de inicio de presentación de los síntomas varía entre la segunda y la novena década de la vida y entre una generación y otra, se observa el fenómeno de anticipación genética, lo cual quiere decir que los síntomas se desarrollan a edades más tempranas en cada generación (28).

Existe una gran heterogeneidad en los datos de penetrancia dependiendo tanto del genotipo como del área geográfica estudiada (61,65,66). Así por ejemplo, según recoge el estudio realizado por Hellman et al. (67) la penetrancia de la enfermedad en portadores de p.Val50Met es diferente en distintas áreas, aumentando el riesgo de padecer la enfermedad con la edad. (Tabla 3).

Riesgo acumulado de presentar la enfermedad / Penetrancia	Portugal	Francia	Suecia
50 años	80 %	14 %	11 %
70 años	91%	50 %	36%

Tabla 3. Variación de la penetrancia en distintas regiones y edades.

Otro punto que parece influir en la penetrancia de la enfermedad es el género del progenitor transmisor de la mutación. Un estudio realizado por Bonaïti et al. (64) apoya la idea de que la penetrancia es más alta cuando es la madre la que transmite la mutación. Según este estudio, la presencia de algún polimorfismo en el ADN mitocondrial podría ser un mecanismo subyacente de la variación fenotípica. Es decir, en caso de que la enfermedad se transmita por vía materna, la penetrancia sería mayor.

Generalmente la enfermedad evoluciona hacia la muerte entre 5 y 15 años en los fenotipos predominantemente neurológicos tras la aparición de los síntomas y entre 2.5 y 4 años en los cardíacos, aunque existe una gran heterogeneidad dependiendo de varios factores como la región endémica, mutación o edad de aparición de los síntomas. Los pacientes frecuentemente fallecen por fallo cardíaco, infecciones o caquexia (61,68).

Desde un punto de vista clínico, la amiloidosis hereditaria ATTR se clasifica de la siguiente manera:

- A. Polineuropatía amiloidótica familiar (FAP o enfermedad de Andrade)
- B. Cardiomiopatía amiloidótica familiar (FAC)
- C. Amiloidosis leptomeníngea familiar.
- D. Amiloidosis oculoleptomeníngea.

### 1.2.4.1. Polineuropatía amiloidótica familiar.

Las manifestaciones más comunes son neuropatía periférica sensorial y motora rápidamente progresiva. En las primeras etapas de la enfermedad se produce una mayor afectación de fibras nerviosas pequeñas, tanto mielínicas como amielínicas, observándose afectación en las extremidades inferiores, empezando por los pies y progresivamente afectando a la pierna. Se produce una reducción progresiva de la sensación de dolor y temperatura. Cuando las fibras más grandes se involucran en etapas posteriores de la enfermedad, los pacientes presentan dificultad en la marcha, pérdida de equilibrio, marcha en estepaje o dolor neuropático con sensación de quemazón, más intenso por la noche. La neuropatía se extiende a extremidades superiores afectando a antebrazos, manos y dedos. En este punto pueden desarrollar caquexia.(33,69) La gravedad de la neuropatía periférica se puede clasificar en tres estadios según la escala de Coutinho et al. o la escala de Yamamoto et al. (70).(Tabla 4)

	Coutinho et al. (1980)	Duración		Yamamoto et al. (2007)
<b>Estadio I</b>	La enfermedad se limita a las extremidades inferiores. Se puede caminar sin ayuda. Debilidad leve en los extensores largos de dedos.	5,6 ±2,8 años	<b>DPN I</b>	Alteraciones sensitivas en las extremidades. Capacidad de caminar preservada
<b>Estadio II</b>	Progresión de los signos motores en las extremidades inferiores con marcha equina o estepaje y miotrofias distales: comienza la atrofia y debilidad de los músculos de las manos. Paciente claramente discapacitado, puede moverse, aunque con ayuda.	4,8 ±3,6 años	<b>DPN II</b>	Dificultades para caminar, pero son necesidad de bastón
			<b>DPN IIIa</b>	Necesidad de un bastón/muleta para caminar.
			<b>DPN IIIb</b>	Necesidad de dos bastones/muletas.
<b>Estadio III</b>	El paciente está en la cama o silla de ruedas; debilidad y arreflexia generalizadas	2,3 ±3,1 años	<b>DPN IV</b>	Paciente en silla de ruedas o en cama

Tabla 4. Escala de Coutinho et al. y escala de Yamamoto et al. DPN: puntuación modificada de discapacidad por polineuropatía

El síndrome de túnel del carpo puede ser el primer síntoma en estos pacientes, pero al ser tan inespecífico los pacientes no son diagnosticados correctamente (69).

El sistema nervioso autónomo también puede afectarse. Está también involucrado el sistema cardiovascular observándose hipotensión ortostática, astenia y mareos, sistema gastrointestinal, apareciendo náuseas y vómitos, diarrea o estreñimiento y pérdida de peso y el sistema genitourinario con impotencia sexual masculina y disfunción urinaria.

Las complicaciones adicionales incluyen afectación ocular, que resulta en una alteración de la visión debido a depósitos vítreos de proteína, disfunción pupilar y lagrimal, así como glaucoma (66,69).

La mutación polineuropáticas más estudiada por su frecuencia es pVal50Met. Dentro de este grupo se observan dos tipos de pacientes denominados: “early onset o inicio temprano” y “late onset o inicio tardío” (tabla 5). Esta distinción se basa en la edad de aparición de los síntomas y se observan diferencias entre ambos grupos. Aproximadamente la mitad de los pacientes con mutación pVal50Met, presentarán también problemas cardíacos, sobre todo en aquellos pacientes denominados “late-onset” en los que los síntomas aparecen a partir de los 50 años (71).

	<b>EARLY ONSET/ INICIO PRECOZ</b>	<b>LATE ONSET / INICIO TARDÍO</b>
<b>Edad inicio</b>	Menores de 50 años (media 33 años)	Mayores de 50 años (media 56 años)
<b>Antecedentes familiares</b>	90 % presentan historia familiar	Más del 50% sin historia familiar
<b>Evolución</b>	Curso rápido	Curso insidioso
<b>Pérdida de peso</b>	Frecuente	Infrecuente
<b>Polineuropatía</b>	Polineuropatía mixta	Polineuropatía sensitiva
<b>Disautonomía</b>	Marcado componente disautonómico	Escaso componente disautonómico
<b>Afectación cardíaca</b>	Afectación cardíaca tardía	Frecuente afectación cardíaca Túnel del carpo
<b>Localización geográfica</b>	Portugal, Japón, Brasil, España	Suecia, Francia, Italia

Tabla 5. Diferencias entre los dos tipos de presentación de la amiloidosis ATTRm p.Val50Met (71).

#### 1.2.4.2. Amiloidosis cardíaca familiar.

La amiloidosis cardíaca es una cardiomiopatía infiltrativa con fenotipo hipertrófico y patrón restrictivo, que causa engrosamiento de las paredes ventriculares generando una alteración diastólica severa (69). La afectación cardíaca se observa en el 80% de los casos de FAP a lo largo de la evolución clínica.

Los signos iniciales de amiloidosis cardíaca pueden ser sutiles y los pacientes suelen notar síntomas de astenia y debilidad. A medida que avanza la enfermedad, el depósito de amiloide da como resultado una disfunción cardíaca mecánica progresiva y la tríada clásica de síntomas de insuficiencia cardíaca (astenia, disnea y edema) se hace evidente (72,73).

El depósito de proteína puede dar lugar a un engrosamiento del tabique interventricular sin dilatación y, posteriormente, a un aumento de la presión auricular, lo que da como resultado dilatación auricular y engrosamiento de la pared auricular. Finalmente se produce una disfunción sistólica del ventrículo izquierdo y hay un deterioro hemodinámico y funcional (72,73).

La presentación común es un paciente con síntomas clásicos de insuficiencia cardiaca, que incluyen disnea, ortopnea, disnea paroxística nocturna y edema de extremidades inferiores, con FEVI preservada. Pueden darse casos de angor y cardiopatía isquémica, secundarios al depósito de amiloide en arterias coronarias pequeñas (72).

La amiloidosis ATTRm cardiaca es prácticamente indistinguible clínicamente de la variante senil; al igual que se ha comentado en el caso de amiloidosis wild type, el antecedente de túnel carpiano es un hallazgo frecuente y puede ser una pista para el diagnóstico.(74) La única manera actualmente de distinguir estas dos enfermedades es realizando el estudio genético del gen *TTR* (75).

La miocardiopatía parece ser más común en pacientes que no presentan la mutación p.Val50Met y con un inicio tardío de la enfermedad. La mutación más representativa de este fenotipo es p.Val142Ile, cuya frecuencia entre población africana/afroamericana es de casi el 4% (46,76,77). Produce casi exclusivamente afectación cardiaca de inicio tardío y en el momento en el que se manifiesta la clínica, la supervivencia es de algo más de 2 años (76).

#### **1.2.4.3. Amiloidosis leptomeníngea y oculoleptomeníngea**

Como se ha comentado anteriormente, la transtiretina se sintetiza mayoritariamente en hígado, pero también en pequeñas cantidades en el plexo coroideo del sistema nervioso central y en el epitelio pigmentario de la retina, pudiéndose depositar a nivel meníngeo, en médula espinal y a nivel ocular. Si esto ocurre, los pacientes pueden presentar episodios de epilepsia, ataxia, dolor de cabeza, convulsiones o incluso hemorragia subaracnoidea. También pueden presentar episodios neurológicos focales, pérdida visual y auditiva (66,78,79).

La mayoría de los casos van acompañados de polineuropatía, el 9% de las mutaciones descritas como productoras de FAP se desarrollan además a nivel leptomeníngeo. No obstante, hay alguna mutación como es el caso de p.Leu32Pro, p.Asp38GGly y p.Ala45Thy, en los que se produce solo afectación central (78,80).

El depósito es tiempo dependiente, apareciendo síntomas leptomeníngeos y oculares en pacientes con una larga duración de la enfermedad. A medida que la esperanza de vida de los pacientes con FAP ha ido aumentando (gracias a las distintas opciones de tratamiento), estas manifestaciones han ido en aumento también. Se observa sobretodo en pacientes después de ser trasplantados, lo que hace pensar que el depósito de ATTR es dependiente solo de la producción local de la proteína ya que estos pacientes tienen niveles mínimos de ATTR mutada en sangre, pero todavía no está claro si la TTRwt circulante en sangre tiene alguna implicación o no (81).

#### 1.2.4.4.Fenotipos mixtos

Esta clasificación clínica descrita anteriormente, no responde a la mayoría de las mutaciones descritas, más del 50 % de las variantes producen síntomas mixtos neurológicos y cardiacos (60). En la figura 4 se representan algunas de las variantes productoras de amiloidosis ATTRm, vemos el abanico de fenotipos que pueden observarse, siendo en la mayoría de los casos fenotipos mixtos. En uno de los extremos se sitúa p.Val50Met como variante neurológica (en pacientes de inicio temprano) y en el extremo de manifestaciones exclusivamente cardiacas p.Val142Ile o p.Ile88Leu; el resto de variantes presentan manifestaciones clínicas mixtas.

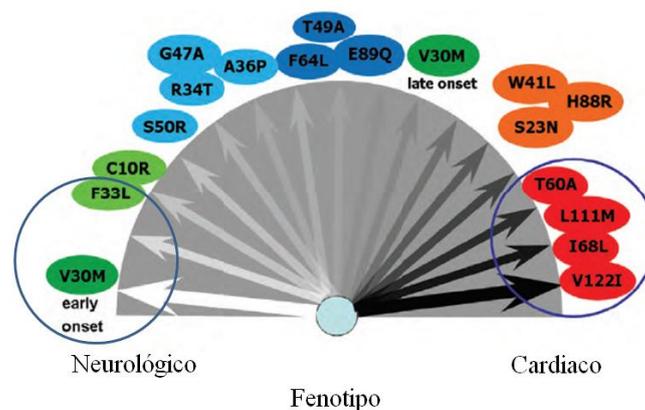


Figura 4. Fenotipos de las principales mutaciones Adaptado de Rapezzi et al. (60).

La gran heterogeneidad que puede aparecer en cuanto a la clínica dificulta el correcto diagnóstico de estos pacientes. En la figura 5 se resumen todas las manifestaciones que pueden observarse, desde las afectaciones neurológicas y cardiacas hasta otras como oculares, gastrointestinales o renales (66).

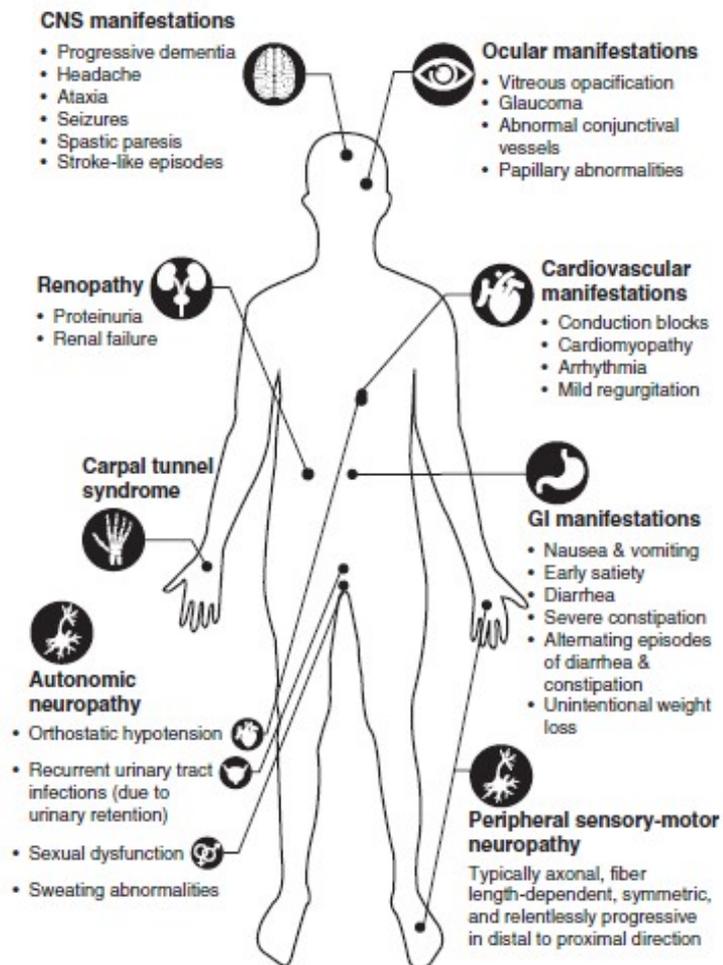


Figura 5 .Manifestaciones de la amiloidosis ATTR. Adaptado de Conceição et al.(66)

### 1.2.5 DIAGNÓSTICO

Puesto que se trata de una enfermedad rara, lo fundamental es mantener un alto índice de sospecha, que nos lleve a realizar el estudio diagnóstico de esta enfermedad.

El diagnóstico resulta aún más complicado en aquellos casos esporádicos sin historia familiar. Habrá que sospechar amiloidosis ATTR en casos de polineuropatía de origen no filiado, con afectación de las sensaciones algésica y térmica predominantemente, disfunción autonómica y síndrome de túnel del carpo así como en los casos de insuficiencia cardíaca con FEVI preservada, particularmente si asocian hipertrofia ventricular en ausencia de valvulopatías relevantes (33).

#### 1.2.5.1 Polineuropatía.

Pacientes con amiloidosis ATTR con síntomas predominantemente neuropáticos, pueden ser diagnosticados erróneamente de polineuropatía axonal idiopática, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica o estenosis espinal lumbar. La diabetes o el alcoholismo crónico pueden producir polineuropatías similares (68). Las pruebas que pueden ayudarnos en el diagnóstico de la polineuropatía son:

- **Electromiografía/Electroneurografía.** En fases iniciales, al estar afectadas fibras de pequeño tamaño, los estudios electrofisiológicos convencionales pueden resultar normales, ya que estos solo tienen capacidad de valorar fibras mielínicas de grueso calibre de conducción rápida. Por lo que deben considerarse pruebas específicas para la evaluación de las fibras mielínicas de pequeño calibre y amielínicas (70).

#### 1.2.5.2 Cardiopatía

En el caso de amiloidosis ATTR cardíaca, diversas comorbilidades comunes como hipertrofia ventricular izquierda por valvulopatía o hipertensión arterial mal controlada, pueden enmascarar la enfermedad (33,82).

Las pruebas diagnósticas cardiacas son:

- **Electrocardiograma.** Suelen observarse bajos voltajes del complejo QRS, retraso en la conducción intraventricular, bloqueos auriculoventriculares y arritmias, sobre todo auriculares. Ninguna de estas alteraciones tiene la suficiente especificidad para ser diagnósticas (83,84).
- **Ecocardiograma.** El patrón típico es el de disfunción diastólica con un patrón morfológico moteado granular (“sparkling”), además puede aparecer un aumento del grosor ventricular izquierdo y engrosamiento del septo interventricular (85).
- **Resonancia magnética.** Permite detectar la presencia de hipertrofia, visualizar el infiltrado amiloide e incluso medir la carga de amiloide en el tejido cardiaco (82,86). En amiloidosis avanzada, muestra un patrón caracterizado por realce tardío de gadolinio subendocárdico global y difuso. Como principal inconveniente cabe señalar la todavía escasa experiencia y la menor disponibilidad de la técnica en algunos centros.
- **Gammagrafía.** Se han usado varios radiotrazadores óseos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  siendo el más utilizado  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD (ácido  $^{99m}\text{Tc}$ -3,3-difosfono-1,2-propanodix-carboxílico), con un alto rendimiento diagnóstico. Según Gillmore et al., la gammagrafía con  $^{99m}\text{Tc}$ -DPD tiene un 99% de sensibilidad y 86 % de especificidad pudiendo llegar al 100% si se tiene en cuenta el grado de captación y la ausencia de proteína monoclonal en suero u orina (54,75,87).
- **Tomografía por emisión de positrones (PET).** estudios recientes demuestran la utilidad del PET con Florbetapir para la detección de depósitos amiloides en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer; la utilidad de esta técnica en amiloidosis por TTR está siendo estudiada en la actualidad (74).
- **Biomarcadores.** La determinación de troponina y propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) pueden utilizarse como marcadores de daño cardiaco. Son considerados indicadores independientes de supervivencia (88,89).

### 1.2.5.3 Pruebas confirmatorias

Tras la realización de las pruebas anteriores, ante cualquier caso sospechoso de amiloidosis ATTR, deben realizarse pruebas confirmatorias.

- **Biopsia.** La biopsia del órgano afectado sigue siendo la prueba gold estándar para el diagnóstico de amiloidosis. Este proceso invasivo conlleva diferentes riesgos en función del órgano biopsiado y algunos pacientes requieren múltiples biopsias hasta llegar al diagnóstico; además un resultado negativo no excluye el diagnóstico de amiloidosis ATTR (41). Para minimizar los riesgos es común obtener la biopsia de sitios alternativos como aspirado de grasa abdominal, mucosa rectal o tejido tenosinovial obtenido durante la cirugía de túnel del carpo (90).

Los depósitos amiloides se caracterizan por ser rojo Congo positivo y tener birrefringencia verde bajo luz polarizada. La sensibilidad de esta prueba varía según la experiencia de cada centro y de la técnica utilizada. Para poder tipar la proteína presente en el tejido, pueden realizarse técnicas de inmunohistoquímica, pero la especificidad de estos métodos no es lo suficientemente buena. Las técnicas basadas en espectrometría de masas poseen una alta sensibilidad y especificidad y se consideran el método de referencia para el tipado de amiloide, pero solo está disponible en centros de referencia o a nivel experimental (91–94).

- **Estudio genético.** El estudio genético consiste en la secuenciación de las regiones exónicas e intrónicas colindantes del gen *TTR* mediante secuenciación Sanger. La secuenciación es imprescindible en el diagnóstico, para poder clasificar la enfermedad correctamente. Es la única prueba que nos permite distinguir entre amiloidosis hereditaria y adquirida (94) y actualmente es la única manera de saber en concreto que variante es la causante de la enfermedad, importante para predecir la evolución clínica del paciente. La identificación de una mutación causal permite realizar consejo genético a los familiares e identificar a todos los portadores asintomáticos. Así se puede hacer un buen seguimiento a los portadores pudiendo detectar los primeros síntomas de la enfermedad cuando aparezcan e iniciar terapias que prevengan la evolución clínica (62).

### 1.2.5.4 Otras pruebas

- **Algoritmos diagnósticos.**

En los últimos años se han desarrollado algoritmos para poder llegar al diagnóstico sin tener que realizar la biopsia como por ejemplo el propuesto por Gillmore et al., publicado en *Circulation* en 2016 (75), (figura 6). Como primer paso se debe realizar una gammagrafía con marcadores óseos. Según el grado de captación del marcador junto con la existencia o no de proteína monoclonal en suero u orina o de cadenas ligeras, permite llegar al diagnóstico sin biopsias de amiloidosis cardíaca por ATTR, y a partir de ahí es necesario el estudio genético para diferenciar ATTRwt de ATTRm.

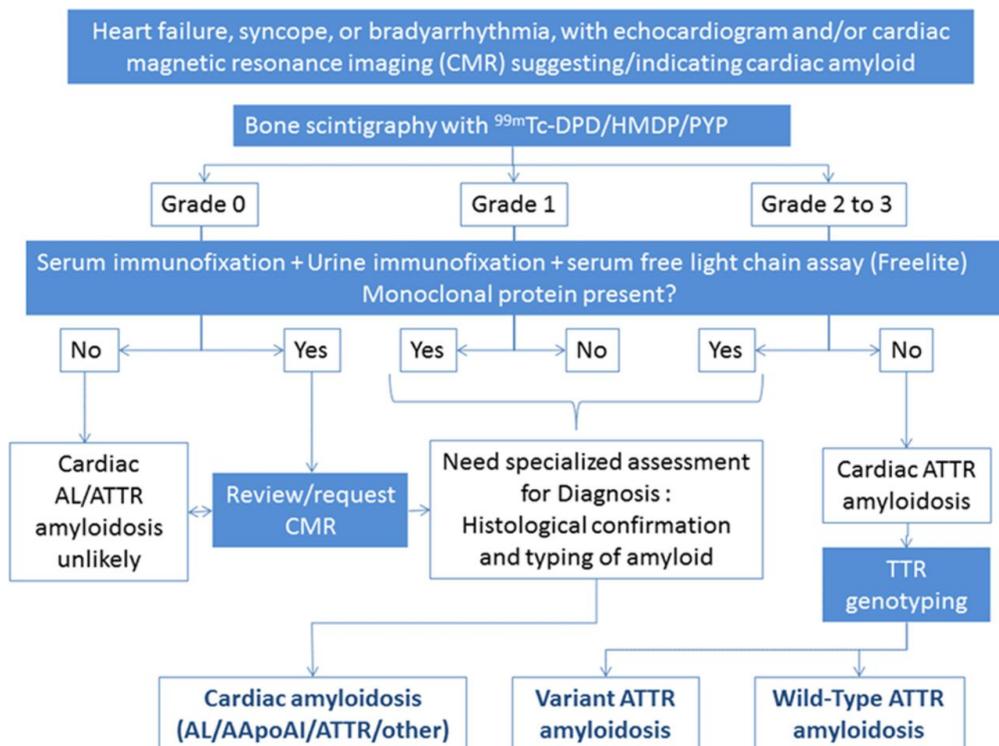


Figura 6. Algoritmo diagnóstico de amiloidosis ATTR. Gilmore et al. (75)

- **Detección en suero de la variante de TTR.**

Todos los pacientes afectados de amiloidosis familiar ATTR presentan TTR mutada en suero, por lo que esta prueba también es útil en el diagnóstico. La mayoría de los pacientes son heterocigotos, lo cual quiere decir que en sangre, tendrán dos formas de proteína, una normal o wild type y otra mutada. Ambas formas pueden detectarse y diferenciarse por técnicas de espectrometría de masas debido a que la sustitución de un aminoácido por otro se traduce en un cambio en el peso molecular de la proteína.

Sin embargo, en algunos casos, con el cambio de aminoácido no se produce un cambio en el peso molecular suficiente como para ser detectado por espectrometría de masas (aproximadamente 15 Da), en estos casos se deberá optar por otras técnicas de detección como por ejemplo isoelectroenfoque, que permite separar las distintas variantes de TTR según su punto isoelectrónico (95).

### 1.2.6 TRATAMIENTO

Es especialmente importante el manejo integral y adecuado de la amiloidosis ATTR. Actualmente, las opciones terapéuticas para esta afectación son:

El tratamiento sintomático de las distintas manifestaciones como la insuficiencia cardíaca que muchos de los pacientes presentan, es especialmente importante. El uso de diuréticos suele ser necesario pero el manejo debe ser muy cuidadoso ya que su exceso aumentará los estados de hipotensión. Fármacos como beta bloqueantes o digoxina están contraindicados, dada la toxicidad que presentan al unirse a las fibras de amiloide. El uso de IECAS o de antagonistas de los receptores de la angiotensina II, no mejoran la IC del paciente, pudiendo incluso producir empeoramiento clínico (94).

En cuanto al tratamiento específico de la amiloidosis ATTR (figura 7), actualmente hay pocas opciones aprobadas pero son muchos los estudios que se están llevando a cabo tanto para la forma senil como para la hereditaria.

- **TOH (Trasplante ortotópico de hígado).** El trasplante hepático fue el primer tratamiento para la amiloidosis ATTRm pero con el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos, ha ido disminuyendo. Debido a que la mayoría de la TTR es sintetizada en el hígado, con el trasplante se elimina la producción de TTR mutada y el paciente solo sintetizará TTRwt. Se han descrito varios factores pronóstico como son el tipo de mutación (mayor supervivencia para la mutación p.Val50Met que para los no-p.Val50Met), la edad, la duración de la enfermedad y el estado nutricional (68).

Tras el trasplante se observa una disminución de la progresión de los síntomas neurológicos, pero no ocurre lo mismo con los síntomas cardiacos que pueden progresar, especialmente en los portadores no p.Val50Met (96,97).

- **Fármacos estabilizadores de TTR**

- **Tafamidis.** El mecanismo de acción de este fármaco se basa en la capacidad de unirse con gran afinidad y selectivamente, a la molécula de TTR en el mismo punto de unión de la tiroxina; así estabiliza cinéticamente el tetrámero, disminuyendo la velocidad de disociación en monómeros.

Tafamidis, ha sido autorizado por la Agencia del Medicamento en España en el año 2011 para el tratamiento de la amiloidosis por transtiretina en pacientes con polineuropatía en estadio 1 para retrasar la alteración neurológica periférica (98). A pesar de estar sólo aprobado para la PAF en estadios iniciales, estudios posteriores han demostrado que esta molécula también estabiliza el tetrámero en variantes con manifestaciones cardiacas o en el caso de la proteína wild type (65,99,100).

- **Diflunisal.** Antiinflamatorio no esteroideo capaz de estabilizar la molécula de TTR, pero su uso no está aprobado en España. Los efectos secundarios observados, como daño renal, trombocitopenia o problemas gastrointestinales hacen que su uso sea controvertido, en especial en pacientes con enfermedad cardiaca (40,57).

- Otros fármacos estudiados por la capacidad de estabilización del tetrámero son resveratrol, curcumina o tolcapona.
- **Terapias emergentes**
  - **Silenciamiento génico.** Fármacos que inhiben la producción de TTR al unirse al RNA mensajero e impedir su traducción. Actualmente se están evaluando dos tipos de terapias, por un lado oligonucleótidos antisentido (OAS) como Inotersen y por otro ARN de interferencia (siRNA) como Patisiran, se incluyen pacientes con amiloidosis ATTR<sub>m</sub> y en el caso de OAS también con amiloidosis ATTR<sub>wt</sub> (101–104).
  - **Modificadores de la agregación.** Ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) y el antibiótico doxiciclina; interfieren en etapas tardías de la formación del amiloide, actuando sobre los oligómeros tóxicos que preceden a la formación de fibras y fibrillas amiloides insolubles respectivamente (40,94). Actualmente se estudia para pacientes con amiloidosis senil y hereditaria.
  - **Inmunoterapia.** Anticuerpos capaces de unirse a residuos de la proteína e inhibir la formación de fibras, además inducen un proceso fagocítico por parte de los macrófagos (40,101). También está en estudio el uso de anticuerpos dirigidos contra el componente P amiloide presente en todos los depósitos amiloides.

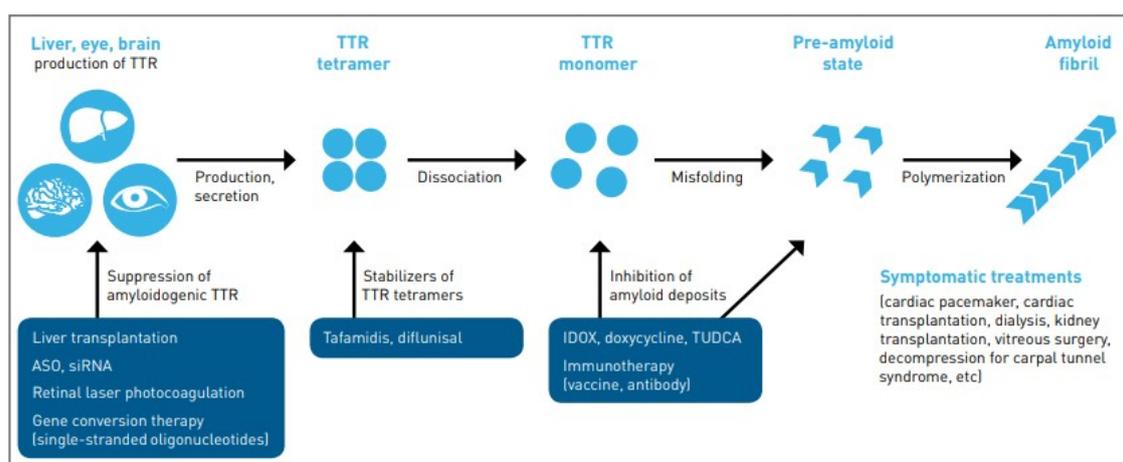


Figura 7. Resumen de los tratamientos disponibles y en investigación para la amiloidosis ATTR. Gertz et al. (105)

### 1.2.7 COMPARATIVA AMILOIDOSIS ATTR WILD TYPE - HEREDITARIA

Aunque no son muchas, hay alguna diferencia entre las manifestaciones clínicas de pacientes con ATTRwt y con ATTR hereditaria cardiaca (94) como puede observarse en la tabla 6.

	ATTRwt	ATTRm
<b>Prevalencia</b>	Desconocida, se estima que muy frecuente	<1:100000
<b>Estudio genético</b>	Negativo	Positivo
<b>Sexo</b>	Predominio masculino (80%)	Predominio masculino
<b>Manifestaciones extracardiacas</b>	Síndrome túnel del carpo Estenosis canal lumbar Rotura del tendón bíceps braquial	Polineuropatía sensitivo-motora bilateral ascendente Disautonomía, hipotensión ortostática, diarrea-estreñimiento, disfunción eréctil Afectación ocular
<b>Afectación cardiaca</b>	Constante	Variable según la mutación
<b>Presentación cardiaca</b>	Insuficiencia cardiaca (53-86%) Trastornos de la conducción Fibrilación auricular (43-67%) Estenosis aórtica degenerativa	Insuficiencia cardiaca Trastornos de la conducción Fibrilación auricular poco frecuente
<b>Gammagrafía <sup>99m</sup>TC-DPD</b>	Grado 2-3	Grado 0: portador asintomático Grado 1: afectación cardiaca inicial Grado 2-3: afectación cardiaca significativa

Tabla 6. Diferencias entre amiloidosis ATTRwt y ATTRm

## 1.2.8 SITUACIÓN ACTUAL, INFRADIAGNÓSTICO DE LA AMILOIDOSIS ATTR

### Estudio de la prevalencia.

Uno de los hechos que más puede llamar la atención acerca de esta enfermedad, es el de que probablemente estemos ante una enfermedad infradiagnosticada, tanto la forma senil como la hereditaria (40). En el caso de la amiloidosis ATTRm, algunos estudios actuales indican este infradiagnóstico concluyendo que la cifra de prevalencia global es mayor que la descrita hasta el momento. (40,106)

En el caso de la polineuropatía amiloidótica familiar los datos de los que se disponía hasta el momento estimaban una prevalencia global de 5.000 a 10.000 casos de enfermedad en todo el mundo, mientras que datos recientes concluyen que podría ser sensiblemente mayor, de hasta 40.000 (106).

En cuanto al fenotipo cardíaco ATTRm en el que predomina la variante p.Val142Ile especialmente en la población africana, donde la cifra de prevalencia está entre el 3-4% de la población (77). A pesar de que la penetrancia de esta variante es desconocida, la alta frecuencia alélica en este grupo de población sugiere que esta condición puede representar un problema médico significativo.

Diversos estudios se han llevado a cabo para ver la prevalencia de mutación en pacientes con clínica cardíaca. En el estudio realizado por Damy et al. (107), se ha comprobado que el 5% de los pacientes con cardiomiopatía hipertrófica presentan amiloidosis ATTRm. Con este dato proponen que el screening genético debería estar incluido en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica, especialmente en pacientes mayores de 60 años.

Actualmente se dispone de pocos estudios poblacionales en los que se calcule la prevalencia de portadores de mutación en el gen *TTR*, los que hay se han realizado tan solo para la variante p.Val142Ile o en grupos de pacientes con cardiopatía. No disponemos de datos por ejemplo de la variante p.Val50Met a pesar de ser la mutación más estudiada.

En los últimos años, la disponibilidad de tecnologías de secuenciación de ADN de una manera más generalizada, ha permitido la secuenciación de genomas y exomas de miles de personas. La agrupación de todos los datos recogidos en estos estudios, se ha convertido en una gran herramienta que nos puede ayudar a estudiar las enfermedades genéticas, como es el caso de amiloidosis ATTRm. Hay grandes estudios internacionales de secuenciación masiva, como son por ejemplo 1000 Genomes Project, NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Exome Aggregation Consortium (ExAC) o Genome Aggregation Database (gnomAD) que pueden servirnos para estudiar frecuencias de variaciones génicas.

El proyecto “1000 Genomes” fue pionero en emplear la secuenciación masiva de miles de genomas mediante tecnología Next Generation Sequencing (NGS). Desde su inicio en 2007, este proyecto ha logrado determinar la localización y las frecuencias alélicas de más de 15 millones de Single Nucleotide Variants (SNVs), un millón de inserciones y deleciones y 20.000 variantes estructurales, la mayoría de ellas no descritas previamente (108,109).

En “The NHLBI Exome Sequencing Project” (ESP) iniciado en 2009 se secuenciaron unos 6500 exomas de distintas poblaciones siendo la mayoritaria la población Europea (110).

Posteriormente la plataforma ExAC en 2016 recoge los exomas de unas 60.000 personas supuestamente sanas (no se incluyen entre sus datos pacientes con trastornos pediátricos severos) y de diversas poblaciones. Están disponibles más de 7 millones de variantes génicas (111).

Por último, The Genome Aggregation Database (gnomAD), es una actualización del proyecto ExAC; agrupa actualmente 123.136 exomas y 15.496 genomas de individuos, reúne los mismos requisitos de inclusión de personas que ExAC pero ampliando los casos de poblaciones poco representadas en esta base como por ejemplo la asiática, latina o africana (111,112).

Debido al gran número de datos disponibles en estos grandes estudios poblacionales, puede estudiarse la prevalencia de variantes génicas implicadas en diversas enfermedades. Son de especial interés para el estudio de enfermedades muy poco frecuentes, ya que permite estimar, por primera vez, la frecuencia de variantes raras en la población. Sin embargo, estos datos deben interpretarse con cautela sin asimilar prevalencia de mutación a prevalencia de enfermedad.

### **Estudio de técnicas de screening**

La amiloidosis senil (ATTRwt), hasta hace poco una enfermedad residual, está emergiendo como una de las causas más frecuentes de insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada (HFpEF) como indica un estudio de García-Pavía. (44) En dicho estudio se incluye a un grupo de pacientes mayores de 60 años, con HFpEF e hipertrofia ventricular izquierda, el 13% de los pacientes fueron diagnosticados de amiloidosis ATTRwt. Esto se traduce en un gran número de pacientes de manera global, ya que debemos tener en cuenta que la mitad de los casos de insuficiencia cardiaca son HFpEF (44,113).

Es muy importante que el diagnóstico se realice lo antes posible para poder iniciar el tratamiento de forma precoz, sin embargo el retraso en el diagnóstico es algo frecuente debido a la heterogeneidad de los fenotipos, a que los signos y síntomas que aparecen en esta enfermedad son muy comunes en otras patologías frecuentes o a la falta de historia familiar (68,102).

Recientemente, en Italia, se ha realizado un estudio en el cual el diagnóstico inicial de la enfermedad fue erróneo en el 32 % de los pacientes y el tiempo transcurrido entre la aparición de los primeros síntomas y el diagnóstico fue de 46 meses (114,115).

Por el infradiagnóstico de la amiloidosis familiar, pero sobre todo por el número de pacientes que se ha estimado de amiloidosis ATTRwt, el número potencial de pacientes a los cuales se les deberá realizar el estudio genético se prevé que pueda ser altísimo, ya que una vez que un paciente sea diagnosticado de amiloidosis ATTR el

diagnóstico diferencial entre la variante senil y la hereditaria debe realizarse sistemáticamente (75).

El estudio genético, como se ha comentado en el apartado de diagnóstico, es una herramienta imprescindible para la diferenciación entre amiloidosis ATTRwt y ATTRm. Este estudio actualmente se realiza mediante secuenciación Sanger de los exones 2, 3 y 4 del gen *TTR* ya que el exón uno codifica para el péptido líder y para los primeros tres residuos de la proteína madura en los que no se han descrito mutaciones (16,116).

Distintas técnicas genéticas han sido desarrolladas para la realización de screening en el estudio de mutaciones, sin necesidad de realizar la secuenciación completa, como por ejemplo la SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism) o DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography), pero para poder estudiar a un número importante de personas, debemos utilizar técnicas simples, rápidas y económicas, para lo cual High Resolution Melting Analysis (HRMA) sería una buena alternativa (117). El HRMA es una técnica con alta sensibilidad y especificidad, capaz de detectar mutaciones puntuales en el exón estudiado. Esta técnica, descrita por Wittwer en 2003, consiste en la realización de una PCR a tiempo real y posterior análisis de la curva de melting utilizando un marcador fluorescente específico de ADN de doble hebra (118).

El fundamento de HRMA se basa en clasificar las muestras de ADN acorde a su comportamiento de disociación durante la transición de ADN de doble cadena a ADN de cadena simple al aumentar la temperatura. La temperatura a la que el 50% de todas las moléculas de ADN se encuentra en forma monocatenaria se denomina temperatura de melting ( $T_m$ ). Cualquier variación en la secuencia de bases podrá ser así detectada al producir un comportamiento de desnaturalización diferente (119,120).

El comportamiento de desnaturalización térmica del ADN depende de la composición de bases; tanto del contenido en guaninas y citosinas, de la distribución de los nucleótidos y de la longitud del fragmento estudiado. Para un correcto rendimiento de la técnica, la longitud óptima de los fragmentos estudiados se ha fijado en 300 pares de bases o menores, siendo la sensibilidad en estos casos casi del 100%; sin embargo para fragmentos de entre 400-1000 pares de bases, la sensibilidad disminuye al 95% (117,121).

La flexibilidad de la técnica ha hecho que el uso de HRMA haya ido en aumento en los últimos años como técnica de screening en muchas disciplinas, como el estudio de los genes BRCA1 y BRCA2, en cáncer de mama y ovario, del gen JAK2 en neoplasias mieloproliferativas o de mutaciones en BRAF en cáncer colorectal. También ha demostrado su utilidad en el estudio epigenético de metilaciones en el área de la oncología o en el campo de las enfermedades minoritarias como la enfermedad de Fabry o el síndrome de Duchenne (122–126).



## **2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1 HIPÓTESIS

El acumulo de depósitos amiloides compuestos por transtiretina, se asocia a dos tipos de amiloidosis, la variante senil o “Wild Type ATTR” (ATTRwt) y la variante hereditaria (ATTRm). Un correcto diagnóstico y clasificación, diferenciando ambas formas es de gran importancia tanto para el tratamiento del paciente como para los familiares, que podrían ser portadores de una mutación.

En los últimos años han aparecido publicaciones que revelan que ambas entidades están infradiagnosticadas. La variante hereditaria es una enfermedad que suele ser difícil de reconocer, tanto por la falta de historia familiar previa especialmente en las zonas no endémicas en las que los casos suelen ser mutaciones de novo, como por la presentación clínica tan heterogénea que puede presentar. Los datos actuales de prevalencia, derivan en la mayoría de los casos de bases de datos de pacientes diagnosticados y estarán por lo tanto subestimados. El análisis de los grandes estudios de secuenciación masiva, como Genome Aggregation Database (gnomAD) pueden servirnos para estudiar la frecuencia de variaciones génicas en la amiloidosis ATTRm.

Por otro lado, la variante senil, se está viendo que está implicada en un número considerable de casos de insuficiencia cardiaca con FEVI preservada, pudiendo llegar a ser tan frecuente o más que la amiloidosis cardiaca AL.

Especialmente por esto último, el número de pacientes en los que se debería hacer el diagnóstico diferencial de amiloidosis ATTR es alto. Actualmente la única manera de diferenciar la variante senil de la genética es realizando la secuenciación del gen para detectar variantes productoras de enfermedad. La posibilidad de disponer de un método de cribado más rápido, simple y barato que la secuenciación sería de gran utilidad en el contexto de un estudio poblacional de la enfermedad.

Además, el estudio de la carga de proteína mutante en suero podría ser de utilidad para un mejor entendimiento de la enfermedad; una vez detectado un caso de ATTR familiar, podría determinarse mediante espectrometría de masas, salvo algunos casos excepcionales, en los cuales deberán utilizarse otras técnicas.

Teniendo en cuenta estos hechos, planteamos como hipótesis que:

- La amiloidosis genética es una entidad infradiagnosticada, presente no solo en zonas endémicas, existiendo la posibilidad de que haya casos sin diagnosticar en nuestro medio.
- La técnica de HRMA es una herramienta que podría ser utilizada en el screening de amiloidosis ATTR, reduciendo costes y tiempos de trabajo comparado con la secuenciación.
- La técnica de isoelectroenfoque podría ser de utilidad en aquellos casos en los que la espectrometría de masas no permite diferenciar la proteína TTR wild type de la mutada.

## 2.2 OBJETIVOS

Para corroborar estas hipótesis, en este trabajo se desarrollaron los siguientes objetivos:

### Objetivos primarios

- Evaluar la frecuencia de variantes en el gen *TTR* utilizando la base de datos poblacionales gnomAD.
- Evaluar la existencia de casos de amiloidosis genética en nuestro medio.
- Validar la técnica de HRMA para el screening de amiloidosis ATTR familiar.

### Objetivos secundarios

- Puesta a punto de la técnica de isoelectroenfoque (IEF) para la detección de proteína TTR wild type y mutada en suero.

## **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se ha realizado un estudio observacional y transversal. Puede dividirse en:

- Estudio de prevalencia:
  - Una parte del estudio ha sido elaborada con el objetivo de calcular la prevalencia de mutaciones en el gen *TTR* a través de los datos disponibles en bases de datos poblacionales.
  - Otra parte del estudio ha sido diseñada con el objetivo de detectar posibles casos de amiloidosis ATTR en nuestro medio.
  
- Estudio de concordancia:
  - Puesta a punto de la técnica HRMA para utilizarla como screening de amiloidosis por TTR.
  - Puesta a punto de la técnica de isoelectroenfoque (IEF) para la detección de proteína TTR wild type y mutada en suero.

Se ha seguido el siguiente esquema de trabajo:



## 3.2 ANÁLISIS DE LA BASE GNOMAD

GnomAD, es una actualización del proyecto ExAC; agrupa actualmente 123.136 exomas y 15.496 genomas de individuos no relacionados entre ellos y de distintas poblaciones. No se incluyen entre sus datos pacientes con trastornos pediátricos severos.

El análisis de los datos de GnomAD, se realizó en el periodo de noviembre 2017 a de enero 2018. Para ello se seleccionaron todas las variantes génicas que la plataforma <http://gnomad.broadinstitute.org/> aporta en relación al gen *TTR* (TTR, canonical transcript ENST00000237014). Todos los datos fueron exportados a Microsoft Excel.

Las variantes a estudio fueron aquellas en las que se produce un cambio de un aminoácido por otro (missense), ya que las variantes causantes de enfermedad son aquellas que afectan al plegamiento de la proteína que inducen el acúmulo de la misma, no aquellas que conducen a una proteína truncada no funcional. Por lo tanto, se han descartado las siguientes variantes:

- Mutaciones sinónimas en las que la proteína resultante es igual a la nativa.
- Mutaciones de splicing, mutaciones nonsense (generación de codón de stop) o frameshift (cambio del marco de lectura), ya que en estos casos probablemente no se generará proteína y por tanto tampoco existirá acumulo de ésta.
- Mutaciones intrónicas o en regiones no codificantes.

Las variantes estudiadas se han clasificado según su significado clínico y según las distintas poblaciones estudiadas en la base de datos.

- Según el significado clínico: se han identificado las variantes del gen *TTR* descritas en otras bases de datos y en la bibliografía, usando NCBI ClinVar database <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, la base de datos Mutations in Hereditary amyloidosis <http://www.amyloidosismutations.com/>, la base de datos HGMD (Human Genetic Mutation Database) [www.hgmd.cf.ac.uk/](http://www.hgmd.cf.ac.uk/) y revisando la literatura disponible en [www.PubMed.com](http://www.PubMed.com).

La patogenicidad de cada variante se ha clasificado según las recomendaciones del American College of Medical Genetics and Genomics (127) como:

- Variante patológica. Variante descrita como tal según evidencias suficientes (estudios de segregación, estudios de funcionalidad)
  - Variante probablemente patológica. Variante missense no descrita, pero que en su misma posición ha sido descrita y clasificada como patológica otra mutación missense que produzca distinto cambio de aminoácido.
  - Variante de significado clínico incierto. Variante no descrita en bases de datos, ni en la literatura o variante descrita con clasificación contradictoria.
  - Variante probablemente benigna. Variante missense no descrita, pero que en su misma posición ha sido descrita y clasificada como benigna, otra mutación missense que produzca el mismo o distinto cambio de aminoácido.
  - Variante benigna. Variante clasificada como tal en bases de datos o literatura con suficientes evidencias.
- Según la población: todas las variantes analizadas se clasifican según parámetros de población definidos en gnomAD como:
    - Europeo (no Finlandés)
    - Finlandés
    - Africano/Afroamericano
    - Latino
    - Judío
    - Asiático del sur
    - Asiático del este
    - Otros

### 3.3 ESTUDIO DE AMILOIDOSIS ATTR<sub>m</sub> EN NUESTRO MEDIO

Con el objetivo de detectar posibles casos de amiloidosis ATTR<sub>m</sub> en nuestro medio, hemos diseñado un estudio que se detalla a continuación. Se han seleccionado pacientes de nuestro hospital, siguiendo unos criterios concretos, a los cuales se les ha realizado el estudio genético del gen *TTR* para descartar o confirmar el diagnóstico de amiloidosis ATTR genética.

#### 3.3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

La selección de pacientes se realizó en el H.C.U. Lozano Blesa, durante el periodo de tiempo de mayo del 2016 a enero del 2018.

Se seleccionaron aquellos pacientes ingresados en los que podía haber sospecha o confirmación de amiloidosis según los criterios que se exponen posteriormente, y se realizó una revisión sistemática de su historia clínica para valorar su idoneidad o no para el estudio.

Al tratarse de un estudio observacional no se ha intervenido en el manejo diagnóstico terapéutico de los pacientes, la única intervención llevada a cabo por el equipo investigador ha sido la revisión de la historia clínica y el estudio genético a todos los pacientes incluidos. Si en algún caso se realizaron pruebas adicionales posteriores a la inclusión del paciente en el estudio, éstas no se reflejan en las estadísticas del presente trabajo.

Los criterios de inclusión y exclusión establecidos fueron:

##### Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de edad (>18 años).
- Pacientes con antecedentes de amiloidosis no filiada.
- Pacientes con antecedente familiar de amiloidosis ATTR familiar.

- Pacientes con diagnóstico de amiloidosis o con sospecha clínica de la misma (al menos deben cumplir dos de los siguientes criterios):
  - Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada sin historia de enfermedad cardíaca valvular o hipertensión arterial.
  - Antecedentes clínicos de disautonomía o síndrome del túnel del carpo bilateral.
  - Polineuropatía de etiología no filiada.
  - Pruebas de imagen compatibles con amiloidosis: gammagrafía, ecocardiograma o resonancia magnética cardíaca.
  - Electroneurograma o electromiograma compatible con polineuropatía amiloidótica familiar.

#### Criterios de Exclusión

- Pacientes menores de 18 años.
- Rechazo del paciente a participar en el estudio.

Para realizar la selección, los datos de cada paciente se fueron recogiendo según una plantilla diseñada para la recogida de datos y muestras (Anexo 1). Posteriormente esos datos se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

Una vez seleccionados los pacientes, estos fueron informados verbalmente y por escrito, entregándoles una hoja informativa recogida en el Anexo 2, explicándoles tanto los objetivos como la metodología del estudio. Como requisito indispensable para la participación en el estudio fue la firma del consentimiento informado de todos los participantes, autorizando el uso en investigación de las muestras de sangre periférica que les fueron extraídas (Anexo 3)

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (CEICA), adscrito al Departamento de Salud del Gobierno de Aragón (Anexo 4). La investigación fue llevada a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y sus posteriores revisiones.

### 3.3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se recogieron muestras de sangre periférica de los pacientes sospechosos de amiloidosis ATTRm. La extracción se realizó mediante punción de la vena cubital de forma no traumática. Se extrajeron dos muestras de cada paciente:

- Muestra de sangre total para realizar la extracción de ADN. Se utilizaron tubos Vacutainer® con ácido etilendiaminotetraacético tripotásico (EDTA-K<sub>3</sub>) como anticoagulante.
- Muestra de suero para realizar la detección de proteína mutada en caso de ser necesario.

Todas las muestras fueron codificadas tras la extracción, de modo que todos los estudios posteriores se realizaron de manera anónima. Tras la llegada al laboratorio de las muestras se realizó tanto la extracción de ADN, como la separación de suero. El proceso se detalla a continuación.

#### A. Extracción de ADN de sangre periférica.

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras de sangre total de forma automática con el equipo Magtraction® 12GC. Las etapas de este proceso son:

- Fase de lisis. Adición del buffer lisis que contienen:
  - Detergentes para lisar membranas y lípidos.
  - Altas concentraciones de sales caotrópicas: forman una capa iónica alrededor del ADN.
  - Proteinasa K: degrada proteínas y enzimas.
- Adición de perlas magnéticas. Son membranas de sílice formadas por perlas magnéticas con un centro de hierro.
- Solución amortiguadora a pH ácido. Permite cargar positivamente las perlas, favoreciendo la unión del ADN a las mismas.

- Captura del ADN. Separación de las perlas con el ADN de las soluciones en las que se encuentran suspendidas, se utiliza un imán y de esta forma son retenidas en la pared del microtubo.
- Solución de lavado a pH fisiológico. Las proteínas y lípidos al tener baja afinidad por las perlas magnéticas, son eliminados.
- Solución básica. Neutraliza la carga de las perlas y se consigue así la elución del ADN, mientras que las partículas magnéticas continúan siendo retenidas por el campo magnético.

Una vez obtenido el ADN, este fue cuantificado. Se determinó su pureza y calidad mediante un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 de Thermo Scientific™).

La cantidad de ADN se obtiene de la lectura de absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ), a la cual absorben todos los ácidos nucleicos, y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría.

La calidad del ADN se determina mediante el ratio entre la absorbancia a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Se consideran valores aceptables los comprendidos entre 1.6 y 2.0; siendo el óptimo 1.8. Una relación  $< 1.8$  indica que la muestra se encuentra contaminada con proteínas o solventes orgánicos. Otro ratio utilizado para la pureza del ADN es  $A_{260}/A_{230}$ , se aceptan los valores que se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes.

## B. Obtención del suero.

Se separó el suero de las células sanguíneas mediante centrifugación a 3500 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos.

Ambas muestras (ADN y suero), bien identificadas, se congelaron a -70°C para su posterior procesamiento.

### 3.3.3 SECUENCIACIÓN DEL GEN *TTR*

Para realizar la secuenciación del gen *TTR* se ha realizado la secuenciación de los exones 2, 3 y 4 mediante secuenciación tipo Sanger cuyos pasos se especifican en la figura 8.

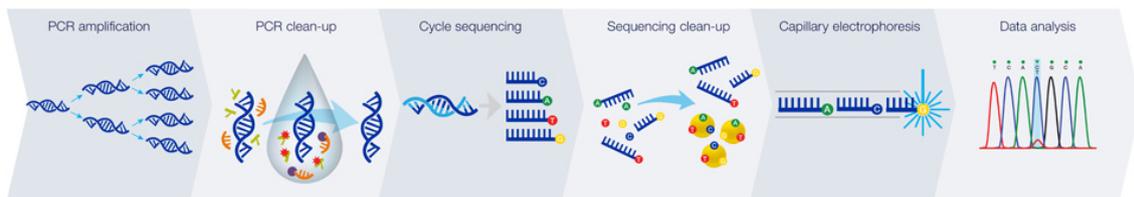


Figura 8. Proceso de secuenciación Sanger (128)

#### 3.3.3.1. Amplificación de la secuencia de interés

Para realizar el diagnóstico de amiloidosis ATTR hereditaria, es imprescindible realizar la secuenciación del gen *TTR*. Este gen, está formado por 4 exones, de los cuales solo han sido secuenciadas las regiones exónicas codificantes e intrónicas colindantes (secuenciación Sanger) de los exones 2 (296 pb), 3 (281 pb) y 4 (309 pb). El exón 1 (245 pb) codifica para el péptido leader, por lo que no es necesario su análisis.

Las secuencias se han amplificado mediante PCR (Polymerase chain reaction). Los elementos básicos para llevar a cabo la reacción son:

- ADN polimerasa termoestable: en este caso se ha utilizado Taq-PCR Master-mix 2X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM (VWR International) la cual contiene Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*). Además de los tampones necesarios para que la reacción se lleve cabo, magnesio (coenzima necesario) y una cantidad suficiente de dNTPs.
- Primers o cebadores de oligonucleótidos: delimitan la secuencia a estudio, siendo uno de los puntos críticos a tener en cuenta y determinan el óptimo rendimiento del proceso. En este caso, se utilizaron los propuestos por Bergen (129) en 2004 y que se indican en la tabla 7.

Exón 2	TTR 2F	5' CTTGTTTCGCTCCAGATTTC 3'
	TTR 2R	5' TGAGCCTCTCTCTACCAAGTG 3'
Exón 3	TTR 3F	5' TGTTTCCTCCATGCGTAACT 3'
	TTR 3R	5' TAGGACATTTCTGTGGTACACTG 3'
Exón 4	TTR 4F	5' GGACTTCCGGTGGTCAGT 3'
	TTR 4R	5' TGCCTGGACTTCTAACATAGC 3'

Tabla 7. Primers utilizados para la amplificación PCR

Los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados y distribuidos por Invitrogen S.A. y reconstituidos a 100 µM para obtener la solución stock. A partir de la misma se realizaron alícuotas de trabajo, con una concentración final de 12,5 µM y almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Cada reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 25 µl, de los cuales, 12,5 µl corresponden a Taq-PCR Master-mix 2X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 1 µl por cada uno de los primers (0,5 nmol/L) y 1,5 µl de ADN genómico total (50 ng). Se completó con agua miliQ estéril hasta los 25 µl.

Después de establecer las condiciones óptimas, la reacción se realiza en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 de Applied Biosystems™ bajo las condiciones detalladas en la tabla 8.

	Temperatura	Tiempo	
<b>Inicio</b>	95 °C	10 '	} 35 ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	30 "	
<b>Hibridación</b>	60 °C	30 "	
<b>Extensión</b>	72 °C	30 "	
<b>Extensión final</b>	72 °C	10 '	

Tabla 8. Condiciones establecidas para realiza la amplificación PCR

### 3.3.3.2. Análisis electroforético en gel de agarosa

Para comprobar que la amplificación de los exones por PCR se ha realizado correctamente, se realiza una electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % con tampón TBE (Tris, Borato, EDTA) y teñido con bromuro de etidio que actúa como marcador de los ácidos nucleicos.

La preparación de la electroforesis en gel de agarosa consta de los siguientes pasos:

- Preparación del gel de agarosa 0,8 %. Se pesan 1,2 g de agarosa (Thermo Fisher) y se disuelven en 150 ml de tampón TBE (tabla 9). Para favorecer la completa disolución de la agarosa, se calienta la mezcla en el microondas. Posteriormente se añaden 75 µl de bromuro de etidio (tabla 10) para obtener una concentración final de 0,5 µg/mL. A partir de este momento, debemos trabajar cuidadosamente y siempre con guantes ya que el bromuro de etidio está clasificado como mutágeno de categoría 2. Esta disolución de agarosa se vierte a un molde provisto de un peine para formar los pocillos, donde se deja solidificar durante aproximadamente 40 min.

Reactivos	Cantidad
<b>Tris</b>	11 g
<b>Ácido Bórico</b>	5,5 g
<b>EDTA 0.5 M</b>	4 ml
<b>Agua destilada</b>	Completar hasta 1 l
<b>Ajustar pH a 8</b>	

Tabla 9. Composición del tampón de electroforesis TBE 1X

Reactivos	Cantidad
<b>Bromuro de Etidio</b>	50 $\mu$ l
<b>Tris 1X</b>	950 $\mu$ l

Tabla 10. Composición Bromuro de Etidio.

- Una vez formado el gel, éste se trasvasa a la una cubeta de electroforesis (BioRad) llena de tampón TBE 1X.
- Para cargar las muestras en el gel se requiere una mezcla (1:1) con un tampón de carga (tabla 11) que le proporciona densidad y color. Los volúmenes que se utilizan en este caso son 3,5  $\mu$ l de producto de PCR + 3,5  $\mu$ l tampón de carga.
- Una vez cargadas las muestras en los pocillos del gel (7  $\mu$ l aproximadamente), se le aplica un campo eléctrico constante de 100 mV, hasta que el frente de avance alcance dos tercios del gel.

Reactivos	Concentración
Glicerol	30 %
TBE	60 %
Azul Bromofenol	2,5 %

Tabla 11. Composición tampón de carga

- La presencia de los fragmentos de ADN se comprueba en un transiluminador con luz ultravioleta de Bio-Rad Laboratories. Esto es posible ya que el bromuro de etidio es un agente intercalante que se une al ADN y emite fluorescencia cuando se excita con luz ultravioleta de onda corta (254 nm). La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto. Las imágenes son reveladas y editadas en el programa Quantity One vs 4.6.9.

### 3.3.3.3. Purificación enzimática

Antes de realizar la secuenciación, el producto de PCR debe ser purificado para eliminar los dNTPs y primers residuales. Para ello se realiza un tratamiento siguiendo el protocolo ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences). Consiste en el tratamiento de la muestra con dos enzimas hidrolíticas, Exonucleasas I y SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). La Exonucleasa I degrada los residuos monocatenarios de nucleótidos, eliminando así los primers residuales. La enzima SAP, es una Fosfatasa Alcalina de camarón que defosforila los dNTPs que no han sido utilizados.

Para la realización de la purificación:

1. Añadir 2,5 µl del producto de PCR a 1 µl de ExoProStar™ (diluido ¼)
2. Incubar la dilución resultante a 37 °C durante 40 minutos para promover la defosforilación de los nucleótidos.
3. Incubar a 80 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima

### 3.3.3.4. Secuenciación

Para conocer la secuencia de los fragmentos amplificados, se realiza una PCR de secuenciación, en la que a diferencia de la PCR de amplificación, se utiliza un solo primer y se agregan dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3' y que están marcados con radiactividad o con fluoróforos. (Tabla 12)

Cuando se incorpora un dideoxinucleótidos a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se obtienen fragmentos de diferente longitud, cada uno terminando en un ddNTPs.

Cada uno de los pasos del programa de secuenciación se especifican en la tabla 13.

Reactivos	Cantidad
Primer F	0,3 µl
Producto PCR tratado con ExoSap	1,5 µl
Buffer Secuenciación	7 µl
H <sub>2</sub> O	Completar hasta 10 µl

Tabla 12. Composición reacción secuenciación.

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Inicio	96 °C	1 '	} 25 ciclos
Desnaturalización	96 °C	10 "	
Hibridación	55 °C	5 "	
Extensión	60 °C	4 '	

Tabla 13. Programa PCR de secuenciación.

### 3.3.3.5. Electroforesis capilar

Se realiza una electroforesis del producto de PCR de secuenciación para comprobar el éxito de la misma. Los fragmentos de ADN migran de acuerdo a su tamaño (los pequeños migran más rápido), el fluoróforo con el que van marcados es detectado por un láser, que envía una señal la cual es interpretada por el equipo en forma de un pico en un electroferograma. Así los fragmentos obtenidos son separados y analizados.

Esta electroforesis se realizó en el Servicio de Secuenciación y Genómica funcional disponible en el Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón mediante un Secuenciador de ADN 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

### 3.3.3.6. Obtención e información de resultados

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, estos fueron analizados con la ayuda del Software GenomeLab GeXP<sup>TM</sup> (Beckman Coulter) y se realizó el correspondiente informe para su envío al domicilio de cada uno de los participantes. Aquellos pacientes con resultado positivo, fueron llamados a consulta para hacer un estudio detallado de su caso, realizando el correspondiente consejo genético. Se realizó el árbol genealógico y a los pacientes de primer grado se les propuso la participación en el estudio por la conveniencia de realizar el estudio genético.

## 3.4. HIGH-RESOLUTION MELTING ANALYSIS (HRMA)

Para la puesta a punto de la técnica de screening, se ha optado por la elección de la técnica High-resolution melting analysis (HRMA), la cual se basa en el análisis de las curvas de fusión de alta resolución.

Consiste en la realización de una PCR a tiempo real, que amplifica cada uno de los exones del gen *TTR*, a la que se añade un fluoróforo que sólo emite fluorescencia cuando está unido a la doble hebra del ADN.

Tras la realización de la PCR en presencia del fluoróforo, se separan las dos cadenas de ADN mediante calentamiento a 95 °C y después se renaturalizan enfriando poco a poco para favorecer la formación de los heteroduplex. Si no existe mutación, las cadenas quedarán perfectamente emparejadas. Cuando existe mutación en una de las cadenas, el emparejamiento de bases no será totalmente complementario, produciéndose un “gap” o agujero entre las dos cadenas de ADN. Esto implica que en presencia de mutación, la temperatura a la que las dos hebras de ADN se separan, se modificará.

Por último se precede a la separación de las hebras con un aumento de la temperatura. Este proceso se puede monitorizar midiendo la fluorescencia emitida por el fluorocromo a medida que se incrementa la temperatura, (curva de Melting) aprovechando la propiedad de que esta molécula que sólo emite fluorescencia cuando está intercalado entre el ADN y deja de emitirla cuando las cadenas se han separado (figura 9).

De esta manera, la presencia de heteroduplex, debido a la presencia de una mutación en heterocigosis en el exón amplificado, modificara la curva de melting, lo que nos permitirá su detección.

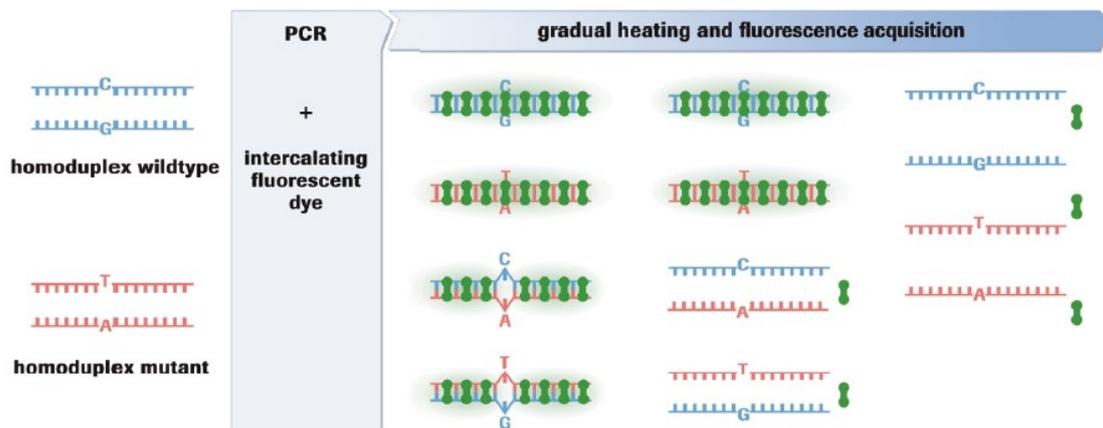


Figura 9. Esquema proceso del HRMA

### 3.4.1 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO HRMA

Para la realización de este proceso se han utilizado las mismas muestras que se han analizado en el apartado anterior. Para poder completar la validación de HRMA, se ha añadido además una muestra de un paciente ya diagnosticado y portador de la mutación p.Val50Met, solicitada al Servicio de Neurología del Hospital de Bellvitge.

Para realizar esta técnica de HRMA, los reactivos que se requieren son:

- Primers: se han utilizado los mismos que para la secuenciación Sanger. (Tabla 7).
- Catión divalente:  $MgCl_2$ , los iones de magnesio estimulan a la enzima Taq Polimerasa para que incorpore los dNTPs. La concentración de catión debe optimizarse para obtener un buen resultado.
- dNTPs: al igual que en la PCR convencional.

- Enzima: Taq Polimerasa. En este caso en concreto la enzima utilizada es una Hot Start ADN Polimerasa, una Taq polimerasa recombinante, que no se activa hasta que se alcanzan al menos 60 °C de temperatura, lo cual aumenta la especificidad de la PCR.
- Solución amortiguadora y sales: proporcionan el ambiente óptimo para la reacción. Influyen en la temperatura de melting y en la temperatura de hibridación.
- Fluorocromo: permite el seguimiento de la amplificación y el análisis de la curva de Melting. El utilizado en este caso ha sido el agente intercalante SyberGreen.

Cada muestra se ha preparado por duplicado en una placa de 96 pocillos LightCycler® 480 Multiwell plate 96, como se indica en la tabla 14.

Reactivos	Concentración Final	Cantidad
LightCycler 480 High Resolution Melting x 2	X 1	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 mM	1,2 µl
Primer F (6 mM)	0,3 nM	0,5 µl
Primer R (6 mM)	0,3 nM	0,5 µl
ADN (15 ng/ml)	30 ng	2 µl
H <sub>2</sub> O estéril		c.s.p. 10 µl

Tabla 14. Composición reacción HRMA

Una vez preparadas todas las muestras, se cubre la placa, se centrifuga mediante un breve spin y se introduce en el equipo.

El Programa de HRMA consta de varias etapas, que son

- Programa 1: Desnaturalización
- Programa 2: Amplificación
- Programa 3: Análisis de curvas de fusión.
- Programa 4: Enfriamiento.

Siguiendo los parámetros descritos a continuación en la tabla 15.

Parámetros	Programa 1	Programa 2			Programa 3				Programa 4
Nº ciclos	1	45			1				1
Temperatura (°C)	90	95	60	72	95	40	60	95	40
Tiempo	10 '	17"	16 "	18"	60"	60"	1"		10 '
Adquisición	No	No	No	Simple	No	No	No	Continua	No
Rampa de T <sup>a</sup> (°C/s)	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	1	0.04	1.5
Adquisición (por °C)								25	

Tabla 15. Programa de PCR utilizado en HRMA.

### 3.4.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Todas las muestras se analizaron en el equipo RealLightCycler® 480 (Roche Molecular Biochemicals) con el Software LightCycler® 480 Software Release versión 1.5.1. El análisis se realiza en tres pasos:

1. Absolute Quant/2<sup>a</sup> derivada Max: permite comprobar que la amplificación de las muestras tras la PCR ha sido adecuado. El ciclo umbral a partir del cual se considera que empieza a haber amplificación se denomina Cp. Un Cp < 30 es indicativo de que hay una cantidad de muestra apropiada y que la amplificación se ha realizado correctamente. Además, entre las muestras, el valor de Cp no debe variar más de 5 unidades.

2. **Tm Calling:** permite comprobar que los productos generados tras la PCR presentan la  $T^a$  de melting esperada y que no se han generado productos inespecíficos. Este tipo de análisis está indicado para corroborar la especificidad de los productos amplificados obtenidos, así como para detectar de la presencia de posibles contaminantes.
3. **Gene Scanning:** permite detectar diferencias en las curvas de melting y clasificar las muestras que presentan variaciones genéticas en grupos diferentes respecto de los controles negativos. Para ello se realizan tres pasos (figura 10):
  - A. **Normalización:** Se asigna el rango de fluorescencia entre 100% (fluorescencia inicial) y 0% (fluorescencia final).
  - B. **Temperature Shift:** las curvas de melting se superponen sobre el mismo rango de temperaturas.
  - C. **Difference Plot:** genera gráficos a partir de la diferencia relativa de señal de fluorescencia. Se toma una muestra negativa como línea base y se van restando los valores de fluorescencia de la negativa al resto de las muestras, aumentando así la diferencia entre grupos y permitiendo identificar de una manera más sencilla las muestras con variaciones genéticas.

Para conseguir un análisis óptimo de HRM en cada ensayo hay que revisar siempre que los datos de la amplificación cumplan:

- a) Todas las curvas de amplificación deben producir un valor de  $C_p < 30$
- b) Todas las curvas deben alcanzar una fase plató similar,
- c) El valor de  $C_p$  entre las muestras, no debe variar más de 5 unidades de  $C_p$

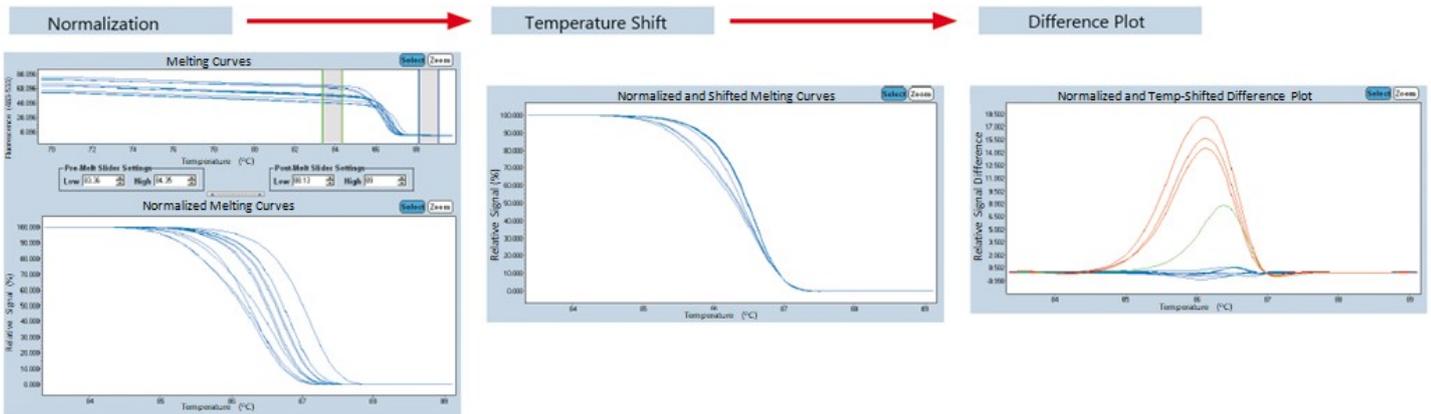


Figura 10. Análisis de resultados en HRMA

Si bien la aplicación Gene Scanning puede detectar cualquier variación de secuencia entre diferentes muestras, no determina en cambio cuál es exactamente la base que está presente en los respectivos alelos. Por tanto, se requiere de la secuenciación de la muestra que haya tenido un resultado en HRMA positivo

En el presente trabajo se ha utilizado la secuenciación Sanger para la validación de los resultados obtenidos por HRMA, una vez procesadas todas las muestras los resultados fueron comparados con los datos obtenidos en la secuenciación Sanger, para comprobar si existe una buena correlación entre ellos.

### 3.5 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA EN SUERO POR ISOELECTROENFOQUE.

Para la detección de proteína en suero y la diferenciación de las formas wild type y mutada, se ha realizado la puesta a punto de la técnica de análisis de proteínas mediante isoelectroenfoque (IEF)

Esta técnica se basa en la separación de proteínas según su punto isoeléctrico (pI). Es útil para separar proteínas cuyo peso molecular es tan similar que imposibilita la utilización de técnicas más automatizadas y precisas como la espectrometría de masas.

Debido a la propiedad anfotérica de las proteínas, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH. Las proteínas se detienen siempre en la zona en la que el pH coincide con su punto isoeléctrico, es decir en el punto en el que tienen carga neta nula. Se coloca la muestra en un buffer de baja fuerza iónica y con la aplicación de una diferencia de voltaje, las proteínas cargadas se desplazan hasta alcanzar un pH equivalente a su punto isoeléctrico. La muestra se puede colocar en cualquier zona del medio de soporte, en la zona cercana al cátodo, al ánodo o en el centro del mismo.

Para hacer el cálculo teórico del punto isoeléctrico de las proteínas que vamos a analizar, se ha utilizado la plataforma on line ExPASy, SIB Bioinformatics Resource Portal ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/))

### **3.5.1 ELIMINACIÓN ALBÚMINA**

Debido a que la albúmina es la proteína mayoritaria en el suero, se eliminó de las muestras para evitar posibles interferencias. Para esto se utilizó el kit de Pierce™ Albumin Depletion Kit de Thermo Fisher Scientific. Este kit consta de unas columnas con resina de agarosa con el colorante Cibacron Blue, el cual tiene la capacidad de unir y retener la albúmina de manera inespecífica mediante interacciones electroestáticas e hidrofóbicas entre los residuos de la proteína y el grupo aniónico aromático del colorante. De cada muestra se purificaron 50 µl de suero, utilizando 400 µl de resina. Para cada experimento se deben preparar las muestras que queremos analizar y además una muestra de un paciente sin amiloidosis hereditaria, el cual nos servirá como control.

### **3.5.2 PREPARACIÓN DEL BUFFER DE IEF**

Este buffer se utiliza tanto para solubilizar las proteínas de la muestra como para realizar la rehidratación del gel. Para lograr la solubilización se utilizan distintos agentes como se expone a continuación:

- Agentes caotrópicos: el agente más utilizado es la urea que a diferencia del SDS no posee carga. La urea actúa sobre los puentes de hidrógeno impidiendo la agregación o formación de estructuras secundarias que puedan afectar a la movilidad. Suele utilizarse a una concentración 8M.
- Detergentes: aumentan la solubilidad al actuar sobre las interacciones hidrofóbicas. Deben utilizarse detergentes no iónicos como CHAPS para no modificar las cargas de las proteínas.
- Anfólitos: necesarios para la solubilidad de las proteínas siempre que se usen a bajas concentraciones. Altas concentraciones de sales pueden hacer que la proteína precipite antes de llegar a su pI, por lo que suelen usarse a concentraciones < 0,2 %.
- Agentes reductores: actúan sobre puentes disulfuro como los creados por ejemplo entre cistinas. Se utilizó para ello ditioneitol (DTT) a una concentración de 50 mM.

La solución utilizada en este caso fue preparada como se indica en las tablas 16 y 17.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Urea	8M	4,7 ml del stock de Urea 8,5 M
DTT	50 mM	38,5 mg
CHAPS	4 %	0,2 g
Anfólitos	0,2%	12,5 µl
Azul Bromofenol	0,0002%	10 µl del stock 1%
Agua		Ajustar a 5 ml

Tabla 16. Composición Buffer de IEF

Reactivo	Concentración	Cantidad
Urea	8,5 M	5,1 g
Agua		Ajustar a 10 ml

Tabla 17. Composición Stock de urea 8,5 M

### 3.5.3 APLICACIÓN DE LA MUESTRA Y REHIDRATACIÓN DE LA TIRA IEF

Tras pasar el suero por las columnas para la eliminación de la albúmina, debe añadirse el buffer que hemos preparado para realizar el IEF.

- El eluido obtenido de las columnas de eliminación de la albúmina (50  $\mu$ l), se recogió y se le añadió directamente 350  $\mu$ l de buffer de IEF. Se dejó la muestra en agitación durante 30 minutos.
- Se coloca cada muestra en un canal de la bandeja de IEF (Biorad), colocando seguidamente la tira de IEF ReadyStrip™ de 17 cm, las cuales comprenden un pH de 4 a 7 (figura 11).

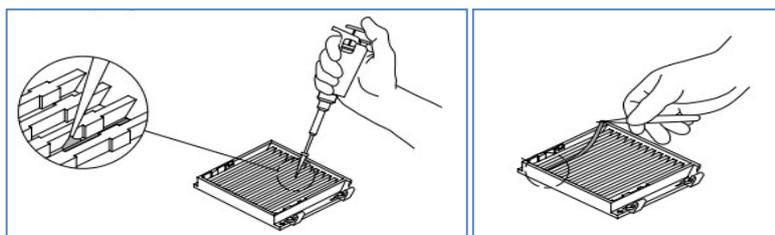


Figura 11. Aplicación de la muestra y tira de IEF.

- Dejar que la muestra se vaya distribuyendo por toda la tira durante al menos 1 hora.
- Cubrir las tiras con Mineral Oil para prevenir la evaporación del buffer, lo cual causaría que se precipiten las proteínas.

- Iniciar el programa de rehidratación activa durante al menos 12 horas, aplicando un voltaje de 50 V.
- Tras la rehidratación, colocar a ambos lados de cada tira de IEF, unos pequeños filtros que irán recogiendo las sales de la muestra para que estas no se depositen en el ánodo ni en el cátodo alterando la conductividad.
- Iniciar el programa IEF. (Tabla 18)

Etapa del programa IEF		
S1	250 V 15 minutos	Se aplica un bajo voltaje para eliminar sales y contaminantes con carga.
S2	Rampa de voltaje: lineal	10000V; 3 horas.
S3	Final IEF	10000V; 3,5 horas.
S4	Mantenimiento 500V (opcional)	Previene la difusión de las proteínas.

Tabla 18. Programa de isoelectroenfoque.

### 3.5.4 DETECCIÓN INMUNOESPECÍFICA DE LA PROTEÍNA TTR (WESTERN BLOT)

El Western blot es una técnica analítica usada para identificar proteínas específicas. Para realizar esta técnica, después de la separación por punto isoelectroforético de las proteínas presentes en el suero, se realiza una transferencia a un soporte sólido y, finalmente, visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos. La detección de la proteína se ha realizado mediante métodos indirectos, los cuales utilizan dos anticuerpos; un anticuerpo primario dirigido contra la proteína que vamos a analizar (transtiretina) y un anticuerpo secundario contra la especie del primer anticuerpo y marcado con peroxidasa lo que permitirá detectar la proteína mediante quimioluminiscencia.

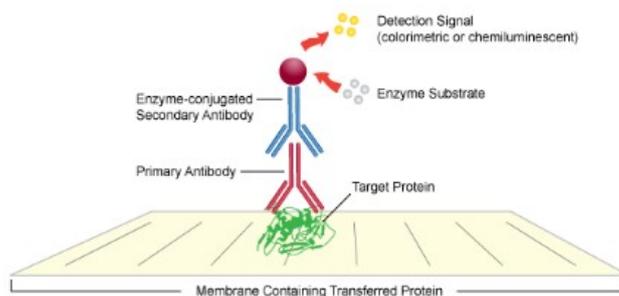


Figura 12. Western Blot

### 3.5.4.1. Transferencia e inmunodetección

- Finalizado el IEF, se elimina el aceite sobrante que ha quedado encima de las tiras y se cortan las tiras para quedarnos con la parte central, en la cual se habrá quedado la TTR. Se transfiere cada tira según las instrucciones de Biorad a una membrana de PVDF (Polivinildifluoruro). Finalizada la transferencia, se desmonta el sándwich y las tiras de IEF se eliminan.
- Bloquear la membrana con la solución de bloqueo (tablas 19 y 20) a temperatura ambiente durante una hora. Ajustar el pH final a un valor  $> 7.4$ . A partir de este punto la membrana de cada muestra se incubará y lavará por separado para evitar que interfieran unas muestras con otras.

Reactivo	Cantidad
PBS pH 7.4	100 ml
Tween 20	0,1 g
Leche Polvo Desnatada	5 g

Tabla 19. Composición solución de bloqueo

Reactivo	Cantidad
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
H <sub>2</sub> O	Completar a 1 l
Ajustar pH a 7,4	

Tabla 20. Composición Stock de PBS

- Incubar cada membrana con el anticuerpo primario diluido en la solución de lavado (tabla 21) dilución 1/2500. La incubación se lleva a cabo con agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. Para la detección de la proteína TTR, se ha utilizado el anticuerpo de conejo anti-TTR de Sigma-Aldrich.

Reactivo	Cantidad
PBS pH 7,4	1000 ml
Tween 20	1 g

Tabla 21. Composición solución de lavado.

- Lavar las membranas tres veces con la solución de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo primario que no se ha unido. Debe realizarse con agitación moderada-fuerte durante 10 minutos cada vez, a temperatura ambiente.
- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (HPR), diluido en la solución de lavado (dilución 1/20000), a temperatura ambiente durante una hora y con agitación suave. El anticuerpo secundario utilizado ha sido un anticuerpo anti-conejo.

- Las muestras deben cubrirse para evitar la exposición a la luz. Es conveniente hacer un control negativo incubando únicamente con el anticuerpo secundario.
- Lavar la membrana tres veces con la solución de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Debe realizarse con agitación moderada-fuerte durante 10 minutos cada vez, a temperatura ambiente.

### 3.5.4.2. Revelado quimioluminiscente

Para el revelado quimioluminiscente se utiliza una solución de revelado Clarity™ Western ECL Substrate de Bio Rad, la cual lleva luminol, un compuesto sobre el que actúa la peroxidasa del anticuerpo secundario.

La oxidación del luminol catalizada por la peroxidasa, en presencia de peróxido de hidrógeno, produce la excitación del luminol el cual al relajarse, emite luz a 425 nm (figura 13).

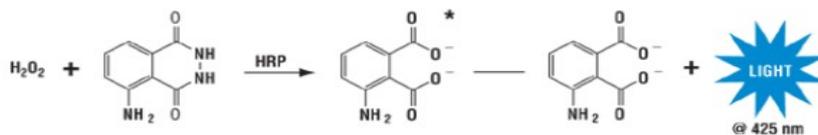


Figura 13. Revelado de Wester Blot con luminol.

- Una vez lavadas las membranas y retirado el exceso de tampón de lavado, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y sin agitación, con la solución de detección de quimioluminiscencia según las instrucciones del mismo. Se debe poner la membrana sobre una superficie limpia, con la cara de las proteínas hacia arriba y cubrirla totalmente con el volumen de reacción. Además, cuando echemos solución de reacción sobre la membrana debemos protegerla de la luz.
- Eliminar el exceso de reactivo. Seguidamente poner la membrana entre dos plásticos sin que queden arrugas ni burbujas.
- Revelar con el transiluminador Versadoc de Bio-Rad. Las imágenes son reveladas y editadas en el programa Quantity One 4.6.9.

## **4.- RESULTADOS**



#### 4.1. ANÁLISIS DE LA BASE GNOMAD

La distribución de los grupos étnicos se ha representado en el siguiente gráfico (figura 14). Se observa que el grupo mayoritario en gnomAD es el formado por población europea, el cual representa el 45% de toda la muestra con 53665 personas estudiadas.

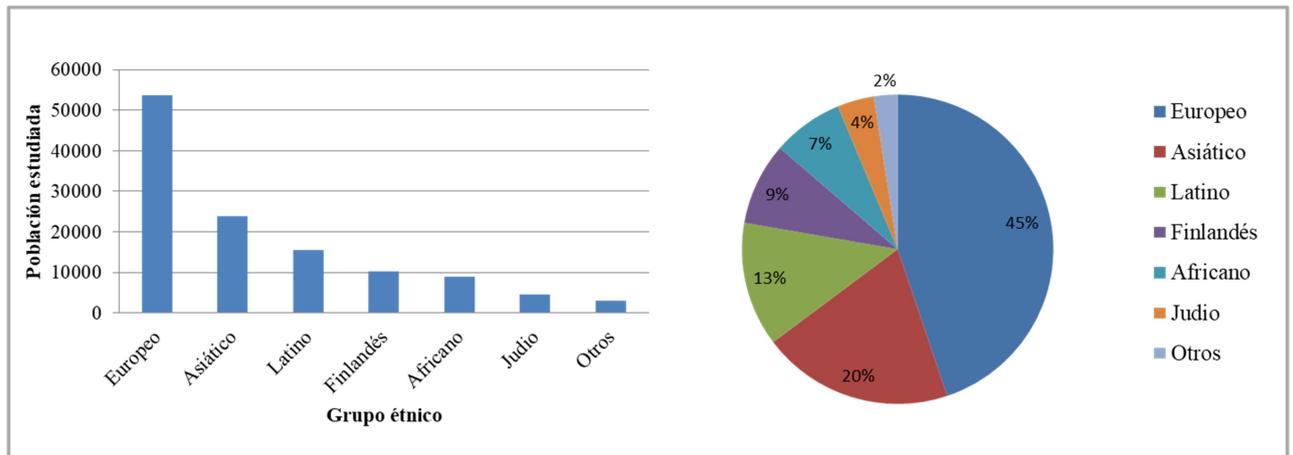


Figura 14. Distribución de la población estudiada

En cuanto a las variantes estudiadas, a través del análisis de la base de datos poblacional gnomAD, se han encontrado 72 variantes génicas missense en el gen *TTR*, en una media de 115.780 exomas/genomas estudiados.

Estas variantes se han clasificado según su significado clínico como:

- Variantes patológicas
- Variantes probablemente patológicas
- Variantes de significado incierto
- Variantes probablemente benignas
- Variantes benignas

#### 4.1.1. VARIANTES PATOLÓGICAS.

##### 4.1.1.1. Datos de frecuencia.

- La frecuencia global de variantes patológicas es de 1 mutación por cada 230 personas.
- p.Val142Ile es la variante patológica más frecuente. Presenta una prevalencia de 1:332 personas (MAF 0,00151) y engloba el 88% de todas las variantes patológicas (Figura 15).
- p.Val50Met es la segunda variante patológica más frecuente. Presenta una prevalencia de 1:4.925 (MAF 0,000102) y representa el 5% de todas las variantes patológicas. (Figura 15).

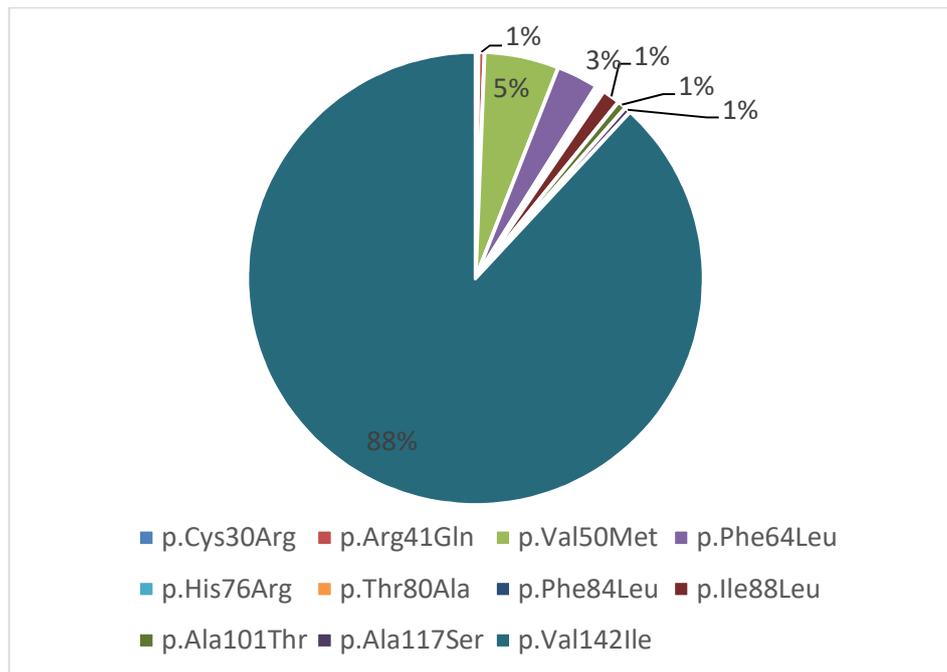


Figura 15. Distribución variantes patológicas descritas en GnomAD.

En la tabla 22 se describen todas las variantes patogénicas encontradas con sus frecuencias alélicas.

Variante	Nº alelos con esa variante	Nº exomas estudiados	Homocigotos	Frecuencia alélica
<b>p.Cys30Arg</b>	1	15492	0	0,0000323
<b>p.Arg41Gln</b>	2	123121	0	0,0000081
<b>p.Val50Met</b>	25	123118	0	<b>0,000102</b>
<b>p.Phe64Leu</b>	14	138600	0	0,0000505
<b>p.His76Arg</b>	1	15491	0	0,0000323
<b>p.Thr80Ala</b>	1	123108	0	0,0000041
<b>p.Phe84Leu</b>	1	123106	0	0,0000041
<b>p.Ile88Leu</b>	6	138591	0	0,0000217
<b>p.Ala101Thr</b>	3	123095	0	0,0000122
<b>p.Ala117Ser</b>	2	138367	0	0,0000072
<b>p.Val142Ile</b>	417	138570	3	<b>0,00151</b>

Tabla 22. Variantes del gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como patológicas

#### 4.1.1.2. Datos por poblaciones

Muchas de las variantes productoras de ATTR se asocian a grupos étnicos. En la tabla 23 se ha analizado esta asociación en las mutaciones más frecuentes (p.Val142Ile y p.Val50Met). El 92% de los de portadores de p.Val142Ile pertenecen al grupo de población africana; en el caso de la variante p.Val50Met, el 80% de los casos están asociados al grupo de población europea.

	p.Val142Ile		p.Val50Met	
	Nº mutaciones	%	Nº mutaciones	%
<b>Africano</b>	385	92,33	0	0
<b>Latino</b>	23	5,52	2	8,00
<b>Europeo (No Finlandés)</b>	5	1,20	20	80,00
<b>Finlandés</b>	0	0	1	4,00
<b>Asiático</b>	2	0,48	0	0
<b>Otros</b>	2	0,48	2	8,00
<b>Total casos</b>	417		25	

Tabla 23. Distribución por poblaciones de las mutaciones más frecuentes.

Analizando cada una de las etnias representadas:

- Población europea.

La prevalencia de variantes patológicas en la población europea es de 1:1.269 personas. La mutación más frecuente es p.Val50Met, representando el 54% de los casos europeos. Seguida de p.Val142Ile (13%) y p.Ile88Leu (13%). (Figura 16)

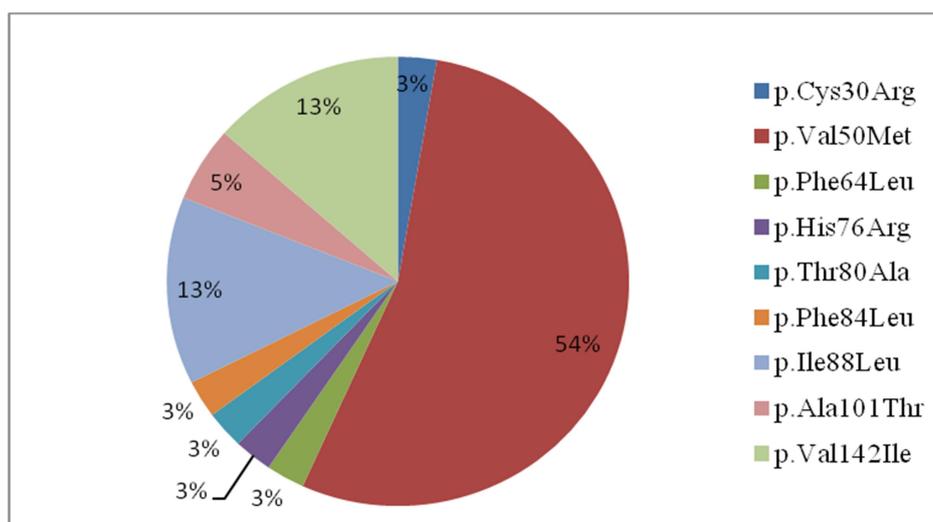


Figura 16. Distribución de mutaciones en Europa

La frecuencia de las mutaciones encontradas en población europea se resume en la tabla 24. El dato de mayor frecuencia alélica lo encontramos en la mutación p.Val50Met con una frecuencia de uno por cada 2.792 habitantes (MAF 0,000179), con un número de 20 casos registrados. Seguido de esta variante, se encuentra p.Val142Ile y p.Ile88Leu con una prevalencia de 1:12.666 y 1:12.668 respectivamente.

Variante	Nº casos gnomAD	Nº casos europeos	Nº exomas estudiados	Nº Homocigotos	Frecuencia alélica
<b>p.Cys30Arg</b>	1	1	1747	0	0,000067
<b>p.Val50Met</b>	25	20	55847	0	<b>0,000179</b>
<b>p.Phe64Leu</b>	14	1	63352	0	0,000008
<b>p.His76Arg</b>	1	1	7507	0	0,000067
<b>p.Thr80Ala</b>	1	1	55842	0	0,000009
<b>p.Phe84Leu</b>	1	1	55838	0	0,000009
<b>p.Ile88Leu</b>	6	5	63342	0	0,000004
<b>p.Ala101Thr</b>	3	2	55824	0	0,000018
<b>p.Val142Ile</b>	417	5	63331	0	0,000040

Tabla 24. Variantes europeas en el gen *TTR* clasificadas como patológicas.

- Población africana.

La prevalencia de variantes patológicas en la población africana es de 1:27 personas. La mutación p.Val142Ile está claramente asociada a la población africana, en la que se encuentra una mutación por cada 31 personas (MAF 0,01602). Otra de las mutaciones asociadas a etnia africana es p.Phe64Leu, de los 14 casos registrados en gnomAD, 13 son de esta población con una prevalencia de 1:924 personas. (MAF 0,00054110). (Tabla 25)

Variante	Nº casos gnomAD	Nº casos africanos	MAF
<b>p.Phe64Leu</b>	14	13	0,00054110
<b>p.Ile88Leu</b>	6	1	0,00004161
<b>p.Ala101Thr</b>	3	1	0,00006534
<b>p.Val142Ile</b>	417	385	0,01602

Tabla 25. Variantes del gen *TTR* en población africana clasificadas como patológicas.

- Población latina.

La prevalencia de variantes patológicas en la población latina es de 1:1.016 personas. En este grupo solo se describen dos mutaciones, son p.Val50Met y p.Val142Ile con una frecuencia de 1:8.395 y 1:748 respectivamente. (Tabla 26)

Variante	Nº casos gnomAD	Nº casos latinos	MAF
<b>p.Val50Met</b>	25	2	0,00005956
<b>p.Val142Ile</b>	417	23	0,0006683

Tabla 26. Variantes del gen *TTR* en población latina clasificadas como patológicas

- Población asiática.

La prevalencia de variantes patológicas en la población asiática es de 1:1.806 personas. A este grupo se asocian las variantes p.Arg41Gln con una prevalencia de 1:7.695 personas y p.Ala117Ser con 1:4715. (Tabla 27)

Variante	Nº casos gnomAD	Nº casos asiáticos	MAF
<b>p.Arg41Gln</b>	2	2	0,00006497
<b>p.Ala117Ser</b>	2	2	0,00010600
<b>p.Val142Ile</b>	417	2	0,00006497

Tabla 27. Variantes del gen *TTR* en población asiática clasificadas como patológicas.

#### 4.1.2. VARIANTES PROBABLEMENTE PATOLÓGICAS.

Se han clasificado como variantes probablemente patológicas 17 de las registradas, las cuales presentan unas frecuencias alélicas de entre 0,0000646 y 0,0000041. Las más frecuentes han sido p.Arg123Gly con una prevalencia estimada de 1:7.741 personas (MAF 0,0000646) y p.Thr79Ala con una prevalencia de 1:11.191 (MAF 0,0000447). (Tabla 28).

Variante	N° alelos con esa variante	N° exomas estudiados	N° Homocigotos	Frecuencia alélica
<b>p.Val40Leu</b>	1	123121	0	0,00000406
<b>p.Val40Ala</b>	1	123127	0	0,00000406
<b>p.Ser43Arg</b>	1	15485	0	0,0000323
<b>p.Ser70Gly</b>	1	123081	0	0,00000406
<b>p.Ser70Asn</b>	6	123083	0	0,0000244
<b>p.Glu71Ala</b>	1	15481	0	0,0000323
<b>p.Ser72Tyr</b>	1	123086	0	0,00000406
<b>p.His76Tyr</b>	1	123090	0	0,00000406
<b>p.Thr79Ala</b>	11	123104	0	0,00004470
<b>p.Tyr89Cys</b>	1	123103	0	0,00000406
<b>p.Lys90Gln</b>	2	138593	0	0,00000722
<b>p.Ala101Ser</b>	1	123095	0	0,00000406
<b>p.Ile104Leu</b>	1	123089	0	0,00000406
<b>p.Arg123Gly</b>	2	15483	0	0,0000646
<b>p.Arg123Cys</b>	3	123074	0	0,0000122
<b>p.Ile127Thr</b>	1	123105	0	0,00000406
<b>p.Tyr136His</b>	7	123118	0	0,0000284

Tabla 28. Variantes del gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como probablemente patológicas.

En este grupo de variantes probablemente patológicas, al analizar las variantes con mayor número de casos, también se observa una asociación variante-población como ocurría en el grupo anterior. Así como se observa en la tabla 29, las variantes p.Thr79Ala y p.Tyr136His se asocian a población latina, con una prevalencia de 1:1.729 y 1:2.399 respectivamente y la variante p.Ser70Asn a población europea con un caso por cada 9.304 habitantes.

Variante	Nº casos gnomAD	Nº casos europeos	MAF
<b>p.Ser70Asn</b>	6	6	0,0000537
<b>p.Thr79Ala</b>	11	10	0,000289

Variante	Nº casos gnomAD	Nº casos latinos	MAF
<b>p.Arg123Cys</b>	3	3	0,0000269
<b>p.Tyr136His</b>	7	7	0,000208

Tabla 29. Análisis por poblaciones de las variantes probablemente patológicas más frecuentes.

#### 4.1.3. VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO.

Se han clasificado como de significado incierto 29 variantes. Las frecuencias más elevadas se encuentran para p.Arg5His y para p.Arg123His, con una prevalencia de 1:3.959 y 1:6.927 respectivamente. (MAF 0,000126 y 0,0000722) (Tabla 30)

Variante	N° alelos con esa variante	N° exomas estudiados	N° Homocigotos	Frecuencia alélica
<b>p.His4Leu</b>	1	123081	0	0,00000406
<b>p.Arg5Cys</b>	3	138566	0	0,0000108
<b>p.Arg5His</b>	35	138570	1	0,000126
<b>p.Leu8His</b>	1	123101	0	0,00000406
<b>p.Leu9Phe</b>	2	123098	0	0,00000812
<b>p.Gly13Arg</b>	1	123095	0	0,00000406
<b>p.Leu14Val</b>	1	123099	0	0,00000406
<b>p.Val17Ala</b>	1	123090	0	0,00000406
<b>p.Ser18Ala</b>	1	123091	0	0,00000406
<b>p.Pro22Leu</b>	1	15490	0	0,00003230
<b>p.Thr23Met</b>	7	123046	0	0,00002840
<b>p.Gly24Ser</b>	1	123117	0	0,00000406
<b>p.Gly24Asp</b>	1	123116	0	0,00000406
<b>p.Gly42Asp</b>	1	123117	0	0,00000406
<b>p.Ile46Val</b>	7	123120	0	0,00002840
<b>p.Asn47Ser</b>	7	138599	0	0,00002530
<b>p.His51Asn</b>	4	123118	0	0,00001620
<b>p.His51Pro</b>	1	123121	0	0,00000406
<b>p.Ala57Thr</b>	1	123123	0	0,00000406
<b>p.Ala57Asp</b>	2	123122	0	0,00000812
<b>p.Glu82Asp</b>	3	123111	0	0,00001220
<b>p.Leu102Pro</b>	1	123102	0	0,00000406
<b>p.Ser120Ala</b>	1	122574	0	0,00000408
<b>p.Arg123His</b>	20	138547	0	0,0000722

Tabla 30. Variantes del gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como variantes de significado incierto

Variante	Nº alelos con esa variante	Nº exomas estudiados	Nº Homocigotos	Frecuencia alélica
<b>p.Thr126Asn</b>	1	15487	0	0,0000323
<b>p.Ser137Thr</b>	1	123115	0	0,00000406
<b>p.Thr138Ile</b>	1	123112	0	0,00000406
<b>p.Asn144Ser</b>	2	123105	0	0,00000812
<b>p.Glu147Asp</b>	2	123093	0	0,00000812

Continuación tabla 30. Variantes del gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como variantes de significado incierto

#### 4.1.4. VARIANTES PROBABLEMENTE BENIGNAS.

La variante p.Asp119Asn, es la más frecuente de este grupo, con 9 casos encontrados y una prevalencia de 1:15.371 (MAF 0,0000325). El resto de variantes son p.Met33Thr, p.Gly121Asp y p.Ala128Val. (Tabla 31)

Variante	Nº alelos con esa variante	Nº exomas estudiados	Nº Homocigotos	Frecuencia alélica
<b>p.Met33Thr</b>	1	123126	0	0,0000041
<b>p.Gly121Asp</b>	2	122012	1	0,0000082
<b>p.Ala128Val</b>	1	15487	0	0,0000323
<b>p.Asp119Asn</b>	9	138343	0	0,0000325

Tabla 31. Variantes del gen *TTR* en gnomAD clasificadas como probablemente benignas.

#### 4.1.5. POLIMORFISMOS O VARIANTES BENIGNAS.

Se han estudiado una media de 136.834 exomas, entre los cuales el polimorfismo más frecuente es p.Gly26Ser, representando un 94.5% de los polimorfismos encontrados y con una frecuencia alélica de 0,0515. (Tabla 32)

Variante	Nº alelos con esa variante	Nº exomas estudiados	Nº Homocigotos	Frecuencia alélica
<b>p.Gly26Ser</b>	14283	138587	520	<b>0,0515</b>
<b>p.Asp94His</b>	13	138590	0	0,0000469
<b>p.His110Asn</b>	152	138574	0	0,000548
<b>p.Gly121Ser</b>	10	122896	0	0,0000407
<b>p.Arg124Cys</b>	15	138560	1	0,0000541
<b>p.Arg124His</b>	205	138537	2	0,00074
<b>p.Ala129Thr</b>	17	138582	0	0,0000613
<b>p.Ala129Val</b>	5	138590	0	0,000018
<b>p.Thr139Met</b>	406	138589	0	0,00147
<b>p.Lys146Arg</b>	88	138569	0	0,000318

Tabla 32. Variantes del gen *TTR* en gnomAD clasificadas como benignas.

## 4.2. ESTUDIO DE LOS CASOS DE AMILOIDOSIS ATTR EN NUESTRO MEDIO

### 4.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

Se han revisado 480 pacientes de los cuales 137 cumplían los criterios de inclusión, tres de estos rechazaron participar por lo que finalmente formaron parte del estudio 134 pacientes.

El grupo estudiado consta de 75 hombres y 59 mujeres con edades comprendidas entre 23 y 95 años ( $75,7 \pm 16,5$  años) del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, atendidos en el servicio de Medicina Interna o de Cardiología. De todos los pacientes, el 97,02% son de origen caucásico y el 2,98% africano.

Para establecer un diagnóstico de amiloidosis ATTR en aquellos pacientes en los que no se realizó biopsia, se siguió el algoritmo propuesto por Gillmore et al.(75)

Las principales pruebas que deben tenerse en cuenta son: gammagrafía con marcadores óseos junto con la existencia o no de proteína monoclonal en suero u orina o de cadenas ligeras.

De los 134 pacientes seleccionados en nuestro estudio, se observa que:

- La toma de muestra para biopsia se había llevado a cabo en un 12,69% de los pacientes (n=17) en los que se realizó biopsia de grasa subcutánea, siendo positiva tan sólo en 1 caso.
- El 39,55 % (53 pacientes) tenían gammagrafía ósea con Tc<sup>99</sup>-DPD, de los cuales fue positiva en 30 pacientes, siendo clasificados como amiloidosis cardiaca.
- La inmunofijación en sangre y orina se había realizado en 32 pacientes (23,88%) siendo positiva en 7.

Tras analizar retrospectivamente todos los datos de las pruebas realizadas a los 134; 32 pacientes fueron diagnosticados de amiloidosis cardiaca, de los cuales tras el resultado obtenido en el análisis genético se han podido dividir en 3 grupos: amiloidosis ATTRm, amiloidosis ATTRwt y amiloidosis cardiaca no filiada. Además de estos pacientes con amiloidosis cardiaca, se han hecho otros dos grupos: portadores de variantes en el gen *TTR* benignas y portadores asintomáticos de variantes patológicas. (Tabla 33).

Pruebas complementarias	Secuenciación gen <i>TTR</i>	Gammagrafía Tc <sup>99</sup> -DPD	Inmunofijación en sangre y orina	Número de casos
Diagnóstico				
<b>Amiloidosis ATTRm</b>	Positiva			4
<b>Amiloidosis ATTRwt</b>	Negativa	Positiva	Negativa	7
	Negativa	Positiva grado 2 o 3	No realizada	6
<b>Amiloidosis cardiaca no filiada</b>	Negativa	Positiva grado 1	No realizada	13
	Negativa	Positiva grado 2 o 3	Positiva	2

Tabla 33. Grupos en los que se ha dividido a los pacientes y requisitos que deben cumplir para ser incluidos en cada uno.

El porcentaje de cada uno de estos grupos se refleja en la figura 17. El grupo mayoritario está formado por los pacientes en los no se pudo llegar a un diagnóstico final por falta de pruebas complementarias y fueron incluidos en el grupo de amiloidosis cardiaca de origen no filiado, este grupo está formado por 15 pacientes

Entre los pacientes con diagnóstico, se observa el grupo amiloidosis ATTRwt con 13 pacientes y por otro lado 4 pacientes fueron diagnosticados de amiloidosis ATTRm.

En 7 pacientes se encontraron variantes benignas o polimorfismos, son variantes no causantes de enfermedad por lo que no pueden ser clasificados como amiloidosis ATTRm.

De los familiares de los pacientes diagnosticados de amiloidosis ATTRm, 3 de ellos son portadores sanos de una variante patológica. Son personas sanas a día de hoy, pero con un resultado positivo en la secuenciación Sanger del gen *TTR* por lo que pueden desarrollar la enfermedad en un futuro.

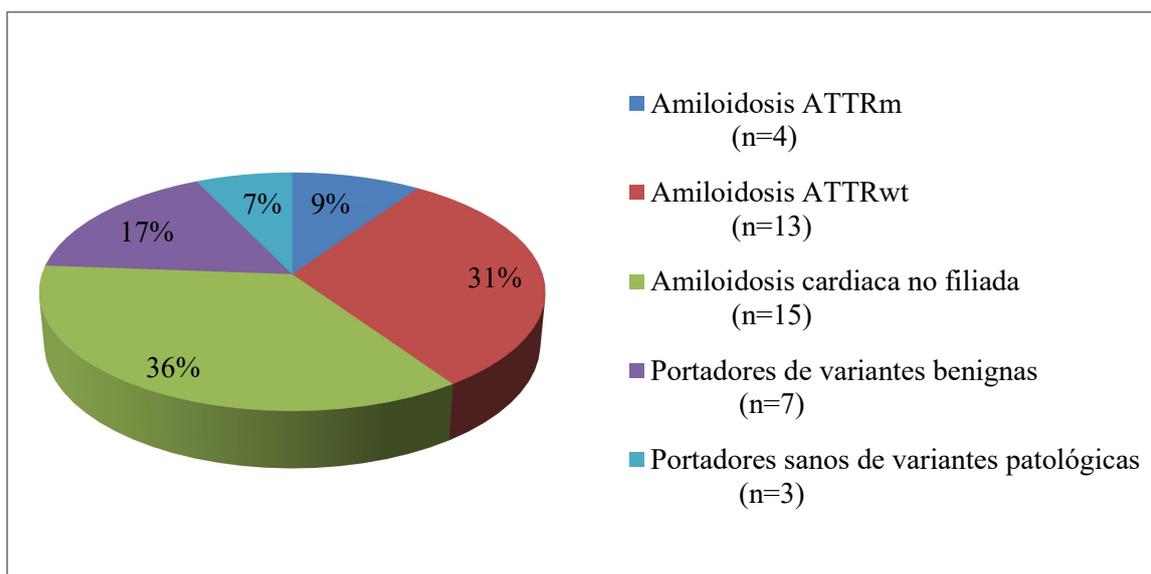


Figura 17. Descripción de pacientes con amiloidosis cardiaca y portadores de variantes en gen *TTR*.

La clínica y pruebas más significativas realizadas en los pacientes diagnosticados de amiloidosis cardiaca se recogen en la siguiente tabla. (Tabla 34).

AMILOIDOSIS		ATTRm (n=4)	ATTRwt (n=13)	CARDIACA NO FILIADA (n=15)
<b>Edad (años)</b>		78,66±17,09	83,8 ±3,99	85,75±4,64
<b>Sexo</b>	Masculino	0	12	13
	Femenino	4	1	2
<b>Síntomas cardiacos</b>		4	13	15
<b>Neuropatía</b>		1	2	0
<b>ACV</b>		2	0	0
<b>Túnel del carpo</b>		1	2	2
<b>Disautonomía</b>		0	4	1
<b>Insuficiencia Renal</b>		3	2	2
<b>Creatinina</b>		0,96±0,13	1,19±0,34	1,6±0,72
<b>Filtrado glomerular</b>		58,33±9,86	57,23±16,43	47,43±22,2
<b>Grosor septo interventricular</b>		14±2,82	14,14±2,81	13,66±1,54
<b>FEVI</b>	>50	3	7	3
	<50	1	3	1
<b>Péptido natriurético</b>		7597±1196	3663±3296	2355±1013
<b>Inmunofijación (realizada/positiva)</b>		3/0	7/0	2/2
<b>Gammagrafía (realizada/positiva)</b>		2/2	13/13	15/15
<b>Biopsia (realizada/positiva)</b>		3/1	3/0	0/0

Tabla 34. Descripción de los pacientes diagnosticados de amiloidosis cardiaca.

#### 4.2.2 VARIANTES GÉNICAS ENCONTRADAS

Tras realizar la secuenciación Sanger a todos los participantes del estudio, se obtuvieron 7 casos positivos para amiloidosis ATTR familiar, distribuidos en 3 familias. Además 7 de los pacientes presentaron polimorfismos.

A continuación, se describen las variantes génicas y los árboles genealógicos pertenecientes a las distintas familias estudiadas.

##### Familia número 1

La primera paciente presentaba en el exón 3 un cambio de una guanina por una citosina en la posición 220 (c.220G>C), lo que a nivel de proteína produce un cambio de glutámico por glutamina (p.Glu74Gln). El electroferograma resultante del análisis se observa en la figura 18.

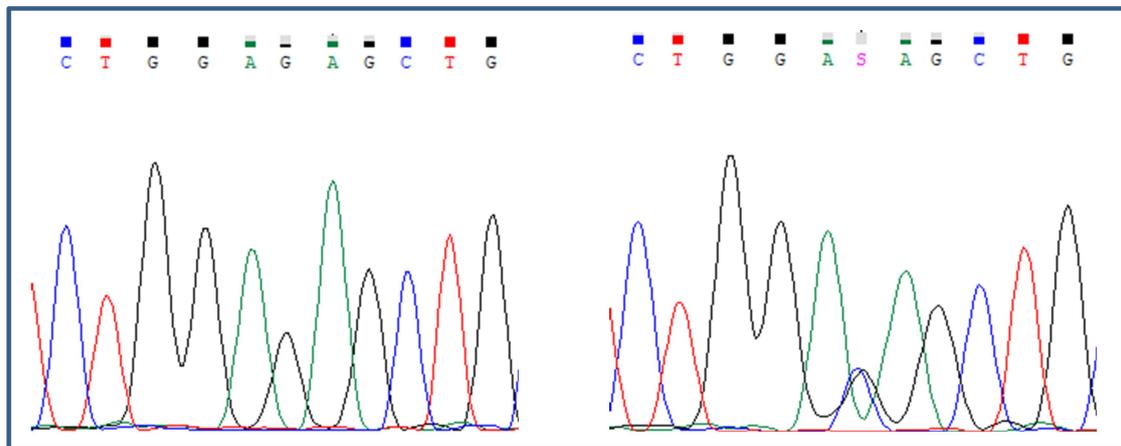


Figura 18 Secuenciación exón 3, resultado normal / Resultados paciente 1

La paciente de 46 años, procedente de Rumanía, sin antecedentes familiares de interés, presentaba una clara y agresiva sintomatología cardíaca y entre los antecedentes se puede resaltar síndrome de túnel de carpo bilateral. Ingresó por un cuadro de insuficiencia cardíaca descompensada.

A lo largo de su ingreso, se le realizaron numerosas pruebas complementarias hallando una miocardiopatía restrictiva en el ecocardiograma y sospecha de amiloidosis en la resonancia magnética cardíaca. Tras el correcto diagnóstico y debido al estado de la paciente, pasó a lista de espera para doble trasplante de corazón e hígado, pero falleció tras sufrir un ictus isquémico masivo.

Posteriormente, se realizó el estudio familiar (figura19). La paciente tenía dos hijos de los cuales, la hija también es portadora de la mutación, no presentando de momento sintomatología. Únicamente, cabe destacar, una polineuropatía de predominio sensitivo, tanto en manos como en pies, en fase incipiente en el electroneurograma realizado durante su seguimiento. Actualmente, se encuentra en seguimiento en consultas externas de medicina interna, sin tratamiento debido a la ausencia de manifestaciones clínicas. Por su parte el hijo no ha heredado la mutación.

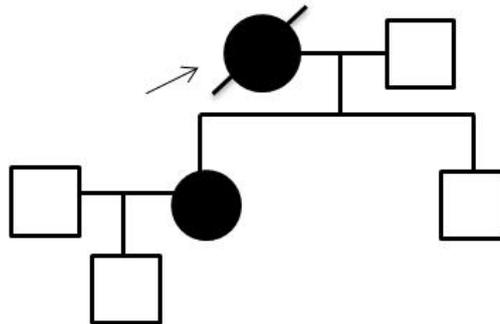


Figura 19. Árbol genealógico familia 1

## Familia número 2

El segundo caso detectado fue una paciente de 87 años, natural de la provincia de Zaragoza. Tras la secuenciación Sanger se detectó una mutación en heterocigosis, producida por un cambio en el exón 4 de guanina por adenina en la posición 424 (c.424G>A), lo que a nivel de proteína produce un cambio de valina por isoleucina en la posición 142 (p.Val142Ile). El electroferograma resultante del análisis se observa en la figura 20.

Esta paciente, con antecedentes médicos de HTA, fibrilación auricular e insuficiencia cardíaca, ingresó en nuestro hospital por presentar un cuadro de disnea de esfuerzo progresivo hasta hacerse de reposo.

En las pruebas complementarias realizadas, presentaba en un ecocardiograma una hipertrofia ventricular simétrica sugestiva de amiloidosis senil, con leve insuficiencia mitral y aórtica degenerativas con hipertensión pulmonar; valores de NT-proBNP elevados y PAAF de grasa abdominal negativa. Durante su ingreso, presentó un episodio de edema agudo de pulmón, y pese al tratamiento intensivo administrado, la paciente finalmente falleció.

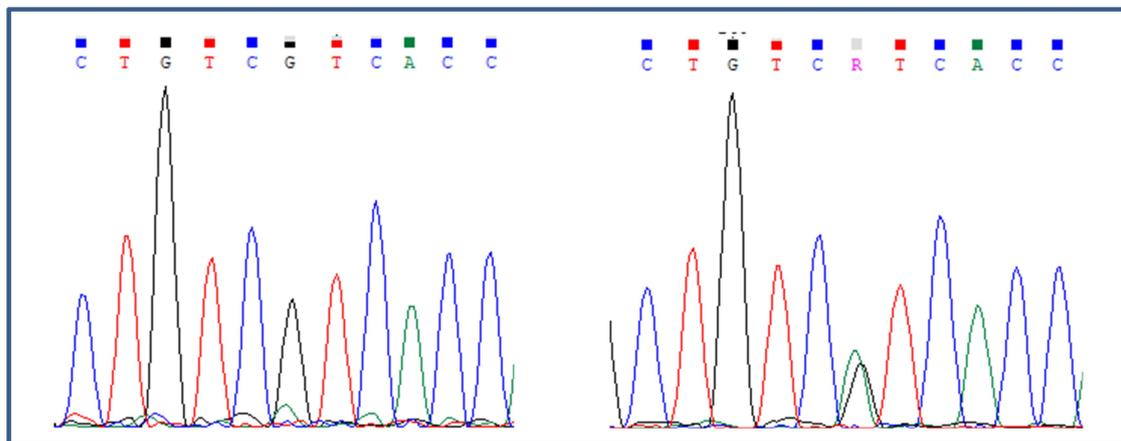


Figura 20. Secuenciación exón 4 resultado normal / Resultados paciente 2

En el transcurso del estudio, una de sus hermanas sufrió también un ingreso por sintomatología cardíaca, en contexto de estudio de síncope secundario a un bloqueo auriculoventricular completo e implantación de marcapasos. Fue incluida en el estudio y resultó ser también portadora de la mutación.

Tras hacer el estudio a los familiares de primer grado (figura 21), ha resultado positivo un sobrino de 42 años, actualmente asintomático y en seguimiento en consultas externas de Medicina Interna.

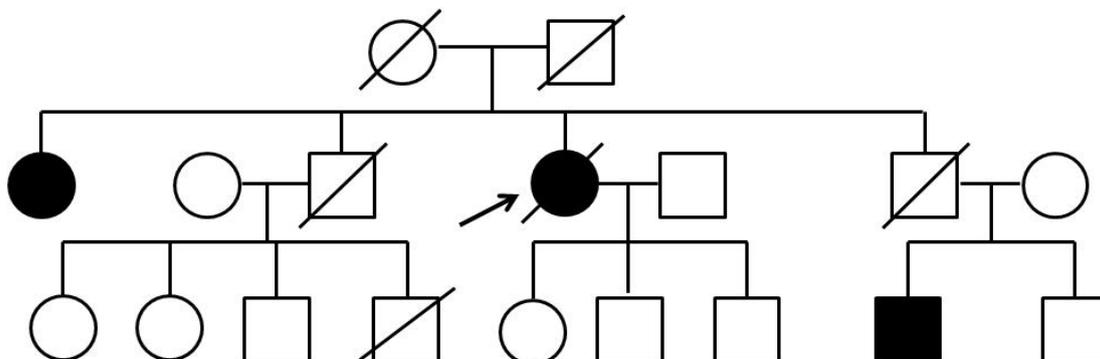


Figura 21. Árbol genealógico familia 2

### Familia número 3

Por último se ha diagnosticado de amiloidosis ATTR genética a una paciente de 59 años natural de Ghana, con antecedentes médicos de HTA, DM tipo 2, dislipemia, TEP crónico y fibrosis pulmonar. En las pruebas complementarias realizadas de forma ambulatoria se observó en un ecocardiograma transtorácico una miocardiopatía infiltrativa que tras la realización de RMN cardíaca sugiere como primera opción la de amiloidosis cardíaca

También se le realizó una gammagrafía miocárdica con difosfonato de tecnecio revelando una intensa captación en ambos ventrículos muy sugestiva de depósito por ATTR Además se le realizó una PAAF de grasa subcutánea que fue negativa para depósito amiloide

Los resultados del estudio genético concluyen que es portadora de la mutación c.424G>A (p.Val142Ile) en homocigosis. El electroferograma resultante del análisis se observa en la figura 22

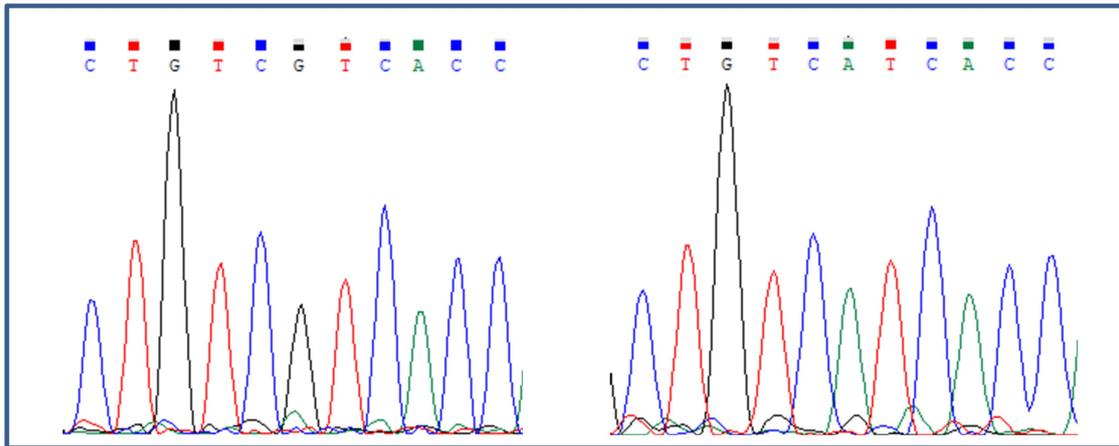


Figura 22. Secuenciación exón 4 resultado normal / Resultados paciente 3

La paciente fue citada a consultas externas de Medicina Interna junto a los familiares que viven en Zaragoza con ella, siendo posible realizar el estudio a una de sus hijas y a dos sobrinas (figura 23). Solo resultó ser portadora de la mutación en heterocigosis, su hija, resultando la secuenciación de las sobrinas normal.

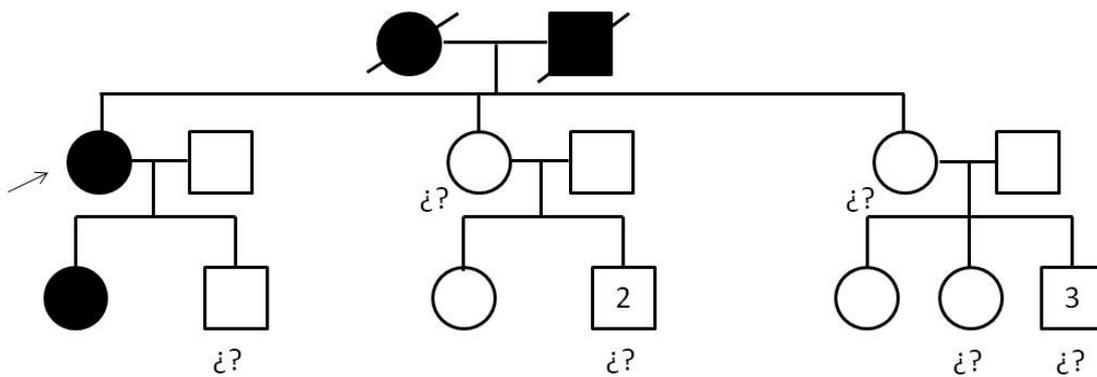


Figura 23. Árbol genealógico familia 3

## Polimorfismos

Además de estas mutaciones, 7 de los participantes en el estudio presentaron polimorfismos. En seis de ellos se ha detectado el polimorfismo c.76G>A (p.Gly26Ser), producido por un cambio en el exón 2 de una guanina por una adenina.

El otro polimorfismo encontrado en un paciente fue en el exón 4, c.416C>T, cambiando en la posición 139 treonina por metionina, p.Thr139Met. El electroferograma resultante del análisis se observa en la figura 24 y 25 respectivamente.

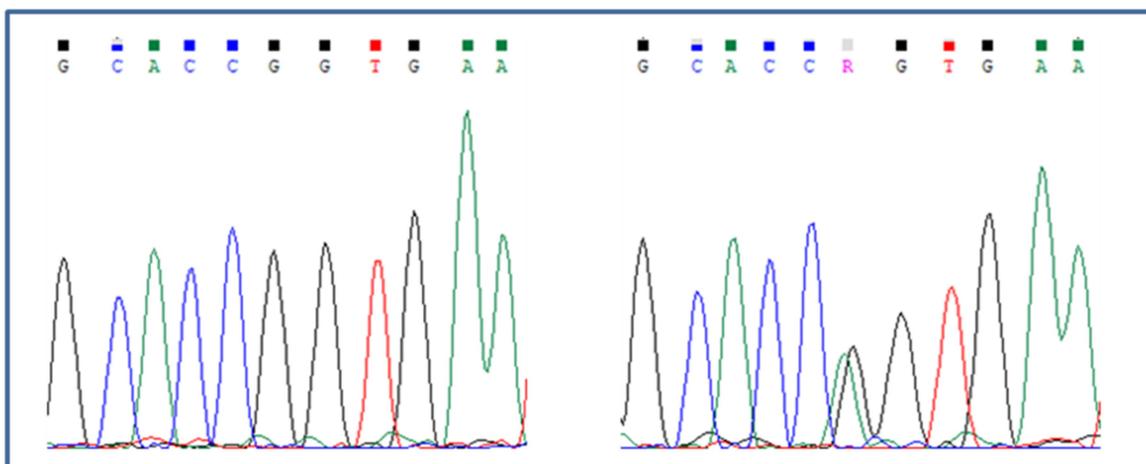


Figura 24. Secuenciación polimorfismo p.Gly26Ser.

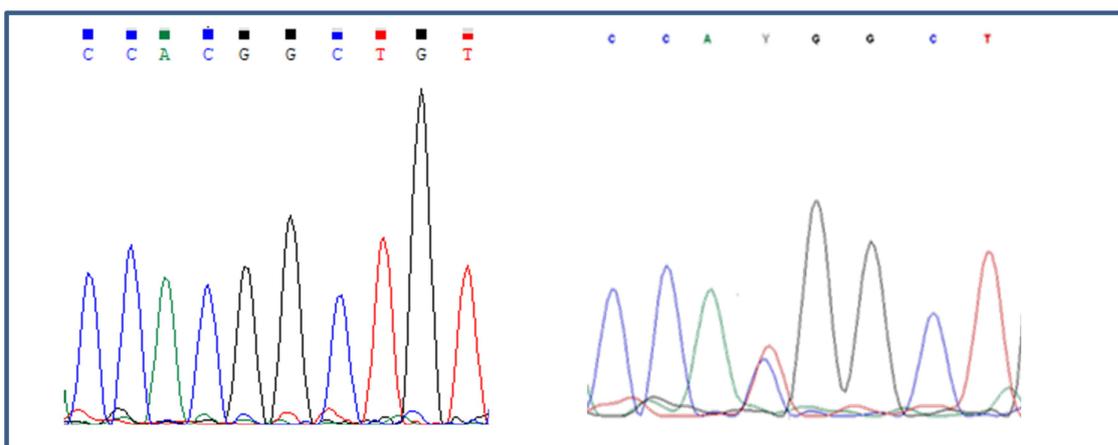


Figura 25. Secuenciación polimorfismo p.Thr139Met

### 4.3. RESULTADOS HRMA

Para llevar a cabo la puesta a punto y validación de la técnica HRMA, hemos utilizado las muestras de los pacientes estudiados en el apartado anterior. Los participantes en el estudio con resultado de secuenciación negativo, han formado el grupo control y los participantes diagnosticados de amiloidosis ATTR familiar o portadores de polimorfismo han sido utilizados como controles positivos.

Tras el reclutamiento de pacientes, se disponía de mutaciones y polimorfismos en todos los exones del gen *TTR* (exón 2, 3 y 4) excepto en el exón 2 en el que no hemos encontrado ninguna mutación. En este exón se encuentra la mutación p.Val50Met, es la mutación más prevalente en la población representando más del 75% de los pacientes de ATTR genética en nuestro país, por su importancia era de gran importancia disponer de un paciente con esta mutación para la validación del HRMA por lo que se solicitó una muestra como se recoge en el apartado de material y métodos. En la tabla 35 se detallan todas las muestras analizadas por HRMA.

Control	Muestras	Exón validado	Variante Validada
<b>Control negativo</b>	Pacientes negativos en secuenciación Sanger	Exones 2, 3 y 4	TTR Wild Type
<b>Control positivo</b>	Pacientes positivos en secuenciación Sanger	Exón 2	p.Gly26Ser p.Val50Met
		Exón 3	p.Glu74Gln
		Exón 4	p.Thr139Met p.Val142Ile

Tabla 35 Análisis de Datos y Validación con la tecnología Sanger

El análisis de los datos de amplificación y la especificidad del producto se realizó con el programa LightCycler 480 específico de la plataforma que lleva el mismo nombre y el análisis de curva de disociación de alta resolución mediante el módulo Gene Scanning.

El proceso global se ha monitorizado gracias a la variación de fluorescencia que se va produciendo en cada momento como se observa en la figura 26.

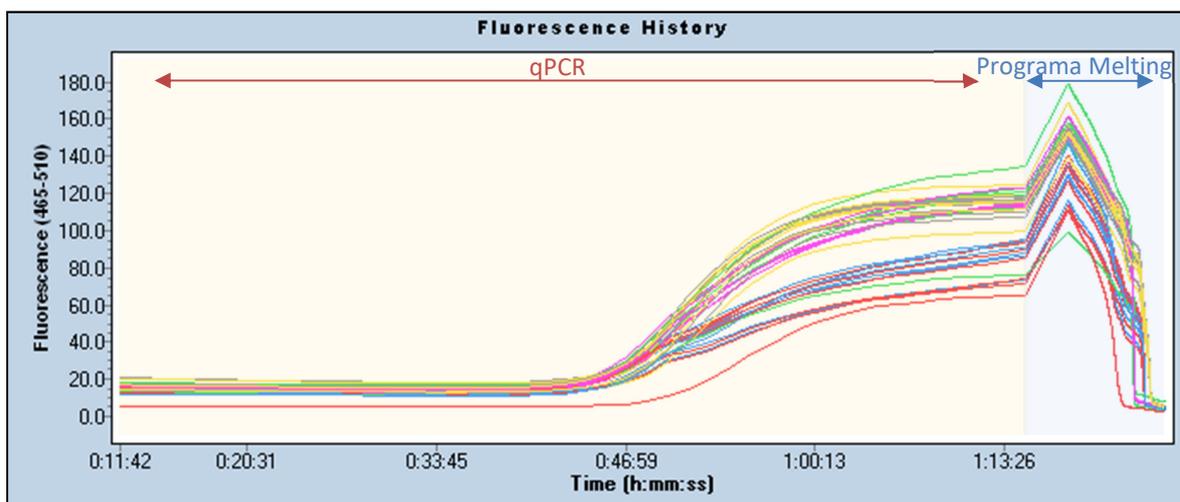


Figura 26. Representación global del programa de HRMA. Se observa la amplificación qPCR seguida del programa de melting.

En la gráfica se pueden diferenciar dos partes:

- En la primera parte se produce la amplificación de la secuencia estudiada, mediante qPCR. Ésta a su vez se subdivide en:
  - Línea base: es el nivel basal o background de fluorescencia durante los primeros ciclos de amplificación. En esta etapa no se detecta aumento de fluorescencia ya que no hay un incremento significativo en la cantidad de ADN sintetizado.
  - Fase exponencial y lineal, en la que la cantidad de producto de PCR se duplica cada ciclo. Es donde se produce una mayor amplificación de ADN lo cual queda reflejado en el aumento que se observa de fluorescencia.

- Fase no exponencial o de meseta, producida por el consumo de alguno de los componentes necesarios para la amplificación. En este punto la reacción se ralentiza y entra en la fase de meseta, no observándose aumento significativo de fluorescencia.
- En la segunda parte se realiza el programa de melting. Una vez amplificada la región de interés, se somete a una variación de temperatura. En primer lugar se lleva a la muestra a hasta 95 °C con el objetivo de que las secuencias amplificadas se desnaturalicen, posteriormente se va disminuyendo la temperatura y se van formando los heteroduplex registrándose un aumento de fluorescencia como se observa en la gráfica y por último se procede a ir aumentando la temperatura para que los heteroduplex vayan deshibridándose según su longitud y composición, con lo que la fluorescencia registrada va disminuyendo como se refleja en la parte final de la gráfica.

#### 4.3.1. RESULTADOS EXÓN 2.

En la figura 27, se observa el proceso global de amplificación del exón 2. Como se ha comentado en la figura 26, se observa una forma sigmoidea en la cual se diferencian tres partes: línea basal, fase exponencial y por último se alcanza la fase de meseta terminándose así la reacción. Permite comprobar que la amplificación de las muestras tras la PCR ha sido adecuada. Todas las muestras amplificadas dieron valores de  $C_p < 30$ . Además, entre las muestras, el valor de  $C_p$  no varía más de 5 unidades.

A continuación, en la figura 28 se representa el programa de melting del exón 2, se observan las muestras analizadas de una manera global. Se puede observar dos picos de pequeño tamaño con una temperatura de melting a 75,8 y 79,6 °C, estos se deben a productos inespecíficos como pueden ser dímeros de primers. Posteriormente observamos un pico mayor con una temperatura de melting a 87,0 °C. Este pico es producido por los productos de ADN de interés.

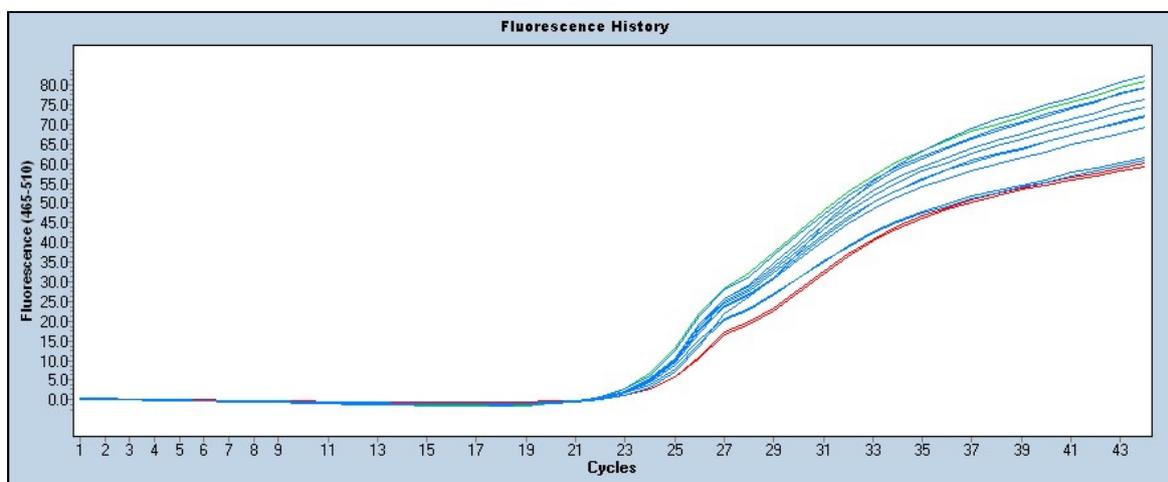


Figura 27. Registro de fluorescencia exón 2. Muestras azules: wild type; Rojas, polimorfismo p.Gly26Ser y Verde mutación patológica p.val50Met.

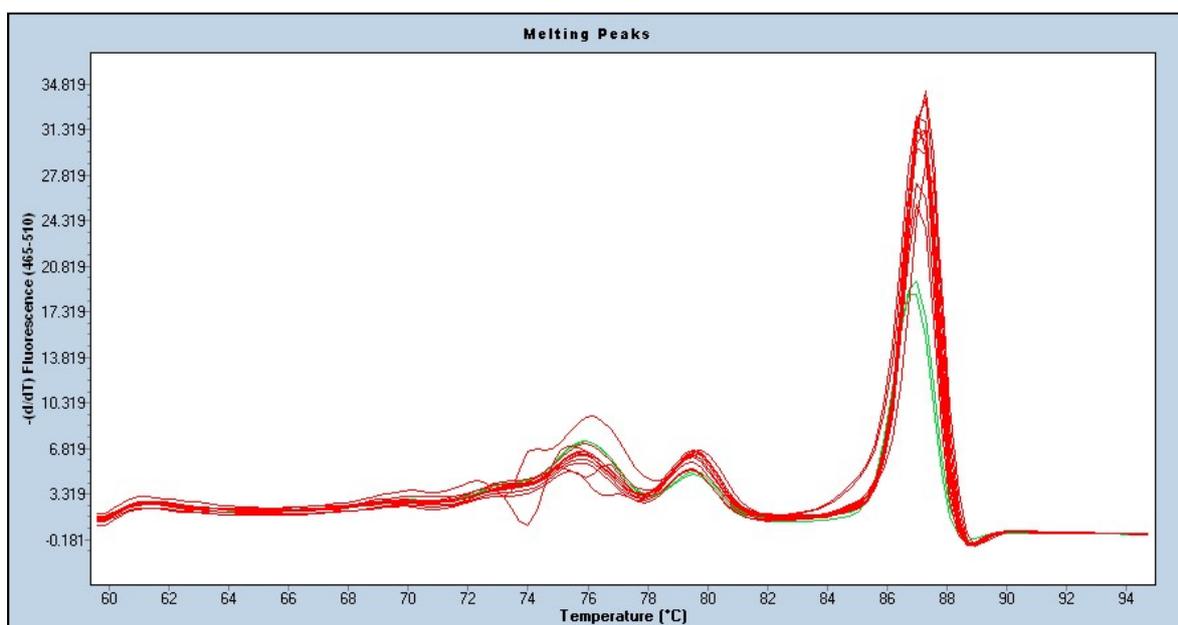


Figura 28. Programa Tm Calling. Curva de melting exón 2.

La aplicación Gene Scanning analiza las curvas de disociación de la siguiente manera:

- **Normalización.**  
Asigna el rango de fluorescencia entre 100% y 0% a todas las muestras. Partiendo de los datos crudos de curvas de disociación, se establecen los valores de fluorescencias inicial o “pre-melt” (84,5 °C) y final o post-melt” (89 °C) de todas las muestras. (Figura 29). Con esto se elimina diferencias en la fluorescencia de fondo y se aumenta la capacidad de detectar diferencias sutiles en los perfiles de fusión.
- **Temperature Shift.**  
Las curvas de melting se superponen sobre el mismo rango de temperaturas. Se mueven las curvas normalizadas a lo largo del eje de temperaturas, para equiparar el punto en el cual el ADN en cada muestra está totalmente desnaturalizado. (Figura 30)
- **Difference Plot.**  
Gráfico generado a partir de la diferencia relativa de señal de fluorescencia. Es en la gráfica en la que se muestra de forma más clara las diferencias en la forma de las curvas de disociación entre las muestras. En este resultado del exón 2 se observan todas las muestras negativas en color azul en una línea base; por otro lado y con un patrón totalmente diferente, muestras positivas, es decir aquellas con una variante en su secuencia de ADN. Por un lado en verde se observa el comportamiento de la muestra con la mutación p.Val50Met y en rojo las muestras con el polimorfismo p.Gly26Ser. (Figura 31)

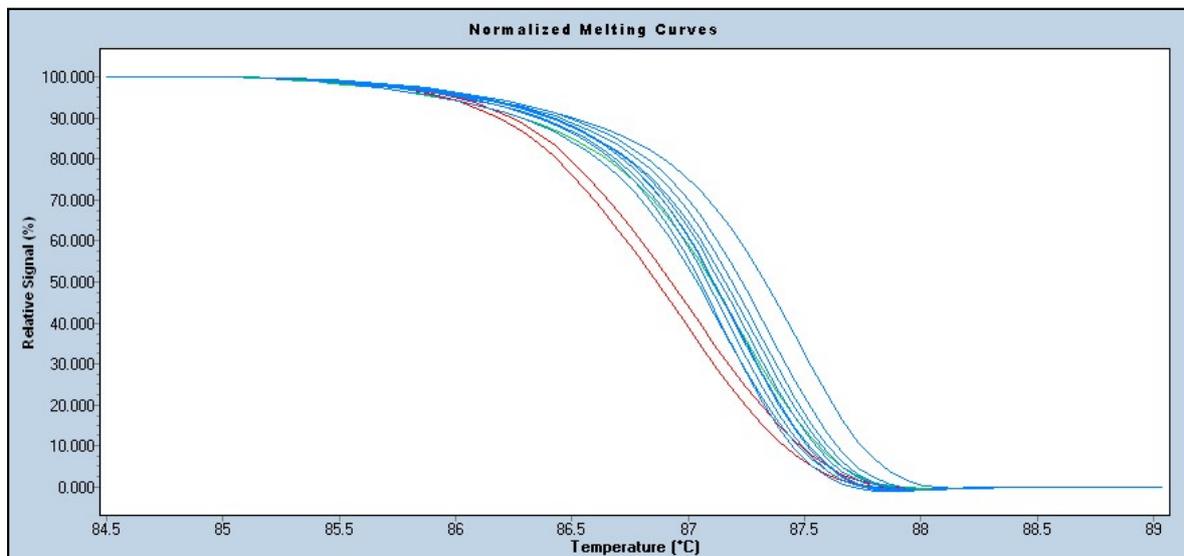


Figura 29. Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 2. Muestras azules: wild type; Rojas, polimorfismo p.Gly26Ser y Verde mutación patogénica p.Val50Met.

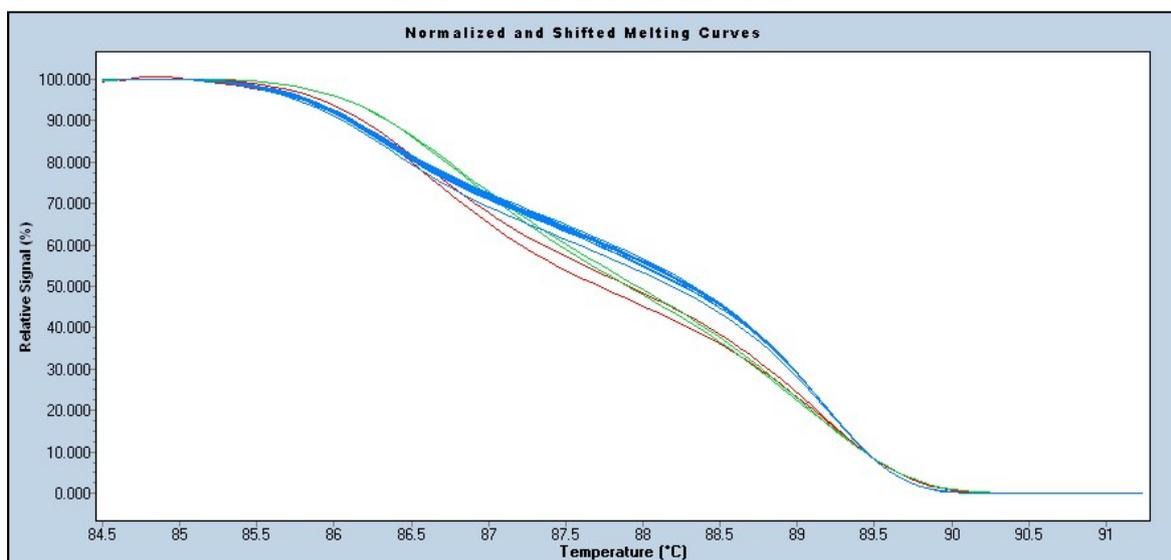


Figura 30. Gene Scanning. Gráfica Temperature Shift Exón 2. Muestras azules: wild type; Rojas, polimorfismo p.Gly26Ser y Verde mutación patogénica p.Val50Met.

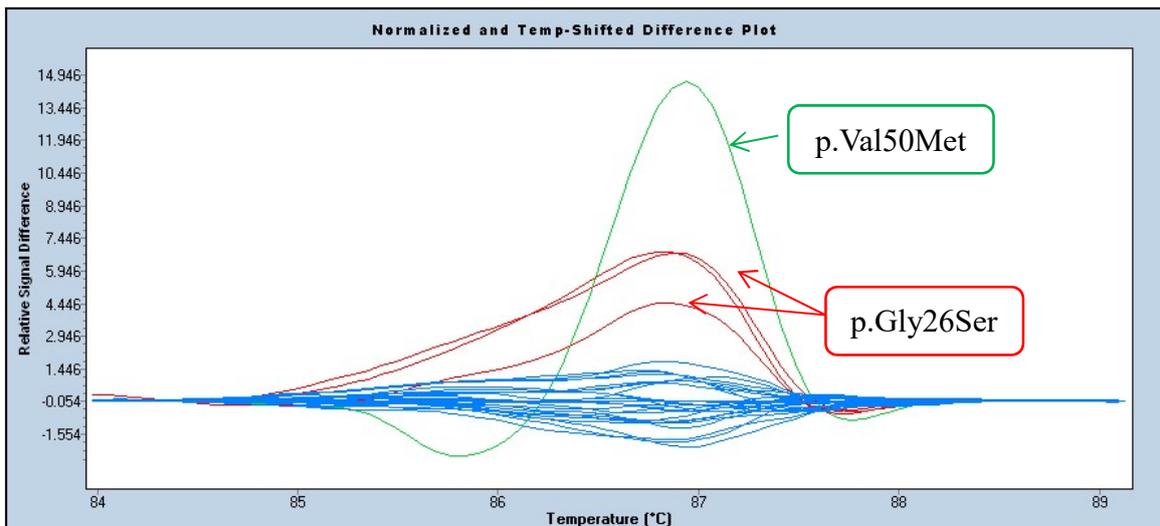


Figura 31. Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 2. Muestras azules: wild type; Rojas, polimorfismo p.Gly26Ser y Verde mutación patogénica p.val50Met.

- **Validación.**

En el exón 2 la concordancia con la secuenciación Sanger ha sido del 100%. Todas las muestras clasificadas como negativas en HRMA, eran negativas tras la secuenciación. Lo mismo con las muestras positivas, todas las muestras positivas en HRMA eran muestras que presentaban un cambio de base en una de las posiciones de la secuencia de ADN. Al secuenciar estas muestras se pudo determinar que pertenecían al paciente con la mutación p.Val50Met y a la variante p.Gly26Ser respectivamente.

#### 4.3.2. RESULTADOS EXÓN 3

El proceso global de amplificación del exón 3 puede observarse en la figura 32. En este caso también se observa una forma sigmoidea en la cual se diferencian tres partes: línea basal, fase exponencial y por último se alcanza la fase de meseta. El Cp ha sido menor de 30, lo que es indicativo de que hay una cantidad de muestra apropiada y que la amplificación se ha realizado correctamente. Además, entre las muestras, el valor de Cp no varió más de 5 unidades.

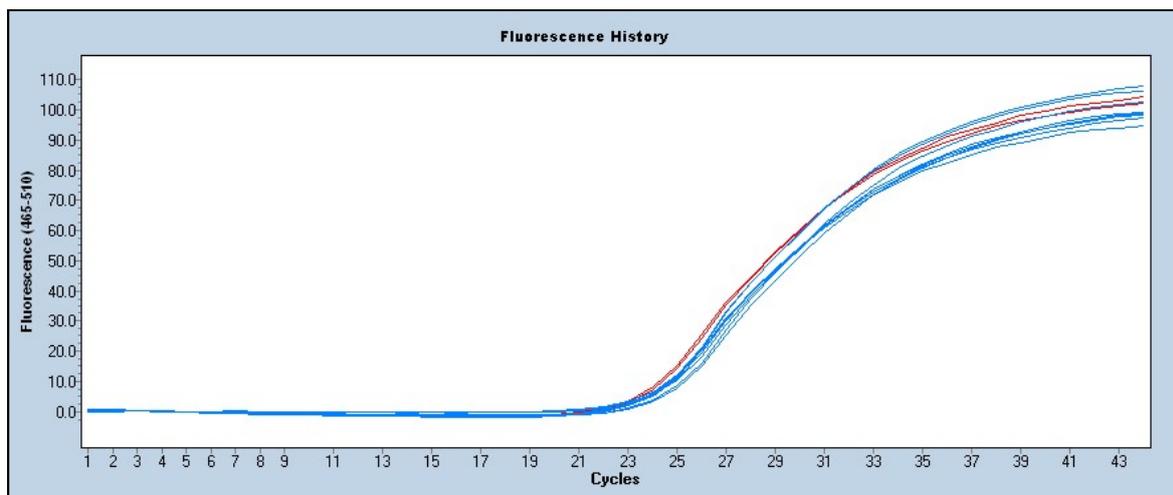
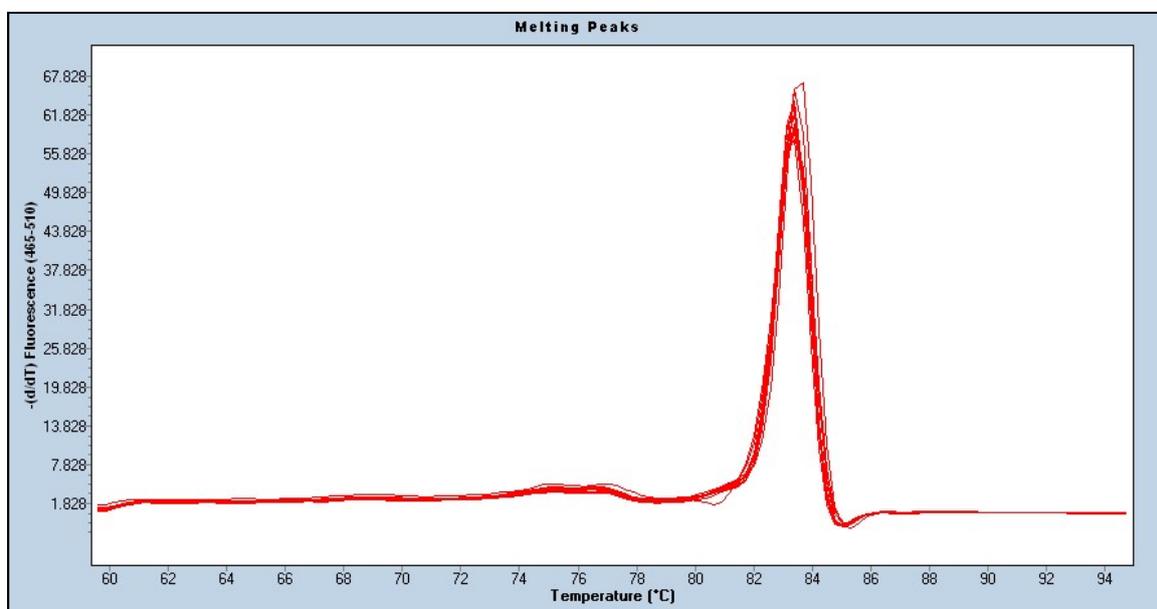


Figura 32. Registro amplificación exón 3

En la figura 33 se representa la curva de melting realizada tras la amplificación del exón 3. Se observa un pico, correspondiente a las muestras analizadas, con una  $T_m$  de 83,4 °C.

Figura 33. Programa  $T_m$  Calling. Curva de melting exón 3.

Los siguientes pasos en el análisis de resultados con aplicación Gene Scanning han sido:

- **Normalización.**

Se asigna el rango de fluorescencia entre 100% y 0% a todas las muestras. (Figura 34) previa identificación de las áreas con una intensidad de fluorescencia de fusión previa y posterior a la curva de melting. En este caso estas áreas corresponden a las temperaturas 81,4 °C y 85,6 °C.

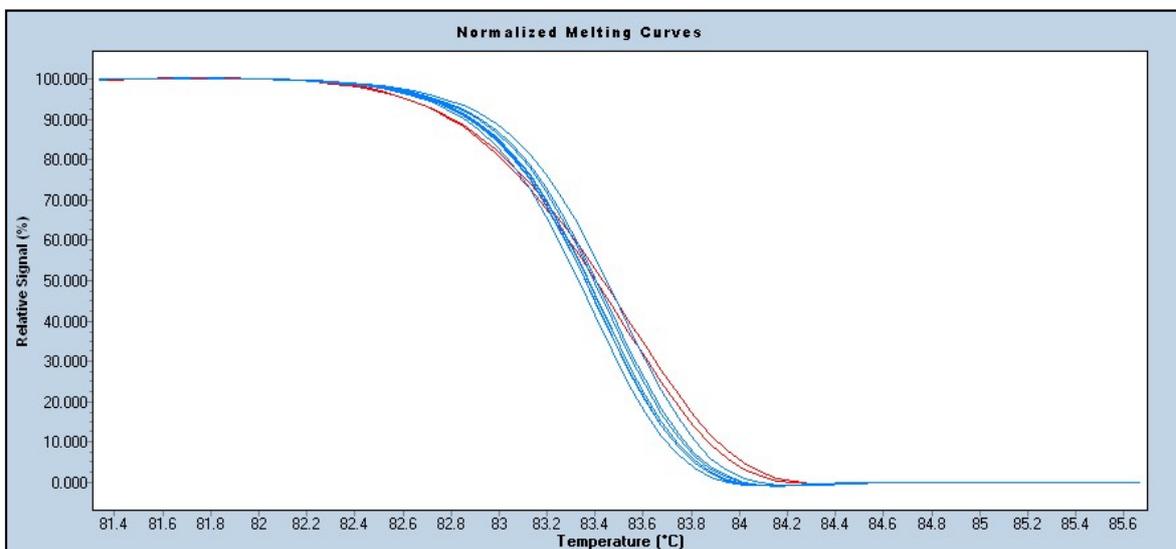


Figura 34. Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 3. En azul se observan las muestras wild type, en rojo la muestra con mutación p.Glu74Gln por duplicado.

- **Temperature Shift.**

Las curvas de melting se superponen sobre el mismo rango de temperaturas para equiparar el punto en el cual el ADN en cada muestra está totalmente desnaturizado (señal negativa de fluorescencia). (Figura 35)

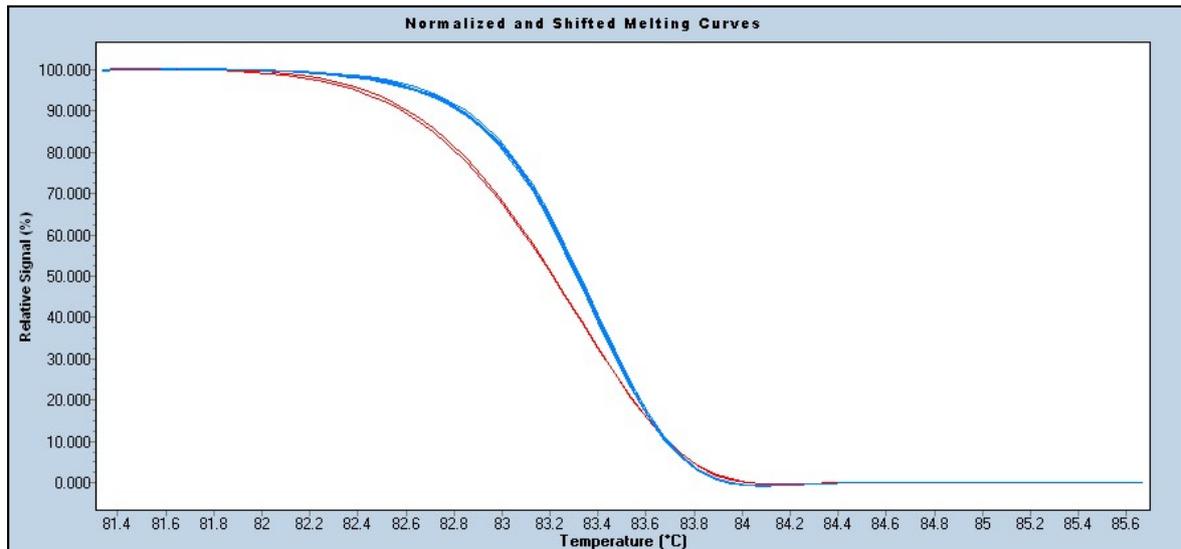


Figura 35. Gene Scanning. Temperature Shift exón 3. En azul; muestras wild type; en rojo muestra con mutación p.Glu74Gln por duplicado

- **Difference Plot.**

Gráfico generado a partir de la diferencia relativa de señal de fluorescencia. Es en la gráfica en la que se analizan los resultados, muestra de forma más clara las diferencias en la forma de las curvas de disociación entre las muestras. En el exón 3 se han encontrado 2 perfiles de curvas distintos (Figura 36): uno para las secuencias wild type (azul) y otro para la mutación p.Glu74Gln (rojo).

- **Validación.**

Para la validación de los resultados, se compararon con los resultados obtenidos en la secuenciación Sanger anteriormente realizada. Se obtuvo una concordancia del 100%, en ningún caso se obtuvieron falsos negativos, y las muestras que en HRMA mostraron una curva positiva, fueron las muestras portadoras de la mutación p.Glu74Gln.

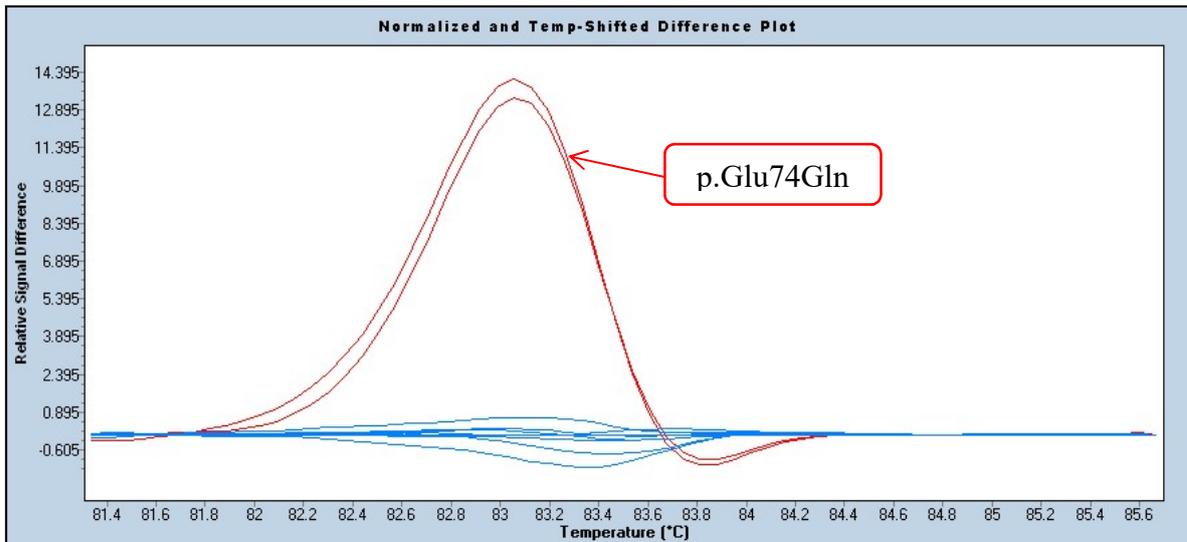


Figura 36. Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 3. En azul; muestras wild type; en rojo muestra con mutación p.Glu74Gln por duplicado

### 3.4.3. RESULTADOS EXÓN 4.

En el siguiente gráfico (figura 37), se observa el proceso global de amplificación del exón 4. Se observa una forma sigmoidea en la cual se diferencian la línea basal, fase exponencial y por último se alcanza la fase de meseta. El  $C_p$  fue menor de 30 y no varió más de 5 unidades. Lo que quiere decir que hay una cantidad de muestra apropiada y que la amplificación se ha realizado correctamente.

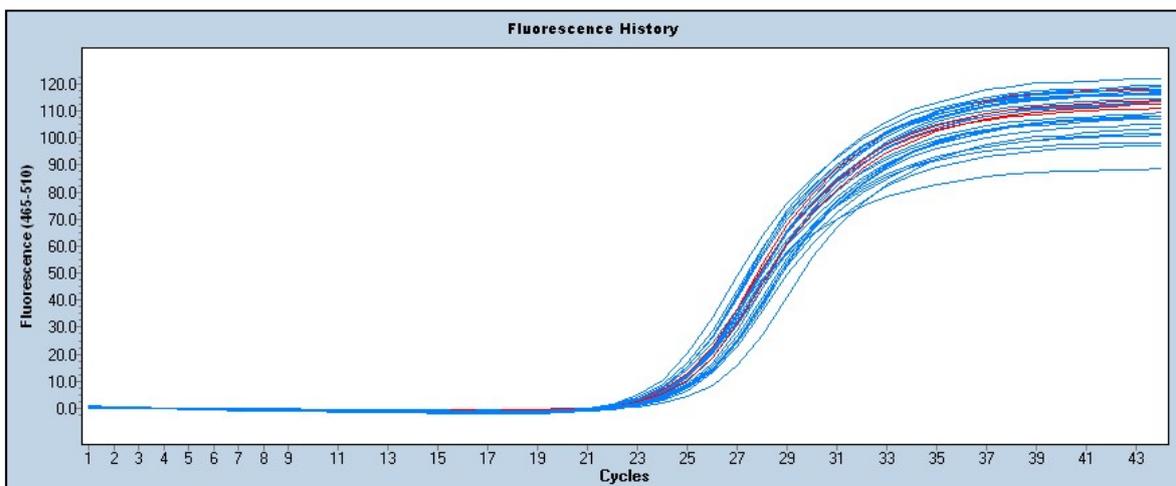


Figura 37. Registro amplificación exón 4

Al analizar la curva de melting (figura 38) se observa en primer lugar un pequeño pico, correspondiente a productos inespecíficos como pueden ser parejas de primers. Posteriormente aparecen 2 picos, a 86,6 °C y 89 °C. Estas dos zonas de melting se deben a las características de composición de la secuencia de nucleótidos amplificados. El comportamiento de desnaturalización térmica del ADN depende de la composición de bases; tanto del contenido en guaninas y citosinas como de la distribución de los nucleótidos.

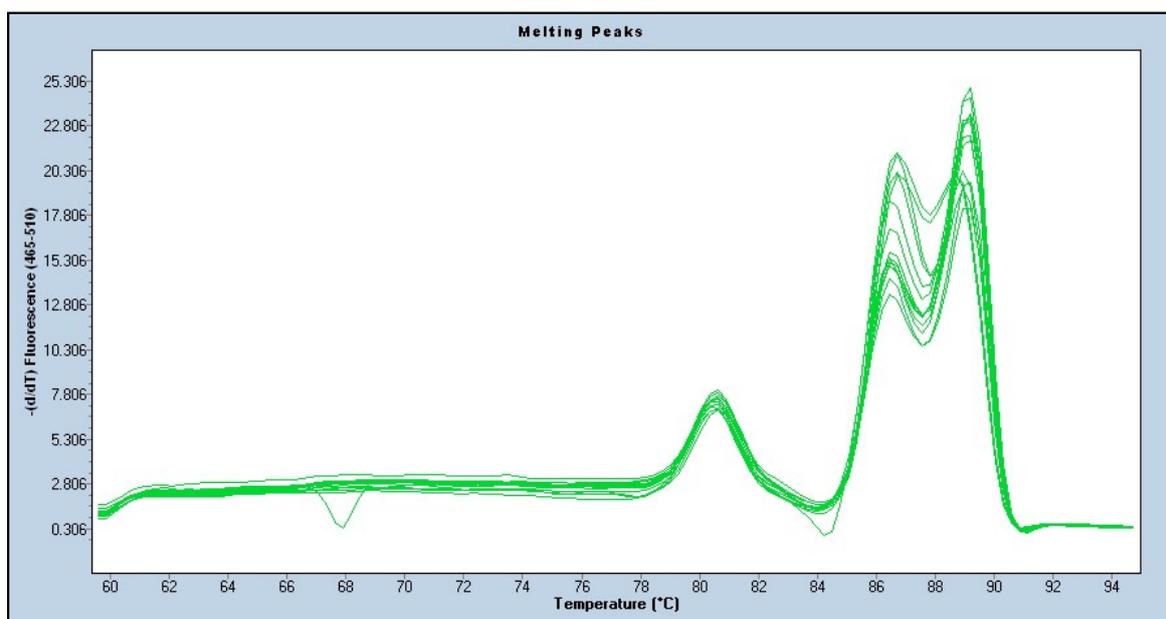


Figura 38. Programa Tm Calling. Curva de melting exón 4

A continuación, se analizan las curvas de disociación con la aplicación Gene Scanning:

- **Normalización.**

Asigna el rango de fluorescencia entre 100% y 0% a todas las muestras (Figura 39). Se establecen los valores de fluorescencias inicial (83,5 °C) como el 100% de la señal relativa y a la fluorescencia final (91,5 °C) se asigna el 0%.

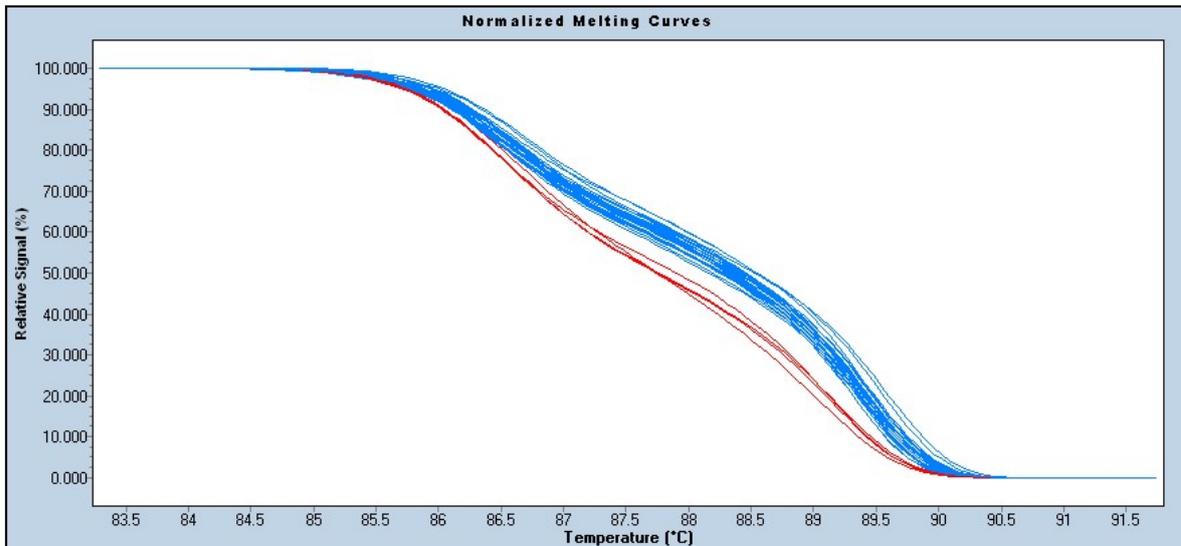


Figura 39. Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 4. Color azul, muestras wild type; color rojo muestras p.Val1442Ile en heterocigosis y p.Thr139Met.

- **Temperature Shift.**

Las curvas de melting se superponen sobre el mismo rango de temperaturas (figura 40). Con esto se equiparan los puntos en los cual el ADN en cada muestra está totalmente desnaturalizado.

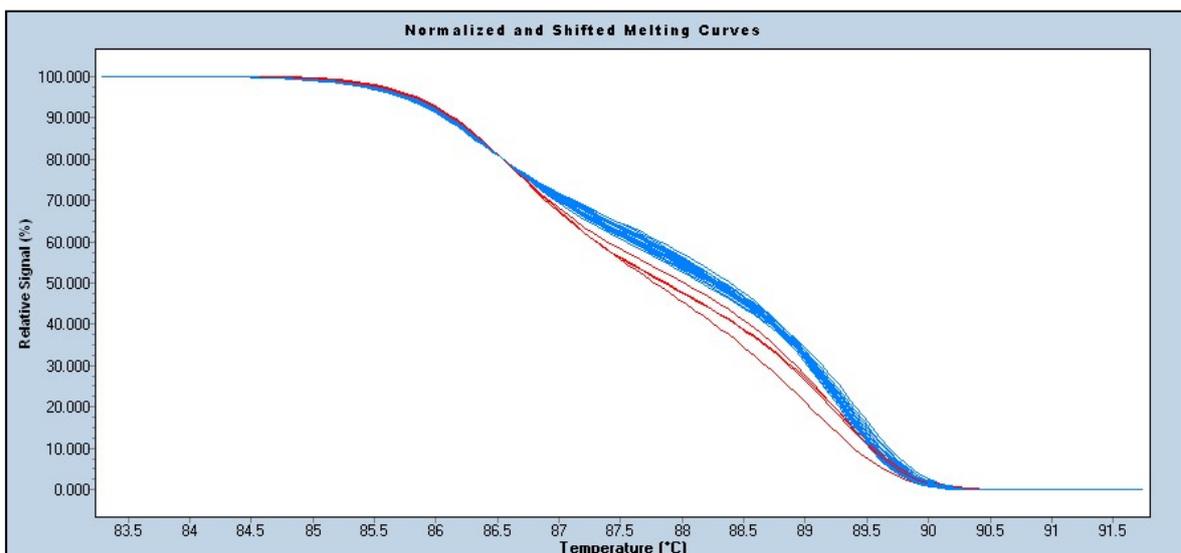


Figura 40. Gene Scanning. Temperature Shift exón 4. Color azul, muestras wild type; color rojo muestras p.Val1442Ile en heterocigosis y p.Thr139Met.

- **Difference Plot.**

Gráfico generado a partir de la diferencia relativa de señal de fluorescencia (figura 41). Es en la gráfica en la que se muestra de forma más clara las diferencias en la forma de las curvas de disociación entre las muestras. En este resultado del exón 4 se observan tres patrones de curvas distintos: todas las muestras negativas se representan en color azul en la línea base; por otro lado y con un patrón totalmente diferente, muestras positivas, que corresponden con el polimorfismo p.Thr139Met y la mutación p.Val142Ile en heterocigosis.

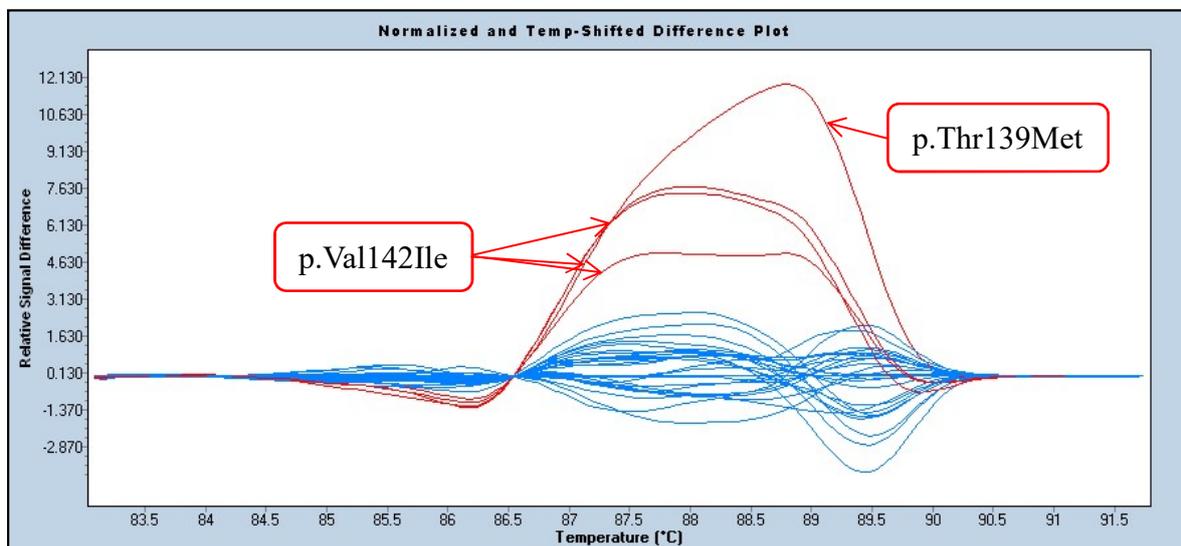


Figura 41. Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 4. Color azul, muestras wild type; color rojo muestras p.Val142Ile en heterocigosis y p.Thr139Met.

- **Validación.**

La concordancia con la secuenciación también es de 100% en este exón. Todos los resultados de las muestras analizadas por HRMA se compararon con los resultados de la secuenciación. Se han clasificado correctamente todas las muestras de pacientes cuya secuenciación fue normal. Por otro lado se confirmó que las muestras clasificadas como positivas en HRMA pertenecían a los pacientes portadores de las variantes p.Thr139Met y p.Val142Ile en heterocigosis.

### 3.4.3.1. Exón 4, resultados de la variante en homocigosis.

Vamos a analizar las curvas de disociación del grupo de pacientes entre los que se incluye el paciente con una variante en homocigosis.

- Normalización.

Asigna el rango de fluorescencia entre 100% y 0% a todas las muestras (figura 42). Se establecen los valores de fluorescencias inicial (83,5 °C) como el 100% de la señal relativa y a la fluorescencia final (91 °C) se asigna el 0%.

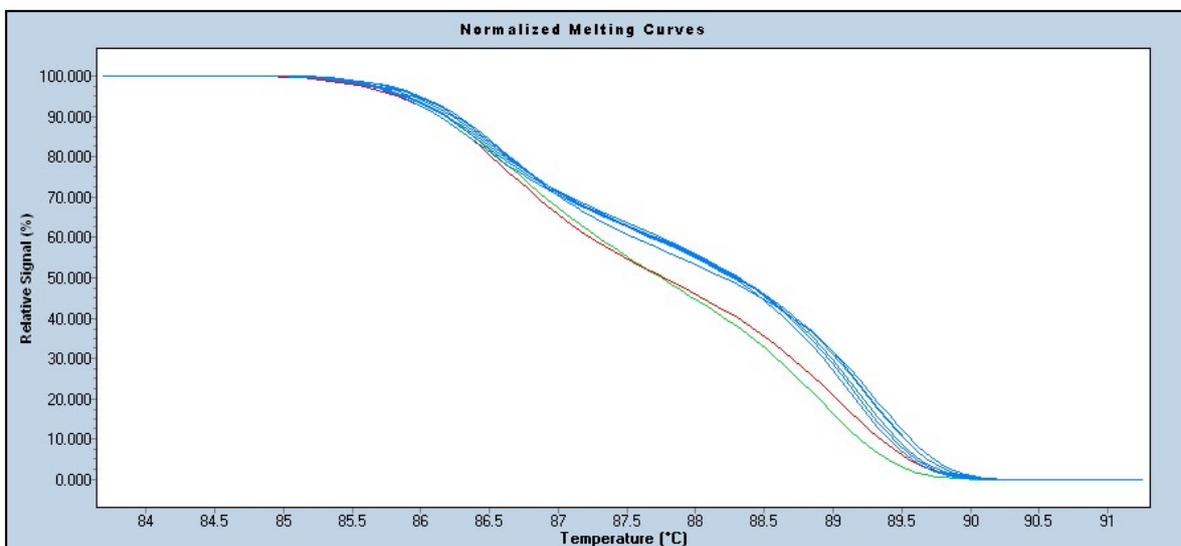


Figura 42. Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 4. Color azul, muestras wild type; color verde muestra p.Val142Ile en heterocigosis y color rojo muestra p.val142Ile en homocigosis.

- Temperature Shift.

Las curvas de melting se superponen sobre el mismo rango de temperaturas (figura 43). Con esto se equiparan los puntos en los cual el ADN en cada muestra está totalmente desnaturalizado.

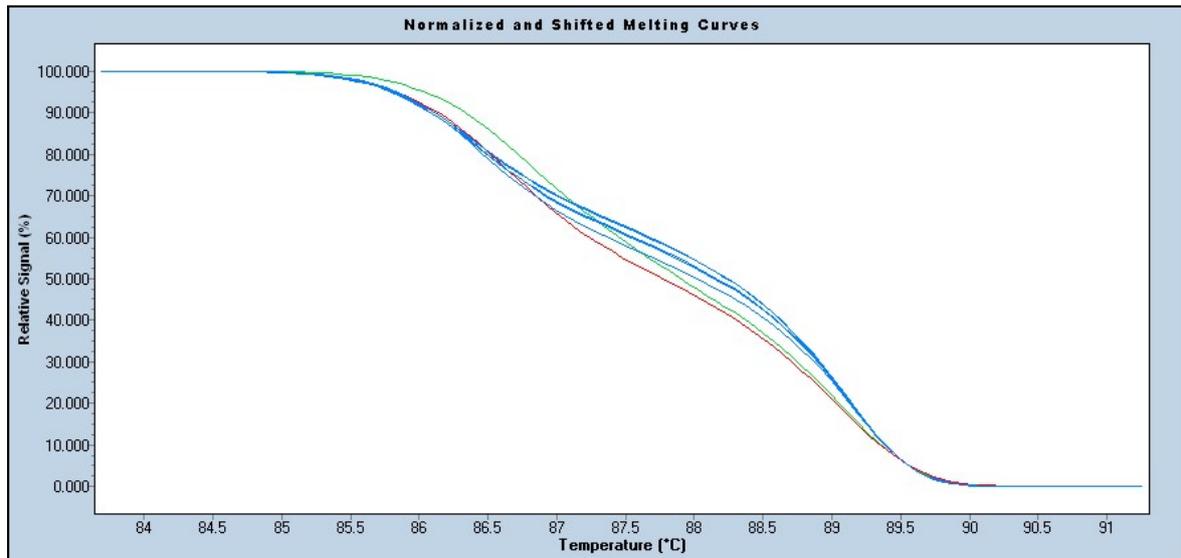


Figura 43. Gene Scanning. Temperature Shift exón 4. Color azul, muestras wild type; color verde muestra p.Val142Ile en heterocigosis y color rojo muestra p.val142Ile en homocigosis

- **Difference Plot.**

Gráfico generado a partir de la diferencia relativa de señal de fluorescencia (figura 44). En este resultado del exón 4 se observan tres patrones de curvas: todas las muestras negativas se representan en color azul en la línea base y con un patrón totalmente diferente, muestras positivas, que corresponden con p.Val142Ile en heterocigosis y la mutación p.Val142Ile en homocigosis.

- **Validación.**

En todos los casos la técnica HRMA ha mostrado los mismos resultados que los obtenidos por secuenciación (correlación del 100%). En todas las muestras analizadas se ve claramente como el grupo control (n=106) sigue un patrón diferente a aquellos pacientes con una variante en el exón estudiado, diferenciándose claramente tanto las variantes en heterocigosis como en homocigosis.

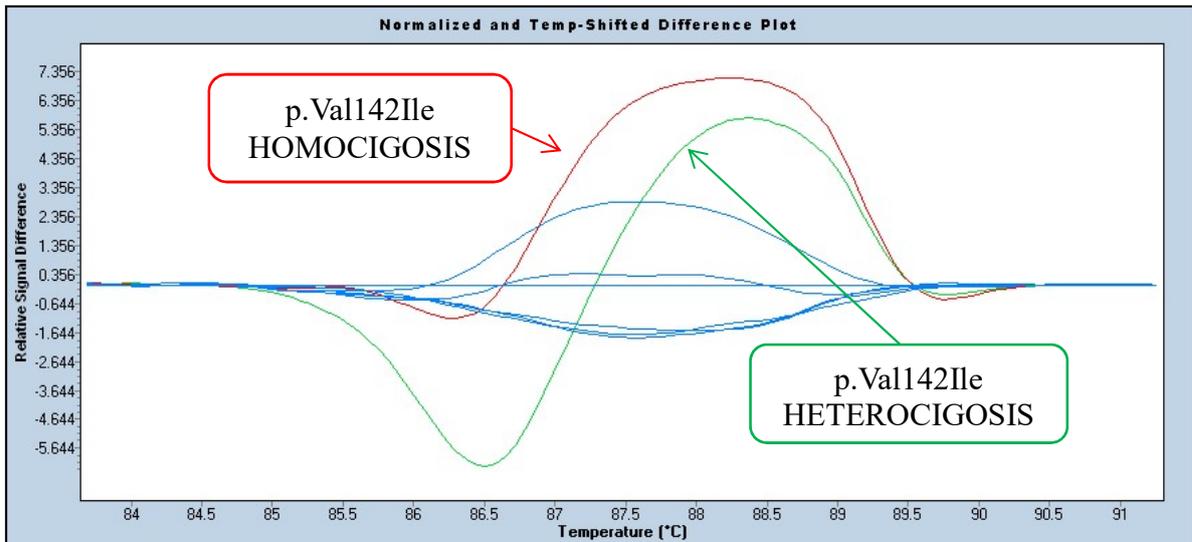


Figura 44. Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 4. Color azul, muestras wild type; color verde muestra p.Val142Ile en heterocigosis y color rojo muestra p.val142Ile en homocigosis

#### 4.4 DETECCIÓN DE PROTEÍNA EN SUERO POR ISOELECTROENFOQUE

Para la detección de proteína mutada en suero, nos hemos centrado en la paciente portadora de la mutación p. Glu74Gln.

En la tabla 36 se observa como la diferencia entre la proteína wild type y la variante p.Glu74Gln se encuentra en el punto isoeléctrico y no en el peso molecular.

	TTR Wild Type	TTR p. Glu74Gln
Peso molecular monómero	13,74 KDa	13,74 KDa
Peso molecular tetramero	54,96 KDa	54,96 KDa
Punto Isoeléctrico	5,314	5,479

Tabla 36. Peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas analizadas por IEF.

Tras la realización del programa de IEF podemos observar como las diferentes proteínas han ido moviéndose a lo largo de la tira de IEF y colocándose cada una entre los pH de 4 y 7 que es el rango de tiras elegido para este experimento. A continuación se puede observar la tira IEF ReadyStrip® tras un programa de isoelectroenfoque (Figura 45).



Figura 45. Tira IEF ReadyStrip®

El siguiente paso para la detección de las proteínas de TTR fue hacer la transferencia a la membrana de PVDF para poder realizar posteriormente el western blot. Para ello en un primer momento se traspasó toda la tira, que mide 17 cm, para asegurarnos del lugar en el que estaba la TTR. Además se utilizó un marcador de pI para intentar ayudarnos también en localizar la zona de interés.

Una vez comprobado y localizada físicamente nuestra proteína de interés en la tira ReadyStrip, las siguientes veces que se repitió el proceso solo se transfirió a la membrana la zona media de la tira que es donde se sitúa la proteína TTR, como era de esperar ya que según los cálculos de pI presenta un pI ligeramente superior a 5.

Los resultados del IEF se muestran en la figura 46. Podemos observar por un lado el resultado de la tira en la que se realizó el experimento con la muestra perteneciente a la paciente con mutación p.Glu74Gln (figura 46A). Tras el revelado observamos claramente dos bandas, pertenecientes a los dos tipos de proteína presentes en el suero de la paciente en primer lugar la banda a pH 5,3 que corresponde a la TTR wild type y en segundo lugar la banda más catódica a pH 5,4 correspondiente a la TTR mutada.

Por otro lado se muestra el resultado de la tira incubada con un suero control en el que solo se observa la banda situada a pH 5,3 (figura 46B) que corresponde a TTR wild type. En este segundo caso, solo se detecta una banda ya que solo hay un tipo de proteína TTR en el suero de este paciente.

Ambos experimentos se realizaron de manera simultánea para que las condiciones del ensayo fueran equiparables.

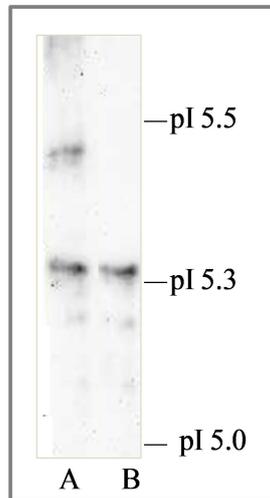


Figura 46. A. IEF p.Glu74Gln, B. IEF wild type

Con esta técnica podemos detectar la presencia de una o más variantes de TTR siempre y cuando posean un pI diferente. En aquellos pacientes con mutación se observarán dos bandas, debido a que estos pacientes al ser portadores de una mutación en heterocigosis, codifican tanto para la proteína TTR wild type como para la proteína mutada, sin embargo en pacientes sin mutación solo se observa una banda, correspondiente a la proteína wild type.



## **5.- DISCUSIÓN**



El acumulo de depósitos amiloides compuestos por transtiretina, se asocia a dos formas de amiloidosis, la variante senil o ATTRwt y la variante hereditaria o ATTRm. En los últimos años han aparecido publicaciones que revelan que ambas entidades están infradiagnosticadas (40,106). Actualmente son escasos los estudios centrados en estimar la prevalencia de estas dos enfermedades.

Por un lado, la variante hereditaria es una enfermedad que suele ser difícil de reconocer, tanto por la falta de historia familiar previa en las zonas no endémicas, como por la presentación clínica tan heterogénea que puede presentar (68). Centrándonos en este tipo, en el presente trabajo se ha realizado en primer lugar un análisis exhaustivo de la base de datos gnomAD, para establecer la prevalencia global de portadores de variantes en el gen de la TTR, con los resultados obtenidos ha quedado reflejado que la prevalencia de amiloidosis ATTRm es mayor de lo establecido hasta el momento. Posteriormente se ha realizado un estudio de campo en nuestro centro para determinar si existen casos de amiloidosis ATTRm en una zona no endémica como es la nuestra, con lo que se ha puesto de manifiesto que incluso en zonas no endémicas como la nuestra hay casos de esta enfermedad, los cuales muchas veces no son diagnosticados o son mal diagnosticados.

Por otro lado, en los últimos años se ha producido un aumento de los casos diagnosticados de amiloidosis ATTRwt. La variante senil está implicada en un número considerable de casos de insuficiencia cardíaca con FEVI preservada, pudiendo llegar a ser tan frecuente o más que la amiloidosis cardíaca AL (94). Debido a este aumento, el número de pacientes a los que se debería hacer el diagnóstico diferencial de amiloidosis ATTR es alto. A día de hoy, la única manera de diferenciar la variante senil de la genética es realizando la secuenciación del gen para detectar variantes productoras de enfermedad. Por esto, la segunda parte de este trabajo se ha centrado en la puesta a punto y validación de la técnica de screening HRMA, que nos ofrece la posibilidad de disponer de un método de cribado más rápido, simple y barato que la secuenciación lo cual sería de gran utilidad en el contexto de un estudio poblacional de la enfermedad.

Finalmente, el estudio de la carga de proteína mutante en suero podría ser de utilidad para un mejor entendimiento de la enfermedad. Una vez detectado un caso de ATTR familiar, podría determinarse la variación de la concentración de proteína mediante espectrometría. Al diagnosticar en nuestro centro a una paciente en la cual la variante causante de su enfermedad no puede ser detectada por espectrometría de masas, hemos realizado la puesta a punto de una técnica alternativa, el isoelectroenfoque.

## 5.1 ANÁLISIS DE LA BASE DE DATOS GNOMAD.

La amiloidosis ATTRm es una enfermedad considerada como rara, sin embargo hay suficientes evidencias en la actualidad que sugieren que está infradiagnosticada (102,106,107), aunque hasta ahora no haya datos concluyentes de la verdadera prevalencia en población general.

En este trabajo hemos analizado la frecuencia de variantes en el gen *TTR*, partiendo de una muestra de población general gracias a los datos disponibles en la base de datos gnomAD. El análisis de datos poblacionales es una herramienta muy útil en el estudio de mutaciones, tanto para conocer las variantes que pueden darse en un gen en concreto tanto como para obtener datos de frecuencia alélica y poder hacer una estimación de prevalencia. Son varios los estudios relacionados con distintas patologías en los que esta base de datos ha sido utilizada como por ejemplo en poliquistosis renal, enfermedad de Wilson o estudio de mutaciones en el gen de la leptina asociadas a obesidad (130–132).

### 5.1.1. VARIANTES ANALIZADAS

Tras analizar todas las variantes exónicas presentes en la base de datos gnomAD, se han detectado 72 variantes *missense*, de las cuales sólo 28 habían sido anteriormente reportadas en la literatura (58). El encontrar variantes nuevas suele ocurrir al analizar una base de datos poblacional tan amplia como es gnomAD debido al gran número de genomas y exomas analizados, en esta base de datos se recogen datos de más de 138000 personas y en concreto para el gen *TTR* disponemos de datos de unos 115780 individuos.

Así, por ejemplo, cuando se realizó uno de los primeros proyectos internacionales de este tipo, el proyecto “1000 Genomas” en 2012, la mayoría de variantes que se encontraron no habían sido descritas hasta el momento (108). Esto demuestra el gran potencial de estos grandes proyectos para el estudio de variantes genéticas poblacionales.

Al clasificar las 72 variantes encontradas en el gen *TTR*, 11 de ellas se han considerado amiloidogénicas y están descritas como tal en las bases de datos de amiloidosis (58).

Hemos clasificado otras 17 como variantes probablemente patológicas que no habían sido descritas hasta el momento, pero sí se han registrado cambios en esa misma posición que resultan patológicos. De las 29 variantes de significado incierto, tan sólo 6 están descritas como tales en la bibliografía (p.Arg5His, p.Leu9Phe, p.Ser18Ala, p.Thr23Met, p.Asn47Ser, p.Arg123His) (58), el resto son variantes no descritas o de las que no hay descritos cambios en esa posición. Dentro del grupo de variantes probablemente benignas se ha incluido la variante p.Asp119Asn descrita previamente y todas las que producen cambios en posiciones reconocidas como benignas y en las que el aminoácido que se modifica es similar al descrito (p.Met33Thr, p.Gly121Asp y p.Ala128Val) (58). Por último el grupo de variantes benignas, formado por polimorfismos ya descritos, entre los cuales el más frecuente es p.Gly26Ser.

### 5.1.2. PREVALENCIA DE AMILOIDOSIS ATTR<sub>m</sub>

Para calcular la prevalencia de amiloidosis ATTR<sub>m</sub>, se han analizado solo las 11 variantes clasificadas como patológicas, que son las productoras de enfermedad. La prevalencia de mutaciones amiloidogénicas en la población general es de 1:230 casos. Si incluimos las variantes clasificadas como potencialmente patógenas, la prevalencia global se sitúa en 1:207 (133).

Los resultados obtenidos muestran una frecuencia de mutaciones mucho más alta de la esperada según la prevalencia de enfermedad descrita hasta ahora, los datos que solemos encontrarnos en la literatura hablan de una prevalencia de 1:100.000 habitantes o 1:1.000.000 (61,102). Según lo descrito hasta el momento y dividiendo la amiloidosis

ATTRm en neuropática y cardiaca, se estima el número de casos de amiloidosis ATTRm polineuropática en 5.000 a 10.000 casos de enfermedad en todo el mundo, pero datos más recientes ya están indicando que esta cifra debe ser mayor, pudiendo ser de hasta 40.000 casos (102,106). En cuanto al fenotipo ATTRm cardiaco, se suele hablar de 40.000 casos globales, pero de los estudios de prevalencia de la mutación p.Val142Ile se desprende que esta cifra debe ser mayor, como se analizará más adelante (102,107). Es decir, algunos estudios ya apuntan que la prevalencia de amiloidosis ATTRm debe ser mayor que lo descrito hasta el momento, nuestros resultados apoyan esta teoría superando incluso estas estimaciones recientes.

Los datos de prevalencia de amiloidosis ATTRm presentan una amplia diversidad geográfica descrita ya en la literatura (13). GnomAD ofrece la posibilidad de ajustar los datos de prevalencia por grupos étnicos. Si analizamos los datos del grupo más representado en gnomAD, que son aquellos con ascendencia europea, la prevalencia se sitúa en 1:1.269. Esta cifra dista mucho de la prevalencia hasta ahora establecida en el continente europeo en zonas no endémicas, situado en 1:100.000 habitantes (62). La prevalencia en zonas no endémicas no ha sido bien determinada hasta ahora, son solo algunos los países que disponen de un registro casos, y en muchos casos se dan cifras de pequeñas subregiones en las que hay un pequeño foco endémico (61).

En el caso de la población africana la prevalencia es mucho más alta, 1 caso por cada 27 habitantes. Es la población con mayor número de portadores de mutaciones en el gen *TTR*. Esta cifra está fuertemente asociada a la mutación p.Val142Ile como se discutirá más adelante. Esta alta prevalencia sí que está registrada en la bibliografía (76,134), e indica que esta enfermedad puede ser un problema de salud pública en población africana.

En cuanto al resto de poblaciones recogidas en GnomAD, la prevalencia desprendida de este estudio en población latina es de 1:1.016. Hasta la fecha no hay datos de prevalencia en este grupo en la literatura. Dentro de la población latina se incluye Brasil, región reconocida como endémica donde recientes estudios indican que en Brasil el número de casos estaría en torno a 5.000 (prevalencia 1:40.983 habitantes) (106,135). Si lo comparamos con nuestros datos, incluso en esta zona en la que se ha estudiado la enfermedad en mayor medida que en otras áreas, la prevalencia no está bien establecida.

Por último, la población asiática, con una prevalencia de 1:1.806. Los datos recopilados de gnomAD, se dividen en asiáticos del este y del sur. Debido a los pocos casos recogidos en el grupo de asiáticos del este, hemos fusionado ambos grupos, hablando así del grupo de asiáticos. La prevalencia obtenida es similar a la europea y latina. No disponemos de una cifra de prevalencia anterior en esta población, siendo pocos los casos descritos en la literatura. La única zona estudiada dentro de este grupo es Japón, zona reconocida como endémica, para la que la prevalencia que se calcula es de 1:1.000.000, llegando a 15:1.000.000 en determinadas zonas del país (136). Al igual que ocurre en el grupo de latinos, los datos recogidos en la literatura muestran una prevalencia menor a la obtenida en nuestro trabajo incluso en las zonas clásicamente estudiadas.

### **5.1.3. VARIANTES PATOGENICAS MÁS FRECUENTES**

En cuanto a las mutaciones descritas, la más frecuente en gnomAD es p.Val142Ile con una prevalencia de 1:332 (MAF 0,00151), seguida de p.Val50Met con 1:4.924 habitantes (MAF 0,000102). En ambos casos se observa una gran influencia étnica, p.Val142Ile es especialmente frecuente en la población africana (MAF 0,01602, prevalencia de 1:31) y p.Val50Met en la europea (MAF 0,000179, prevalencia de 1:2.792) y se explica en detalle a continuación.

#### **5.1.3.1 Variante p.Val142Ile**

La mutación p.Val142Ile es la mutación más frecuente asociada al gen de la transtiretina (77). Así queda reflejado en los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en el que se ha obtenido que p.Val142Ile es la variante más frecuente a nivel global, representando el 88% de todas las mutaciones registradas.

Nuestros datos reflejan que el 92,33% de los portadores de esta mutación detectados en la base gnomAD son de ascendencia africana (385 de las 417 mutaciones p.Val142Ile registradas), el 5,52 % latinos y un 1,2% europeos.

### Val142Ile en población africana

La variante p.Val142Ile guarda una estrecha relación con la población africana. Los datos de frecuencia alélica de un estudio reciente de Jacobson et al. (134) concluyen que esta mutación tiene su origen en un pequeño número de portadores del sur de África occidental.

Varios estudios se centran en el análisis de la prevalencia de p.Val142Ile en población africana. Ya en 1996 Jacobson et al. (137), concluyeron que la frecuencia alélica de esta mutación en población de ascendencia africana era de 0,02, o lo que es lo mismo un 4% de dicha población. En un nuevo estudio de Jacobson en 2015 en el que se incluyó a 1.688 personas afroamericanas, los resultados mostraron un prevalencia alélica de 0,0193 (77). Datos más recientes publicados por Buxbaum en 2017 cifran la frecuencia alélica en población afroamericana en 0,017 (138).

Los datos derivados del análisis de gnomAD reflejan cifras similares, la prevalencia alélica es de 0,01602. Es decir, la prevalencia de p.Val142Ile en población africana es de 1 caso por cada 31 personas, lo que demuestra que un 3,2 % de la población africana presentará esta mutación. Nuestros datos concuerdan con los ya publicados hasta el momento, debido a que estos estudios previos son estudios poblacionales al igual que gnomAD. Son estudios en los que se ha calculado la prevalencia de la mutación a partir de una amplia muestra de población sana.

### Val142Ile en otras poblaciones

Aceptando que esta mutación es mucho más prevalente en población africana, es posible encontrar pacientes con la mutación p.Val142Ile en todo el mundo. Según los datos de gnomAD, uno de cada 748 latinos (MAF 0,0006683) presentará esta mutación, 1:7.695 asiáticos (MAF 0,00006497) y 1:12.666 europeos (MAF 0,00003948).

La prevalencia de p.Val142Ile en población no africana no está hasta la fecha bien establecida. Uno de los pocos estudios en los que se estima prevalencia de esta mutación en pacientes de varias etnias, es el realizado por Yamashita et al., (139) y cuyos datos se recogen en la guía propuesta por Ando (33). En dicho estudio se estudiaron a 1973 recién nacidos en EEUU, se concluye que la población caucásica presenta una prevalencia de 1:226, mucho más alta que la obtenida en nuestro trabajo. Además, no encuentran ningún caso en los 490 niños latinos ni en el grupo clasificado como “otros” en el cual se incluye la población asiática. Es llamativa la diferencia que hay con nuestros resultados, la prevalencia de p.Val142Ile en población caucásica en el estudio de Yamashita estaría sobreestimada, al contrario de lo que ocurre con la población latina y asiática. Esta diferencia puede ser debida probablemente a que los grupos étnicos no fueron bien establecidos, ya que tan solo se tuvieron en cuenta los datos de las madres de cada recién nacido y no de los padres, además los grupos de latinos y de asiáticos eran muy pequeños. Ante esta discrepancia, serían necesarios más estudios que confirmasen el resultado obtenido en nuestro trabajo.

Los casos en pacientes caucásicos se recogen en la literatura como casos aislados o como pequeñas series de casos. Un ejemplo es la descrita en Italia por Cappelli et al. (140) en el que de los 33 pacientes caucásicos diagnosticados en su centro, 5 presentan la mutación p.Val142Ile, es decir un 15% de su grupo. Este dato estaría de acuerdo con lo obtenido en nuestro trabajo, según nuestros resultados el 13% de las mutaciones en población caucásica son p.Val142Ile.

En el estudio realizado en nuestro centro, de las dos familias diagnosticadas de amiloidosis cardiaca ATTRm portadoras de la p.Val142Ile, una era natural de Zaragoza, sin ascendentes africanos en su árbol genealógico.

En la población latina, la variante que se describe en la literatura como más frecuente es p.Val50Met (114) pero según los datos obtenidos en este trabajo, la variante más frecuente en este grupo es p.Val142Ile. De los 25 casos de latinos, 23 corresponden a p.Val142Ile (prevalencia de 1:748) y tan solo dos casos a p.Val50Met (prevalencia 1:8.395).

Por lo tanto, deberían realizarse más estudios en población latina, porque según reflejan nuestros resultados, la variante p.Val142Ile tiene un peso importante y no solo p.Val50Met como clásicamente se había pensado.

Con todo esto y pese a que la mutación p.Val142Ile se asocia mayoritariamente a población africana, debemos tener en cuenta que podemos encontrarnos casos sea cual sea el origen del paciente, además los datos de prevalencia en población no africana no están bien establecidos actualmente.

### 5.1.3.2. Variante p.Val50Met

La segunda mutación más frecuente en gnomAD es p.Val50Met (MAF 0,000102 y prevalencia de 1:4.924) representando el 5% de todas las variantes patogénicas analizadas.

La amiloidosis ATTRm se ha considerado hasta hace poco una enfermedad fundamentalmente neurológica (94) y los primeros casos reportados eran producidos por la variante p.Val50Met.(61) Además, a lo largo de los años, esta variante ha sido ampliamente estudiada por estar presente en las zonas consideradas como endémicas, como Portugal, Suecia o Japón, donde es responsable de la práctica totalidad de los casos. En muchos de los países en los que predomina el fenotipo neurológico, p.Val50Met es la variante mayoritaria (40,61). Según los casos registrados en la literatura hasta el momento, representan más del 50% de los casos de polineuropatía amiloidótica familiar (61).

Todo esto puede llevar a pensar que es la variante más frecuente y la responsable de la mayoría de los casos de amiloidosis ATTRm, pero hoy en día se sabe que la mutación más frecuente como se ha expuesto anteriormente es p.Val142Ile y así lo hemos visto en nuestros resultados.

A pesar de ser una variante ampliamente descrita, la cifra de prevalencia que se da es de un caso por cada 100.000 habitantes (62), dato cada vez más discutido. Los artículos recientes en los que se habla de polineuropatía amiloidótica familiar, inciden sobre esta idea de que la prevalencia de p.Val50Met no está a día de hoy

bien establecida (40,106). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sobre la prevalencia de esta mutación de un caso por cada 4.924 habitantes, corroboran este concepto.

Esta discrepancia en la prevalencia que hemos obtenido puede ser debida a varios factores; por un lado, no podemos olvidar que frecuencia alélica no es lo mismo que frecuencia de enfermedad, esta última va a depender de la penetrancia de la mutación. La penetrancia de p.Val50Met son edad y geográficamente dependientes, siendo la causa de esta diversidad de cifras aún desconocida (68).

La penetrancia descrita en Portugal para p.Val50Met en pacientes de 50 años es del 60%, muy superior al 18% descrito en Francia o el 11% en Suecia. Sin embargo, a en pacientes de 80 años la penetrancia se cifra en un 85% en Portugal, Brasil o Francia y en un 69% en Suecia (41,61). Por lo que una parte de la diferencia en los datos de prevalencia, podría explicarse por la penetrancia incompleta de la mutación p.Val50Met.

Por otro lado y probablemente sea el que más influya en esta diferencia, el dato de referencia de 1:100.000 ha sido obtenido a partir de registros de pacientes ya diagnosticados, es decir no se han hecho grandes estudios poblacionales como los realizados en el caso de la mutación p.Val142Ile. Al ser una enfermedad infradiagnosticada, estimar la prevalencia a través de estos registros, da como resultado un dato de prevalencia inferior al real.

De estos datos se desprende que son necesarios más estudios poblacionales que confirmen la cifra de prevalencia obtenida en nuestro trabajo para la mutación p.Val50Met de 1:4.924 habitantes. Además, una vez que haya un número importante de portadores sanos, debería hacerse un seguimiento que permita establecer claramente la penetrancia de la mutación, y si se observa que hay variaciones geográficas, será necesario estudiar la existencia de factores modificadores de la enfermedad, que justifiquen la diferencia de una misma mutación en distintas áreas geográficas.

p.Val50Met y su asociación con grupos étnicos.

Como se ha ido describiendo a lo largo del trabajo, las variantes en el gen *TTR* suelen estar asociadas a zonas geográficas. Al igual que ocurre con la variante p.Val142Ile y su asociación con población africana, p.Val50Met está unida a población europea (114) y así lo reflejan también los datos obtenidos en nuestro trabajo.

De todos los casos registrados de la mutación p.Val50Met, el 80% pertenecen a población europea (prevalencia de 1:2.792, MAF 0,000179), el 8% a latinos (prevalencia 1:8.395 MAF 0,00005956) y el 4% a europeos finlandeses.

En Europa existen zonas endémicas como son Portugal y Suecia, donde la prevalencia dada es superior al del resto de áreas. Los datos disponibles en gnomAD, no nos permiten hondar en cada una de las regiones europeas y por lo tanto poder diferenciar entre zonas endémicas y no endémicas. Aun así, el dato de prevalencia en población europea concluido tras el análisis de GnomAD de 1:2.792, es muy superior al reportado hasta el momento en la bibliografía de 1:100.000 para la población europea en zonas no endémicas e incluso supera el dato de algunas zonas endémicas como por ejemplo la dada para Mallorca de 1:20.000 (63) o Chipre de 1:26.881 (61).

Es decir, pese a ser la variante más estudiada en la literatura y teniendo un gran peso en muchos de los países con registros de esta enfermedad, los datos de prevalencia no están bien establecidos actualmente en población europea, siendo hoy en día la prevalencia de esta enfermedad aún desconocida.

### 5.1.3.3. Otras variantes

El resto de variantes clasificadas como patogénicas son menos frecuentes, entre ellas podemos destacar p.Ile88Leu, con una prevalencia de 1:23.098 (MAF 0,00002165). Esta mutación está asociada principalmente a personas con ascendencia europea donde la prevalencia de la mutación es de 1:12.668 (MAF 0,00003947). Las manifestaciones clínicas de p.Ile88Leu son casi exclusivamente cardíacas, de hecho en una serie de casos de pacientes caucásicos, esta fue la mutación con fenotipo cardíaco que se encontró con mayor frecuencia (60), lo que contrasta con los datos en población afroamericana donde la mutación más frecuente es p.Val142Ile.

La mutación p.Phe64Leu, descrita en la literatura como productora de fenotipos mixtos(141,142), se encuentra en 1:9.900 personas estudiadas en la base gnomAD (MAF 0,00005051), está presente fundamentalmente en población con ascendencia africana con una prevalencia de 1:924 (MAF 0,0005411) y tan solo un caso entre la población europea (MAF 0,000007892)

La mutación p.Thr80Ala que en nuestro estudio aparece solamente en población europea con una prevalencia de 1:7.507 (MAF 0,00006660), ha sido descrita en un cluster al norte de Irlanda, donde se calcula que el 1,1% de la población es portadora de dicha mutación, y casos aislados en Inglaterra y Escocia.(1,143)

Los casos de p.Ala117Ser que aparecen en gnomAD son todos de población del este de Asia, donde la prevalencia se cifra en 1:9.431 (MAF 0.000106). Esta mutación se describe en la literatura como una de las más frecuentes en la población de China dato que concuerda con nuestros hallazgos (144). Cabe destacar que la variante asociada a Japón clásicamente ha sido p.Val50Met, como ocurre en todas las zonas endémicas. En los datos registrados en gnomAD, de los asiáticos estudiados ninguno ha presentado esta mutación.

Hemos podido demostrar con el análisis de gnomAD, que las variantes patogénicas están presentes en la población con una frecuencia más alta de la descrita hasta ahora, especialmente las mutaciones no p.Val142Ile y los datos desprendidos de este estudio apoyan la premisa del infradiagnóstico de amiloidosis ATTR hereditaria.

A pesar de que los datos más actuales sugieren que la prevalencia real de enfermedad podría ser mucho más alta de lo aceptado hasta ahora, los datos aportados por la revisión de la base gnomAD son aún más contundentes confirmando la posibilidad de que en realidad haya cientos de miles de personas portadoras de mutaciones potencialmente causantes de enfermedad. Sin embargo, estos datos deben interpretarse con cautela sin asimilar prevalencia de mutación a prevalencia de enfermedad.

## 5.2 ESTUDIO DE CASOS DE AMILOIDOSIS ATTR<sub>m</sub> EN NUESTRO MEDIO.

### 5.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

El estudio de la base de datos gnomAD nos ha permitido evidenciar que la prevalencia de mutación en el gen *TTR* es más elevada de lo registrado en la literatura, por lo que también parece interesante poder realizar un estudio de campo en nuestra zona de salud.

Los criterios adoptados en este estudio para la inclusión de los pacientes han sido muy estrictos, ya que los pacientes debían cumplir al menos dos de los criterios de amiloidosis expuestos, pero en muchos de los casos con uno solo de los criterios exigidos hubiera sido suficiente. Con esto lo que se ha querido es aumentar la tasa de detección de pacientes con amiloidosis ATTR<sub>m</sub>. Así, con estos criterios de sospecha y los criterios diagnósticos de los diferentes tipos de amiloidosis, hemos detectado 7 casos de amiloidosis ATTR hereditaria distribuidos en 3 familias (teniendo en cuenta pacientes con sintomatología y portadores sanos) y 13 casos de amiloidosis ATTR<sub>wt</sub>, lo que corresponde a una prevalencia de 5,11% y 9,7% respectivamente. Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaban afectación cardíaca, en la actualidad la amiloidosis cardíaca debería ser incluida en el diagnóstico diferencial de cualquier paciente con insuficiencia cardíaca y FEVI preservada o hallazgos ecocardiográficos compatibles como dilatación biauricular o engrosamiento septal (94).

Aunque hasta la fecha no hay una cifra de prevalencia de ATTR<sub>wt</sub> establecida, la prevalencia de amiloidosis ATTR<sub>wt</sub> en la muestra podría ser inferior a la esperada según los datos actuales (40,44). Esto puede deberse a la falta de realización de algunas pruebas complementarias durante el proceso diagnóstico en nuestro grupo de pacientes, lo cual no nos ha permitido llegar al diagnóstico final del tipo de amiloidosis presente en todos los pacientes.

De todos los pacientes estudiados, sólo se ha realizado gammagrafía ósea con Tc<sup>99</sup>-DPD para objetivar depósito de amiloide cardiaco en un 39,55% (53 pacientes) siendo positiva en el 50% de los casos y tan sólo en un 23,88% se ha realizado una inmunofijación en sangre y orina que nos permita descartar la presencia de gammapatías, criterio necesario como hemos comentado anteriormente para poder establecer el diagnóstico sin biopsia de amiloidosis senil (75).

Al no disponer de inmunofijación en todos los pacientes, en aquellos en los que según la escala de Perugini et al. (87) la captación era de grado dos o tres fueron diagnosticados de amiloidosis cardiaca ATTR.

En cuanto a la clínica de los pacientes diagnosticados de ATTRm, aunque lo descrito en la bibliografía es que en Europa hay una mayor afectación neurológica que cardiaca, en nuestro caso esta relación está invertida, objetivando una mayor afectación cardiaca (42,85%) frente a la neurológica (14,29%). Esta inversión puede ser debida a que los pacientes con una presentación no p.Val50Met en Europa o pacientes fuera de las zonas endémicas, están infradiagnosticados y por eso el peso de la variante neurológica p.Val50Met está sobrestimado. A esto hay que añadir que los criterios de inclusión utilizados en el estudio, probablemente favorezcan la inclusión de pacientes con manifestaciones cardiacas frente a las neurológicas.

En cuanto a la prevalencia de amiloidosis ATTR por sexos, en nuestro estudio de los 13 casos de amiloidosis ATTRwt, todos excepto una son varones. En el grupo de amiloidosis ATTRm, de los 7 pacientes diagnosticados solo uno es hombre (portador asintomático); el resto son mujeres, siendo los tres casos índice mujeres. Según los datos publicados en la literatura, tanto la amiloidosis ATTRwt como la ATTRm se asocian al sexo masculino. En la amiloidosis ATTRwt se habla de un porcentaje de varones de entre el 89-98% de los casos según las series estudiadas (43,51). Este predominio masculino algunos autores lo han asociado al papel que juegan las hormonas sexuales estimulando la producción de TTR, sugieren que tanto el estradiol como la testosterona inducen la producción hepática de TTR, tras la menopausia cae bruscamente la producción de estradiol pero no ocurre lo mismo con los niveles de testosterona, esto es lo que haría que en varones la TTRwt sea más prevalente (29).

Estos estudios son escasos y además, trabajos realizados recientemente, concluyen que el 20% de los pacientes con amiloidosis ATTRwt son mujeres, lo que sugiere que el porcentaje en el sexo femenino puede ser mayor de lo que se creía hasta ahora (52). En cuanto a la amiloidosis ATTRm también se asocia a predominio masculino sin haber ninguna causa que lo justifique (94). Es evidente que la muestra incluida en este estudio es demasiado pequeña como para extrapolar resultados de prevalencia y estratificar por sexos, para poder comparar con lo publicado hasta ahora.

Con todo esto, a pesar de que nuestro medio no se trata de una zona endémica de amiloidosis ATTR, este estudio nos demuestra la presencia de varios casos positivos para la enfermedad tanto en su variante senil como en la variante genética, lo que hace que nos planteemos el diagnóstico diferencial de amiloidosis ATTR en diferentes patologías, principalmente en pacientes que presentan insuficiencia cardíaca (sobre todo en pacientes jóvenes con FEVI conservada) o criterios de neuropatía periférica sin una causa aclarada.

### **5.2.2 VARIANTES GÉNICAS ENCONTRADAS**

Las mutaciones en el gen de la TTR representan aproximadamente el 90% de las amiloidosis hereditarias, caracterizándose por una gran variabilidad fenotípica, lo que hace que sean patologías de difícil reconocimiento, siendo muy frecuente el diagnóstico erróneo durante un largo periodo de tiempo hasta que se alcanza el diagnóstico definitivo de ATTRm (74,75).

En nuestra serie se han presentado las mutaciones de 3 familias con clínica compatible y estudio genético positivo para mutaciones amiloidogénicas, que fueron incluidas en el estudio tras el cumplimiento de los criterios establecidos para nuestra recogida de datos.

El área de Zaragoza (Aragón), es una zona no endémica para ATTRm, por lo que es un hecho relevante el haber diagnosticado a tres familias afectas de diferentes mutaciones lo que remarca la necesidad de una búsqueda activa y un alto índice de sospecha de la enfermedad.

### 5.2.2.1. Familia número 1

En la primera de las familias se detectó la mutación p.Glu74Gln cuya afectación inicial suele ser la afectación neurológica manifestada como síndrome de túnel del carpo, y una vez que la enfermedad ha progresado se añaden las manifestaciones cardíacas (145).

Nuestro caso índice presentó inicialmente manifestaciones neurológicas periféricas (síndrome de túnel de carpo bilateral) seguidas de miocardiopatía grave en fases más avanzadas de la enfermedad, presentando varias hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca y siendo una afectación rápidamente progresiva. Al tener una afectación cardíaca muy evolucionada con una FEVI severamente deprimida, se planteó la opción del trasplante hepato-cardíaco como mejor opción terapéutica y se realizó todo el estudio necesario para llevarlo a cabo pero la paciente falleció a causa de un accidente cerebro vascular.

Esta mutación según lo descrito en la base de datos Mutations in Hereditary Amyloidosis ha sido descrita en dos individuos rumanos, además del primer caso diagnosticado en España, nuestro caso índice, que también es de procedencia Rumania (145). Se trata pues de un caso atípico de amiloidosis ATTRm, pero puede ser que estemos ante una variante asociada a población de Rumanía pero al ser una región no endémica, no hay suficientes estudios realizados en esta zona y no se disponen de datos suficientes. Lo que pone de manifiesto es que el estudio de esta enfermedad es necesario en todas las regiones y no solamente en las establecidas como endémicas.

La hija de la paciente también es portadora de la mutación, pese a encontrarse asintomática, durante su estudio mediante electroneurograma se puso de manifiesto una polineuropatía sensitiva en fase incipiente. Al estar asintomática no se ha iniciado ningún tratamiento. Realizar un diagnóstico presintomático en los familiares nos permite realizar un seguimiento a cada portador para detectar el inicio de los síntomas, etapa clave para el comienzo del tratamiento si es posible.

Debido al gran impacto personal que puede suponer un resultado positivo en un portador asintomático, debe realizarse una consulta genética pre-test, en la que la persona implicada decida voluntariamente realizarse la prueba (62). Otro punto a tener en cuenta, es el diagnóstico genético preimplantacional o prenatal, no hay mucha experiencia sobre este tema y en Europa los casos se centran en población portuguesa (62). No hay consenso en la mayoría de los países y ante un caso de amiloidosis ATTRm deberá estudiarse la mutación en concreto, para poder establecer si estas opciones estarían recomendadas o no.

#### 5.2.2.2. Familia número 2

La segunda familia descrita, se caracteriza por presentar la mutación p.Val142Ile en forma de heterocigosis. Según lo descrito en la literatura, la amiloidosis ATTR por p.Val142Ile es extremadamente rara en grupos étnicos no africanos (33). Tanto la frecuencia de esta mutación obtenida en gnomAD en población Europea, como el hecho de haberla diagnosticado en nuestra zona, nos hace pensar que la frecuencia que se describe en la literatura no refleja la verdadera prevalencia de la enfermedad.

El fenotipo típico de esta afectación es similar al TTRwt, ya que debuta con una enfermedad cardíaca aislada y una frecuencia relativamente alta del síndrome del túnel del carpo, motivo por el que se pueden confundir ambas; no obstante la penetrancia clínica varía pudiendo dar como resultado una enfermedad cardíaca sustancial y sin embargo en otros pacientes se puede manifestar con muy poca sintomatología. A diferencia de los pacientes con afectación por amiloidosis senil; los pacientes afectados de esta mutación (p.Val142Ile) presentan mayor mortalidad; así se describió en el estudio Thansthyretin Amyloidosis Cardiac Study, presentando una supervivencia, en el momento en el que se manifestaba la clínica, en algo más de 2 años (76).

En esta familia las dos pacientes diagnosticadas tenían 80 y 87 años, como suele ocurrir con los pacientes con mutación p.Val142Ile, los síntomas suelen presentarse en edades avanzadas.

La edad a la que suele diagnosticarse esta variante, hace que pocos pacientes sean candidatos a recibir un trasplante hepático y en la actualidad no hay un tratamiento farmacológico específico aprobado ya que Tafamidis solo está aprobado para ATTRm polineuropática. Las únicas medidas terapéuticas posibles son el manejo cuidadoso de la insuficiencia cardíaca o la inclusión en ensayos clínicos (76). Probablemente, esto pueda cambiar en los próximos años con la demostración de que algunos de los fármacos disponibles pueden mejorar el pronóstico, no solo de las manifestaciones neurológicas, sino también de los pacientes con fenotipo exclusivamente cardíaco (100).

### 5.2.2.3. Familia número 3

La familia número tres es portadora de la mutación p.Val142Ile como en el caso anterior pero presentando varias diferencias entre ambas.

En primer lugar, el caso índice de esta familia, una mujer de 53 años precedente de Ghana, resultó ser portadora de la mutación en homocigosis, en comparación con las pacientes diagnosticadas en la familia número 2, se observa un anticipo en la edad a la cual se producen las manifestación clínica (30 años aproximadamente). Esta diferencia entre portadores homocigotos y heterocigotos ya se ha descrito en la literatura, donde se refleja que los individuos heterocigotos para la mutación p.Val142Ile tienden a desarrollar amiloidosis cardíaca después de la séptima década de la vida, en contraste con la afectación en homocigosis que puede manifestarse con una media de 10 años antes que los anteriores. En el estudio de Buxbaum et al. se describe que los individuos homocigotos se convierten sintomáticos a los 50-60 años, en contraste a los heterocigotos manifestándose con clínica de insuficiencia cardíaca congestiva entre los 60-80 (76).

En segundo lugar, ambas familias se diferencian por su raza. Mientras que en este caso la familia es procedente de Ghana y por tanto descendiente africana, la mutación más esperable es esta, p.Val142Ile; cosa sorprende en la familia número dos, procedentes de Zaragoza.

Según lo comentado anteriormente, la presencia de esta mutación en población europea puede considerarse una excepción, dato que queda en entredicho con los resultados de gnomAD presentados y apoyado por este caso en particular.

En tercer y último lugar, destaca en este caso una afectación pulmonar catalogada de “fibrosis” y que no hemos podido filiar por la negativa a realizar una biopsia pulmonar. La afectación pulmonar en la ATTRm, está descrita en la literatura, predominantemente en forma de amiloidosis alveolar septal difusa que puede confundirse fácilmente con una fibrosis pulmonar si no se busca específicamente el depósito de amiloide (146).

Estos tres casos presentan una gran relevancia en nuestro medio por características diferentes. El primero de ellos destaca por estar poco descrito en la literatura e importado de otro país, el segundo de ellos por diagnosticarse en una familia autóctona de un área no endémica, una mutación casi exclusiva de población afroamericana y el tercero por presentar una mutación frecuente pero sin embargo con afectación homocigota.(147) Todo ello hace necesario establecer unos criterios de selección de casos potenciales de ATTRm y tener presente esta patología para llegar a su diagnóstico mediante la realización del estudio genético, único método para poder distinguir la afectación senil de la hereditaria.

Con este estudio queremos resaltar la necesidad de incluir la ATTR en el diagnóstico diferencial de patologías tan frecuentes como es la neuropatía periférica y la insuficiencia cardíaca, fundamentalmente con fracción de eyección preservada, debido a la elevada mortalidad que conlleva y la necesidad de llegar a un diagnóstico temprano para el correcto tratamiento de los pacientes y la realización de consejo genético.

La principal limitación de esta parte del estudio es el pequeño tamaño muestral; esto es debido a que se decidió exigir dos criterios para la inclusión de los pacientes, para así aumentar la posibilidad de reclutar pacientes positivos; en la práctica clínica podría ser suficiente el cumplimiento de uno de los criterios para sospechar la existencia de una amiloidosis. Al exigir criterios tan restrictivos para entrar en el estudio hemos conseguido encontrar casos positivos con un número relativamente bajo de participantes pero suficiente para los objetivos de este estudio.

Además se trata de un estudio unicéntrico, por lo que no se puede concluir que estos resultados sean extrapolables a otras poblaciones de características diferentes a las de nuestro medio, estudios más amplios deberían ser realizados para tener un conocimiento mayor de la prevalencia de amiloidosis ATTR.

### 5.3 TÉCNICAS DE SCREENING GENÉTICO

La amiloidosis ATTR es una enfermedad cuya prevalencia parece ser más alta de lo establecido hasta el momento. Concretamente la amiloidosis ATTRwt podría ser la causa de la insuficiencia cardíaca en muchos pacientes, de hecho esta entidad está reconocida como la causa más frecuente de amiloidosis cardíaca con una prevalencia estimada de hasta un 10% en mayores de 80 años, aunque se piensa que podría estar infradiagnosticada, siendo la causa del 13% de los casos de insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada.

Debido al gran número de casos de amiloidosis ATTRwt, en todos ellos deberá realizarse un estudio para descartar o confirmar si es amiloidosis genética, por esto, en nuestro trabajo se plantea la idea de poder realizar un cribado poblacional dirigido a pacientes con insuficiencia cardíaca con FEVI preservada o pacientes con otros datos sugestivos de amiloidosis ATTR (148).

Actualmente existen varias técnicas de screening genético utilizadas en otras enfermedades. Los requisitos que imprescindiblemente deben cumplir son una sensibilidad y especificidad elevadas y además ser rápidas, fáciles de realizar y económicas. La secuenciación del gen *TTR*, actual método de diagnóstico genético, en el contexto de un screening de la enfermedad mucho más amplio de lo que se realiza actualmente, y utilizando criterios menos estrictos que los actuales, no resultaría la técnica apropiada, tanto por el tiempo necesario para procesar y analizar cada muestra como por su coste.

En este trabajo, se ha realizado la puesta a punto y validación de la técnica HRMA con el propósito de realizar un cribado de amiloidosis cardiaca. Tras el estudio realizado, se ha demostrado que el HRMA es capaz de diferenciar todas las variantes presentes en la muestra, ya que presentan un patrón claramente diferente al grupo control. Esta técnica permite diferenciar cualquier cambio de base presente en la secuencia estudiada, tanto polimorfismos como mutaciones patogénicas.

Entre las diferentes técnicas de screening disponibles en la actualidad, el uso de HRMA ha ido en aumento en los últimos años por ser una técnica rápida, fiable y económica. Presenta múltiples ventajas, entre las principales podemos destacar la simplicidad que ofrece frente a otras técnicas de screening, ya que la manipulación de la muestra es mínima y no hay que hacer ningún tratamiento de la misma entre la amplificación PCR y el análisis de los datos. Además, es mucho más económica, rápida y automatizable que la secuenciación del gen completo lo que le añade un valor incuestionable como técnica de screening (119).

Hacer una evaluación de costes es necesario pero no resulta del todo exacto ya que cada técnica está diseñada con un objetivo diferente. Cuando realizamos una secuenciación común podemos calcular fácilmente el coste porque está pensado para hacer de uno en uno. Sin embargo este cálculo es más complicado para el HRMA ya que es una técnica pensada para grandes volúmenes de muestras, es decir, para ser una técnica de screening. Haciendo una aproximación para calcular el ahorro que supone esta técnica frente a la secuenciación Sanger, se debe tener en cuenta tanto el gasto directo en reactivos como el generado del tiempo empleado por el personal técnico y facultativo en su realización e interpretación. El uso del HRMA frente a la secuenciación convencional reduce tanto el gasto como el tiempo de procesamiento y análisis en entorno a un 80%. Con este ahorro sería posible utilizar esta técnica para realizar un amplio screening poblacional.

Una de las limitaciones de HRMA descrita en la bibliografía es la dificultad para detectar variantes homocigotas, esto es debido a que en estos pacientes no se formarán heteroduplex, ya que los dos alelos presentarán la misma mutación (126). En nuestro caso y bajo las condiciones utilizadas en este estudio hemos podido diferenciar sin ningún problema la mutación homocigota presente en la muestra.

Hay que tener en cuenta que la técnica HRMA no diferencia entre las distintas variantes si no que tan sólo nos informa de si existe una variación genética, por lo tanto no puede sustituir a la secuenciación del gen. Ante un resultado positivo por HRMA siempre deberá realizarse la secuenciación del exón que haya resultado positivo, para determinar la mutación exacta que presenta un paciente o si simplemente es un polimorfismo. Por lo tanto, ante un paciente con un resultado positivo en HRMA debe realizarse la secuenciación, pero en los casos negativos este paso no es necesario.

Hasta ahora, este método no había sido utilizado para el diagnóstico de ATTR pero los resultados de nuestro trabajo demuestran que podría ser de gran utilidad y quizás generalizarse como técnica de screening ya que aporta innegables ventajas sobre la secuenciación habitual.

En la práctica clínica, diferenciar entre amiloidosis senil y amiloidosis hereditaria tiene implicaciones importantísimas tanto en el manejo del paciente como, sobre todo, en la repercusión familiar. Por todo ello, la recomendación es la de realizar el estudio genético a todo paciente con amiloidosis ATTR para detectar los posibles casos hereditarios. El diagnóstico de la amiloidosis cardiaca y del tipo concreto de amiloidosis es un problema que no se limita a los pacientes con IC, recientes estudios avalan la inclusión del estudio genético en el diagnóstico diferencial de cualquier cardiomiopatía hipertrófica.(61,68,107)

Considerando la altísima prevalencia de IC en nuestra población, cabe pensar que el diagnóstico de amiloidosis cardiaca va a ir en aumento en los próximos años por lo que cada vez serán más los pacientes en los que haya que realizar el estudio genético: es en este contexto donde el HRMA puede aportar ventajas en términos económicos y técnicos.

Una de las limitaciones que podrían atribuirse al estudio es el reducido tamaño muestral y que sólo se han detectado 3 mutaciones de las más de 100 descritas en la literatura en la actualidad (58), sin embargo, es evidente que la concordancia de resultados entre HRMA y la secuenciación Sanger (100%) añade valor a la técnica. Además, se han detectado mutaciones y polimorfismos en todos los exones codificantes del gen.

La suma de las mutaciones que hemos analizado (p.Val50Met y p.Val142Ile), representan en la práctica la inmensa mayoría de los casos descritos en la literatura mundial (61,107) y como se desprende también de los datos analizados en gnomAD, en los que la suma de estas dos mutaciones representa el 93% de todas las variantes patogénicas analizadas y el 70% en la población europea.

La alta frecuencia del polimorfismo p.Gly26Ser podría hacer que los casos en los que se tuviese que realizar la secuenciación del exón 2 fuesen numerosos. Para solucionar esta limitación se podría incluir un control positivo del mismo, con lo cual se diferenciaría perfectamente con HRMA este polimorfismo y no sería necesario hacer la secuenciación.

#### **5.4 DETECCIÓN DE LA PROTEINA MUTADA EN SUERO**

Entre las distintas pruebas diagnósticas establecidas para la amiloidosis ATTR está la realización de biopsias, del tejido afectado o de lugares más accesibles como aspirado de grasa abdominal (91–93).

Estas biopsias no suelen tener un alto rendimiento debido a las características de los depósitos amiloides, no repartidos de forma homogénea por todo el tejido y a las características propias de las técnicas empleadas en el análisis de las biopsias disponibles en los laboratorios como son las tinciones con Rojo Congo o la realización de pruebas de inmunohistoquímica (54,149). De hecho, de los casos de amiloidosis ATTRm diagnosticados en nuestro hospital, a tres de ellos se les realizó biopsia de grasa subcutánea, siendo positivo tan solo en la paciente portadora de la variante p.Glu74Gln.

Para aumentar la eficacia, se han utilizado distintas técnicas basadas en espectrometría de masas capaces de diferenciar la mayoría de las proteínas mutadas descritas con alta especificidad y sensibilidad (94,150) pero solo pueden ser realizadas en laboratorios muy específicos y no suelen estar disponibles en la rutina diaria.

En el caso concreto de la amiloidosis ATTRm, para disminuir tanto la variación del análisis debida a las características del depósito amiloide como los riesgos que esta prueba conlleva, podría realizarse la detección de la proteína mutada en suero. (95)

Las técnicas de espectrometría de masas diferencian la TTR anómala basándose en que el cambio de un aminoácido por otro se traduce en un cambio en el peso molecular de la proteína TTR circulante en sangre y así puede diferenciarse de la TTR normal. Sin embargo, si con el cambio de aminoácido no se produce un cambio en el peso molecular suficiente como para ser detectado por espectrometría de masas, se deberá optar por otras técnicas de detección. Estas mutaciones no suelen ser analizadas en los estudios realizados actualmente los cuales se centran en espectrometría de masas SELDI-TOF (95) o cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem (116).

Este es el caso de la mutación encontrada en la familia número uno, en el que se produce un cambio de ácido glutámico por glutamina en la proteína mutada. Tanto la proteína wild type como la mutada p. Glu74Gln, poseen un peso molecular muy similar, lo que se traduce en que no son diferenciables por espectrometría de masas, pero sí que se diferencian en su punto isoeléctrico, pudiendo ser analizadas por isoelectroenfoque.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, nos permiten diferenciar ambas proteínas correctamente, sin embargo no permite realizar una cuantificación de cada una de las fracciones correctamente. La definición de las bandas no resulta del todo adecuada, probablemente debido a causas inherentes de la propia técnica, como puede ser el soporte utilizado para la realización del paso del IEF.

Poder realizar la cuantificación de cada una de las bandas, podría resultar interesante en la monitorización de los pacientes y portadores asintomáticos. Hasta el momento varios estudios han demostrado una disminución significativa de las concentraciones de TTR en las formas hereditarias de amiloidosis ATTR (151–153) y han propuesto utilizar los niveles de TTR en suero como biomarcador para esta enfermedad. Pero en ninguno de ellos se ha realizado el estudio cuantificando la relación de proteínas TTRwt y TTR mutada.

Por todo ello, la mejora en la técnica de IEF podría servir para monitorizar la cantidad de proteína mutada en el suero. Como parte de investigación básica de la enfermedad, puede ser interesante la realización de estudios con un número representativo de pacientes y mutaciones, no solo para demostrar la existencia de proteína mutante en suero si no para estudiar las variaciones que pueda tener la relación TTR nativa / TTR mutada a lo largo del curso de la enfermedad.

## **6.- CONCLUSIONES**



- La presencia de variantes causantes de amiloidosis ATTR hereditaria es mayor que la establecida hasta ahora, siendo su prevalencia de 1:230 habitantes.
- La única variante cuya prevalencia está bien establecida es p.Val142 en población africana, con una prevalencia de 1:31 habitantes.
- En población europea la variante amiloidogénica más frecuente es p.Val50Met como está establecido en la literatura, pero con una frecuencia de 1:2.792, frecuencia mayor de lo descrito hasta el momento.
- Incluso en zonas no endémicas como la nuestra hay casos de amiloidosis ATTR hereditaria.
- La técnica HRMA ha demostrado una correlación del 100% con la secuenciación Sanger en una muestra representativa de las mutaciones del gen de TTR.
- La técnica HRMA es útil para el screening de amiloidosis ATTR familiar, siendo una buena herramienta en el contexto de un estudio poblacional.
- La técnica de isoelectroenfoque es útil para la detección de proteína TTR wild type y mutada en suero. La cuantificación de cada una de las fracciones de proteína debe ser mejorada



## **7.- BIBLIOGRAFÍA**



1. Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *Lancet*. 2016;387(10038):2641–54.
2. Kyle RA. Amyloidosis: A Convolved Story. *Br J Haematol*. 2001;114(3):529–38.
3. Hazenberg BP. Amyloidosis. A clinical overview. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013;39(2):323–45.
4. Álvarez-Ruiz SB, García-Río I, Daudén E. Amiloidosis sistémicas. *Actas Dermosifiliogr*. 2005;96(2):69–82.
5. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):384–96.
6. Ozawa D, Nomura R, Mangione PP, Hasegawa K, Okoshi T, Porcari R, et al. Multifaceted anti-amyloidogenic and pro-amyloidogenic effects of C-reactive protein and serum amyloid P component in vitro. *Sci Rep*. 2016;6:29077.
7. Gallo G, Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B. Potential Role of Apolipoprotein-E in Fibrillogenesis. *Am J Pathol*. 1994;145(3):526–30.
8. Macrauld CA, Stewart CR, Mok Y, Gunzburg MJ, Perugini MA, Lawrence LJ, et al. Non-fibrillar Components of Amyloid Deposits Mediate the Self-association and Tangling of Amyloid Fibrils. *J Biol Chem*. 2004;279(20):21038–45.
9. Merlini G, Bellotti V. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2003;349(6):583–96.
10. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*. 2016;23(4):209–13.
11. Bustamante JG, Brito D. Amyloidosis Pathophysiology.. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-.Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470285/>
12. González de la Calle V, García-Sanz R, Mateos MV. Amiloidosis primaria. *Med Clin*. 2016;147(3):121–6.
13. Nienhuis HL, Bijzet J, Hazenberg BP. The Prevalence and Management of Systemic Amyloidosis in Western Countries. *Kidney Dis*. 2016;2(1):10–9.
14. Real de Asúa D, Costa R, Galván JM, Filigheddu, MT, Trujillo D, Cadiñanos J. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clin Epidemiol*. 2014;6:369–77.
15. Vieira M, Saraiva MJ. Transthyretin: A multifaceted protein. *Biomol Concepts*. 2014;5(1):45–54.

16. Benson MD, Kincaid JC. The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle Nerve*. 2007;36(4):411–23.
17. Mangrolia P, Yang DT, Murphy RM. Transthyretin variants with improved inhibition of  $\beta$ -amyloid aggregation. *Protein Eng Des Sel*. 2016;29(6):209–18.
18. Haupt M, Blakeley MP, Fisher SJ, Mason SA, Cooper JB, Mitchell EP, et al. Binding site asymmetry in human transthyretin: Insights from a joint neutron and X-ray crystallographic analysis using perdeuterated protein. *IUCrJ*. 2014;1(6):429–38.
19. Faria TQ, Almeida ZL, Cruz PF, Jesus CS, Castanheira P, Brito RM. A look into amyloid formation by transthyretin: aggregation pathway and a novel kinetic model. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(11):7255–63.
20. Sekijima Y, Wiseman RL, Matteson J, Hammarström P, Miller SR, Sawkar AR, et al. The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease. *Cell*. 2005;121(1):73–85.
21. Saelices L, Johnson LM, Liang WY, Sawaya MR, Cascio D, Ruchala P, et al. Uncovering the mechanism of aggregation of human transthyretin. *J Biol Chem*. 2015;290(48):28932–43.
22. Foss TR, Wiseman RL, Kelly JW. The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates. *Biochemistry*. 2005;44(47):15525–33.
23. Jiang X, Buxbaum JN, Kelly JW. The V122I cardiomyopathy variant of transthyretin increases the velocity of rate-limiting tetramer dissociation, resulting in accelerated amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(26):14943–8.
24. Hornstrup LS, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjerg-Hansen A. Genetic stabilization of transthyretin, cerebrovascular disease, and life expectancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(6):1441–7.
25. Hou X, Aguilar M-I, Small DH. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. *FEBS J*. 2007;274(7):1637–50.
26. Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJ, Brito RM. Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J Biol Chem*. 2001;276(29):27207–13.
27. Rodrigues JR, Simões CJ, Silva CG, Brito RM. Potentially amyloidogenic conformational intermediates populate the unfolding landscape of transthyretin: insights from molecular dynamics simulations. *Protein Sci*. 2010;19(2):202–19.
28. Jesus CS, Almeida ZL, Vaz DC, Faria TQ, Brito RM. A new folding kinetic mechanism for human transthyretin and the influence of the amyloidogenic V30M mutation. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9):1428.

29. Ton VK, Mukherjee M, Judge DP. Transthyretin Cardiac Amyloidosis: Pathogenesis, Treatments, and emerging role in heart failure with preserved ejection fraction. *Clin Med Insights Cardiol*. 2015;8(Suppl 1):39-44
30. Manral P, Reixach N. Amyloidogenic and non-amyloidogenic transthyretin variants interact differently with human cardiomyocytes: insights into early events of non-fibrillar tissue damage. *Biosci Rep*. 2015;35(1), e00172.
31. Suhr OB, Lundgren E, Westermark P. One mutation, two distinct disease variants: unravelling the impact of transthyretin amyloid fibril composition. *J Intern Med*. 2017;281(4):337–47.
32. Zhao L, Buxbaum JN, Reixach N. Age-related oxidative modifications of transthyretin modulate its amyloidogenicity. *Biochemistry*. 2013;52(11):1913–26.
33. Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon BG, Ikeda S, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(1):31.
34. Iorio A, De Lillo A, De Angelis F, Di Girolamo M, Luigetti M, Sabatelli M, et al. Non-coding variants contribute to the clinical heterogeneity of TTR amyloidosis. *Eur J Hum Genet*. 2017;25(9):1055–60.
35. Ruzhansky K, Scoon J, Weimer LH, Maurer MS, Berk JL, Brannagan TH. Discordant phenotype in monozygotic female twins with Lys35Thr TTR familial amyloidotic polyneuropathy. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2014;16(1):1-6.
36. Sikora JL, Logue MW, Chan GG, Spencer BH, Prokaeva TB, Baldwin CT, et al. Genetic variation of the transthyretin gene in wild-type transthyretin amyloidosis (ATTRwt). *Hum Genet*. 2015;134(1):111–21.
37. Fonseca D, Gilberto S, Ribeiro-Silva C, Ribeiro R, Guinote IB, Saraiva S, et al. The role of fibrinogen glycation in ATTR: evidence for chaperone activity loss in disease. *Biochem J*. 2016;473(14):2225–37.
38. Santos SD, Cardoso I, Magalhaes J, Saraiva MJ. Impairment of the ubiquitin–proteasome system associated with extracellular transthyretin aggregates in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Pathol*. 2007;213(2):200–9.
39. Pepys MB. A molecular correlate of clinicopathology in transthyretin amyloidosis. *J Pathol*. 2009;217(1):1–3.
40. Galant NJ, Westermark P, Higaki JN, Chakrabarty A. Transthyretin amyloidosis: an under-recognized neuropathy and cardiomyopathy. *Clin Sci*. 2017;131(5):395–409.
41. Sekijima Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: Clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(9):1036–43.

42. Patel KS, Hawkins PN. Cardiac amyloidosis: where are we today? *J Intern Med*. 2015;278(2):126–44.
43. Pinney JH, Whelan CJ, Petrie A, Dzungu J, Banypersad SM, Sattianayagam P, et al. Senile systemic amyloidosis: clinical features at presentation and outcome. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(2):e000098.
44. González-López E, Gallego-Delgado M, Guzzo-Merello G, De Haro-Del Moral FJ, Cobo-Marcos M, Robles C, et al. Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2015;36(38):2585–94.
45. Liu PP, Smyth D. Wild-Type Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy: A Missed Cause of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction with Evolving Treatment Implications. *Circulation*. 2016;133(3):245–7.
46. Martínez-Naharro A, Hawkins PN, Fontana M. Cardiac amyloidosis. *Clin Med*. 2018;18(Suppl 2):s30–s35.
47. Cornwell GG, Murdoch WL, Kyle RA, Westermark P, Pitkänen P. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am J Med*. 1983;75(4):618–23.
48. Tanskanen M, Peuralinna T, Polvikoski T, Notkola IL, Sulkava R, Hardy J, 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*. 2008;40(3):232–9.
49. Mohammed SF, Mirzoyev SA, Edwards WD, Dogan A, Grogan DR, Dunlay SM, et al. Left ventricular amyloid deposition in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *JACC Hear Fail*. 2014;2(2):113–22.
50. Castaño A, Bokhari S, Maurer MS. Unveiling wild-type transthyretin cardiac amyloidosis as a significant and potentially modifiable cause of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2015;36(38):2595–7.
51. Connors LH, Sam F, Skinner M, Salinaro F, Sun F, Ruberg FL, et al. Heart Failure Due to Age-Related Cardiac Amyloid Disease Associated with Wild-Type Transthyretin: A Prospective, Observational Cohort Study. *Circulation*. 2016;133(3):282–90.
52. González-López E, Gagliardi C, Dominguez F, Quarta CC, de Haro-Del Moral FJ, Milandri A, et al. Clinical characteristics of wild-type transthyretin cardiac amyloidosis: Disproving myths. *Eur Heart J*. 2017;38(24):1895–904.
53. Sekijima Y, Uchiyama S, Tojo K, Sano K, Shimizu Y, Imaeda T, et al. High prevalence of wild-type transthyretin deposition in patients with idiopathic carpal tunnel syndrome: a common cause of carpal tunnel syndrome in the elderly. *Hum Pathol*. 2011;42(11):1785–91.

54. Izumiya Y, Takashio S, Oda S, Yamashita Y, Tsujita K. Recent advances in diagnosis and treatment of cardiac amyloidosis. *J Cardiol*. 2018;71(2):135–43.
55. Halatchev IG, Zheng J, Ou J. Wild-type transthyretin cardiac amyloidosis (ATTRwt-CA), previously known as senile cardiac amyloidosis: clinical presentation ,diagnosis ,management and emerging therapies. *J Thorac Dis*. 2018;10(3):2034–45.
56. Andrade C. A peculiar form of peripheral neuropathy: familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain*. 1952;75(3):408–27.
57. Berk JL, Suhr OB, Obici L, Sekijima Y, Zeldenrust SR, Yamashita T, et al. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2013;310(24):2658–67.
58. Mutations in Hereditary Amyloidosis [Internet]. Available from: <http://www.amyloidosismutations.com/>
59. Coelho T, Maurer MS, Suhr OB. THAOS – The Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey: initial report on clinical manifestations in patients with hereditary and wild-type transthyretin amyloidosis. *Curr Med Res Opin*. 2013;29(1):63–76.
60. Rapezzi C, Quarta CC, Obici L, Perfetto F, Longhi S, Salvi F, et al. Disease profile and differential diagnosis of hereditary transthyretin-related amyloidosis with exclusively cardiac phenotype: an Italian perspective. *Eur Heart J*. 2012;34(7):520–8.
61. Parman Y, Adams D, Obici L, Galán L, Guergueltcheva V, Suhr OB, et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(Suppl 1):S3-S13
62. Obici L, Kuks JB, Buades J, Adams D, Suhr OB, Coelho T, et al. Recommendations for presymptomatic genetic testing and management of individuals at risk for hereditary transthyretin amyloidosis. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(Suppl 1):S27-S35.
63. Buades Reinés J, Ripoll Vera T, Uson Martín M, Andréu Serra H, Company Campins MM, Diéguez Millán JM, et al. Epidemiology of transthyretin-associated familial amyloid polyneuropathy in the Majorcan area: Son Llàtzer Hospital descriptive study. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9(1):29.
64. Bonaïti B, Olsson M, Hellman U, Suhr O, Bonaïti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. TTR familial amyloid polyneuropathy: does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(8):948–52.

65. Merlini G, Planté-Bordeneuve V, Judge DP, Schmidt H, Obici L, Perlino S, et al. Effects of tafamidis on transthyretin stabilization and clinical outcomes in patients with non-Val30Met transthyretin amyloidosis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(6):1011–20.
66. Conceição I, González-Duarte A, Obici L, Schmidt HH, Simoneau D, Ong ML, et al. Red-flag symptom clusters in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2016;21(1):5–9.
67. Hellman U, Alarcon F, Lundgren HE, Suhr OB, Bonaiti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid.* 2008;15(3):181–6.
68. Adams D, Suhr OB, Hund E, Obici L, Tournev I, Campistol JM, et al. First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Curr Opin Neurol.* 2016;29(Suppl 1):S14–26.
69. Plante-Bordeneuve V. Update in the diagnosis and management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol.* 2014;261(6):1227–33.
70. García-Pavía P, Muñoz-Beamud F, Casasnovas C. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la polineuropatía amiloidótica familiar por transtiretina. *Med Clin (Barc).* 2015;145(5):211–7.
71. Ando Y, Nakamura M, Araki S. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. *Arch Neurol.* 2005;62(7):1057–62.
72. Ritts AJ, Cornell RF, Swiger K, Singh J, Goodman S, Lenihan DJ. Current concepts of cardiac amyloidosis: diagnosis, clinical management, and the need for collaboration. *Heart Fail Clin.* 2017;13(2):409–16.
73. Mankad AK, Shah KB. Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *Curr Cardiol Rep.* 2017;19(10):97.
74. Maurer MS, Elliott P, Comenzo R, Semigran M, Rapezzi C. Addressing Common Questions Encountered in the Diagnosis and Management of Cardiac Amyloidosis. *Circulation.* 2017;135(14):1357–77.
75. Gillmore JD, Maurer MS, Falk RH, Merlini G, Damy T, Dispenzieri A, et al. Nonbiopsy diagnosis of cardiac transthyretin amyloidosis. *Circulation.* 2016;133(24):2404–12.
76. Buxbaum JN, Ruberg FL. Transthyretin V122I (pV142I)\* cardiac amyloidosis: an age-dependent autosomal dominant cardiomyopathy too common to be overlooked as a cause of significant heart disease in elderly African Americans. *Genet Med.* 2017;19(7):733–42.
77. Jacobson DR, Alexander AA, Tagoe C, Buxbaum JN. Prevalence of the amyloidogenic transthyretin (TTR) V122I allele in 14 333 African-Americans. *Amyloid.* 2015;22(3):171–4.

78. McColgan P, Viegas S, Gandhi S, Bull K, Tudor R, Sheikh F, et al. Oculoleptomeningeal Amyloidosis associated with transthyretin Leu12Pro in an African patient. *J Neurol*. 2015;262(1):228–34.
79. Llull L, Berenguer J, Yagüe J, Graus F. Amiloidosis leptomeníngea debida a la mutación A25T TTR. A propósito de un caso. *Neurología*. 2014;29(6):382–4.
80. Gonçalves P, Martins H, Costelha S, Maia LF, Saraiva MJ. Efficiency of silencing RNA for removal of transthyretin V30M in a TTR leptomeningeal animal model. *Amyloid*. 2016;23(4):249–53.
81. Maia LF, Magalhães R, Freitas J, Taipa R, Pires MM, Osório H, et al. CNS involvement in V30M transthyretin amyloidosis: clinical, neuropathological and biochemical findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(2):159–67.
82. Fontana M, Banypersad SM, Treibel TA, Maestrini V, Sado DM, White SK, et al. Native T1 mapping in transthyretin amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7(2):157–65.
83. Dzungu JN, Anderson LJ, Whelan CJ, Hawkins PN. Cardiac transthyretin amyloidosis. *Heart*. 2012;98(21):1546–54.
84. Siddiqi OK, Ruberg FL. Cardiac amyloidosis: An update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2018;28(1):10–21
85. Damy T, Maurer MS, Rapezzi C, Planté-Bordeneuve V, Karayal ON, Mundayat R, et al. Clinical, ECG and echocardiographic clues to the diagnosis of TTR-related cardiomyopathy. *Open Heart*. 2016;3(1):e000289.
86. Martinez-Naharro A, Treibel TA, Abdel-Gadir A, Bulluck H, Zumbo G, Knight DS, et al. Magnetic Resonance in Transthyretin Cardiac Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(4):466–77.
87. Perugini E, Guidalotti PL, Salvi F, Cooke RM, Pettinato C, Riva L, et al. Noninvasive etiologic diagnosis of cardiac amyloidosis using <sup>99m</sup>Tc-3,3-diphosphono-1,2-propanodicarboxylic acid scintigraphy. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(6):1076–84.
88. Gertz MA, Benson MD, Dyck PJ, Grogan M, Coelho T, Cruz M, et al. Diagnosis, Prognosis, and Therapy of Transthyretin Amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(21):2451–66.
89. Kristen AV., Maurer MS, Rapezzi C, Mundayat R, Suhr OB, Damy T, et al. Impact of genotype and phenotype on cardiac biomarkers in patients with transthyretin amyloidosis - Report from the Transthyretin Amyloidosis Outcome Survey (THAOS). *PLoS One*. 2017;12(4): e0173086.
90. Finsterer J, Iglseider S, Wanschitz J, Topakian R, Löscher WN, Grisold W. Hereditary transthyretin-related amyloidosis. *Acta Neurol Scand*. 2019;139(2):92–105.

91. Adams D, Théaudin M, Cauquil C, Algalarrondo V, Slama M. FAP neuropathy and emerging treatments. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14(3):435.
92. Vrana JA, Theis JD, Dasari S, Mereuta OM, Dispenzieri A, Zeldenrust SR, et al. Clinical diagnosis and typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometry-based proteomics. *Haematologica.* 2014;99(7):1239–47.
93. Gertz MA, Dispenzieri A, Sher T. Pathophysiology and treatment of cardiac amyloidosis. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(2):91–102.
94. González-López E, López-Sainz Á, Garcia-Pavia P. Diagnóstico y tratamiento de la amiloidosis cardiaca por transtiretina. Progreso y esperanza. *Rev Esp Cardiol.* 2017;70(11):991–1004.
95. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Motokawa H, Kinoshita Y, Suenaga G, et al. Rapid detection of wild-type and mutated transthyretins. *Ann Clin Biochem.* 2016;53(4):508–10.
96. Ankarcrona M, Winblad B, Monteiro C, Fearn C, Powers ET, Johansson J, et al. Current and future treatment of amyloid diseases. *J Inter Med.* 2016;280(2):177–202.
97. Carvalho A, Rocha A, Lobato L. Liver transplantation in transthyretin amyloidosis: issues and challenges. *Liver Transpl.* 2015;21(3):282–92.
98. Waddington Cruz M, Benson MD. A Review of Tafamidis for the Treatment of Transthyretin-Related Amyloidosis. *Neurol Ther.* 2015;4(2):61–79.
99. Maurer MS, Grogan DR, Judge DP, Mundayat R, Packman J, Lombardo I, et al. Tafamidis in Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy: Effects on Transthyretin Stabilization and Clinical Outcomes. *Circ Hear Fail.* 2015;8(3):519–26.
100. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, Elliott PM, Merlini G, Waddington-Cruz M, et al. Tafamidis Treatment for Patients with Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2018;379(11):1007-16
101. Kerschen P, Planté-Bordeneuve V. Current and Future Treatment Approaches in Transthyretin Familial Amyloid Polyneuropathy. *Curr Treat Options Neurol.* 2016;18(12):53.
102. Hawkins PN, Ando Y, Dispenzeri A, Gonzalez-Duarte A, Adams D, Suhr OB. Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Ann Med.* 2015;47(8):625–38.
103. Adams D, Duarte AG, Riordan WDO, Yang C, Ueda M, Kristen A V, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2018;379(1):11–21.
104. Benson MD, Waddington-Cruz M, Berk JL, Polydefkis M, Dyck PJ, Wang AK, et al. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 2018;379(1):22–31.

105. Gertz MA. Hereditary ATTR amyloidosis: burden of illness and diagnostic challenges. *Am J Manag Care*. 2017;23(7 Suppl):S107–12.
106. Schmidt HH, Waddington-Cruz M, Botteman MF, Carter JA, Chopra AS, Hopps M, et al. Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve*. 2017;57(5):829-37
107. Damy T, Costes B, Hagège AA, Donal E, Eicher JC, Slama M, et al. Prevalence and clinical phenotype of hereditary transthyretin amyloid cardiomyopathy in patients with increased left ventricular wall thickness. *Eur Heart J*. 2016;37(23):1826–34.
108. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56–65.
109. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*. 2015;526(7571):75–81.
110. Auer PL, Reiner AP, Wang G, Kang HM, Abecasis GR, Altshuler D, et al. Guidelines for Large-Scale Sequence-Based Complex Trait Association Studies : Lessons Learned from the NHLBI Exome Sequencing Project. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):791–801.
111. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285–91.
112. gnomAD: genome aggregation database [Internet]. Disponible en: <http://gnomad.broadinstitute.org/>
113. Komajda M, Lam CS. Heart failure with preserved ejection fraction: A clinical dilemma. *Eur Heart J*. 2014;35(16):1022–32.
114. Plante-Bordeneuve V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: an update. *J Neurol*. 2018;265(4):976–83.
115. Cortese A, Vegezzi E, Lozza A, Alfonsi E, Montini A, Moglia A, et al. Diagnostic challenges in hereditary transthyretin amyloidosis with polyneuropathy: Avoiding misdiagnosis of a treatable hereditary neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(5):457–8.
116. Brown EE, Lee YZJ, Halushka MK, Steenbergen C, Johnson NM, Almansa J, et al. Genetic testing improves identification of transthyretin amyloid (ATTR) subtype in cardiac amyloidosis. *Amyloid*. 2017;24(2):92–5.
117. Vossen RH. Genotyping DNA Variants with High-Resolution Melting Analysis. *Methods Mol Biol*. 2017;1492:17–28.

118. Wittner CT, Reed G, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicons melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 2003;49(6):853–60.
119. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 2007;8(6):597-608.
120. Bobillo Lobato J, Vélez González MJ, García Agudo EM. Técnicas clásicas de Biología Molecular. En: Asociación española de biopatología médica AEBM. Manual de genética y biología molecular. 2016. p. 49-72.
121. Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicines. *Exp Mol Pathol.* 2008;85(1):50–8.
122. Hondow HL, Fox SB, Mitchell G, Scott RJ, Beshay V, Wong SQ, et al. A high-throughput protocol for mutation scanning of the BRCA1 and BRCA2 genes. *BMC Cancer.* 2011;11(1):265.
123. Rapado I, Grande S, Albizua E, Ayala R, Hernández JA, Gallardo M, et al. High resolution melting analysis for JAK2 exon 14 and exon 12 mutations: A diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn.* 2009;11(2):155–61.
124. Ishige T, Itoga S, Sato K, Kitamura K, Nishimura M, Sawai, et al. High-throughput screening of extended RAS mutations based on high-resolution melting analysis for prediction of anti-EGFR treatment efficacy in colorectal carcinoma. *Clin Biochem.* 2014;47(18):340–3.
125. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(2):219-40.
126. Er TK, Chang JG. High-resolution melting: Applications in genetic disorders. *Clin Chim Acta.* 2012;414:197–201.
127. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24.
128. ThermoFisher Scientific, Sanger Sequencing Workflow [Internet]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-workflow.html>.
129. Bergen HR, Zeldenrust SR, Butz ML, Snow DS, Dyck PJ, Dyck PJ, et al. Identification of transthyretin variants by sequential proteomic and genomic analysis. *Clin Chem.* 2004;50(9):1544–52.
130. Gao J, Brackley S, Mann JP. The global prevalence of Wilson disease from next-generation sequencing data. *Genet Med.* 2018:1.

131. Lanktree MB, Haghghi A, Guiard E, Iliuta IA, Song X, Harris PC, et al. Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(10):2593–600.
132. Nunziata A, Borck G, Funcke J, Kohlsdorf K, Brandt S, Hinney A, et al. Estimated prevalence of potentially damaging variants in the leptin gene. *Mol Cell Pediatr*. 2017;4(1):10.
133. Lahuerta Pueyo C, Aibar Arregui MÁ, Gracia Gutierrez A, Bueno Juana E, Menao Guillén S. Estimating the prevalence of allelic variants in the transthyretin gene by analysing large-scale sequencing data. *Eur J Hum Genet*. 2019
134. Jacobson DR, Alexander AA, Tagoe C, Garvey WT, Williams SM, Tishkoff S, et al. The prevalence and distribution of the amyloidogenic transthyretin (TTR) V122I allele in Africa. *Mol Genet Genomic Med*. 2016;4(5):548–56.
135. Pinto MV, Barreira AA, Bulle AS, Freitas MRG, França Jr MC, Gondim FAA, et al. Brazilian consensus for diagnosis, management and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Arq Neuropsiquiatr*. 2018;76(9):609–21.
136. Kato-Motozaki Y, Ono K, Shima K, Morinaga A, Machiya T, Nozaki I, et al. Epidemiology of familial amyloid polyneuropathy in Japan: Identification of a novel endemic focus. *J Neurol Sci*. 2008;270(1–2):133–40.
137. Jacobson DR, Pastore R, Pool S, Malendowicz S, Kane I, Shivji A, et al. Revised transthyretin Ile 122 allele frequency in African-Americans. *Hum Genet*. 1996;98(2):236–8.
138. Buxbaum J, Alexander A, Koziol J, Tagoe C, Fox E, Kitzman D. Significance of the amyloidogenic transthyretin Val 122 Ile allele in African Americans in the Arteriosclerosis Risk in Communities (ARIC) and Cardiovascular Health (CHS) Studies. *Am Heart J*. 2010;159(5):864–70.
139. Yamashita T, Hamidi Asl K, Yazaki M, Benson MD. A prospective evaluation of the transthyretin Ile122 allele frequency in an African-American population. *Amyloid*. 2005;12(2):127–30.
140. Cappelli F, Frusconi S, Bergesio F, Grifoni E, Fabbri A, Giuliani C, et al. The Val142Ile transthyretin cardiac amyloidosis: Not only an Afro-American pathogenic variant? A single-centre Italian experience. *J Cardiovasc Med*. 2016;17(2):122–5.
141. Damy T, Judge DP, Kristen AV., Berthet K, Li H, Aarts J. Cardiac findings and events observed in an open-label clinical trial of tafamidis in patients with non-val30met and non-Val122Ile hereditary transthyretin amyloidosis. *J Cardiovasc Transl Res*. 2015;8(2):117–27.
142. Wixner J, Mundayat R, Karayal ON, Anan I, Karling P, Suhr OB. THAOS: Gastrointestinal manifestations of transthyretin amyloidosis - Common complications of a rare disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9(1):61.

143. Reilly MM, Staunton H, Harding AE. Familial amyloid polyneuropathy (TTR ala 60) in north west Ireland: A clinical, genetic, and epidemiological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;59(1):45–9.
144. Meng LC, Lyu H, Zhang W, Liu J, Wang ZX, Yuan Y. Hereditary transthyretin amyloidosis in eight Chinese families. *Chin Med J*. 2015;128(21):2902–5.
145. Torres-Courchouda I, Martínez-Gil R, Aibar-Arregui MA, Andrés-Gracia A, Torralba-Cabeza MA. Cardiac Involvement Secondary to a Familial Form of Transthyretin Amyloidosis Resulting From the Glu54Gln Mutation. *Rev Esp Cardiol*. 2017;70(4):297–99.
146. Khor A, Colby TV. Amyloidosis of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(2):247–54.
147. Gracia Gutiérrez A, Bueno Juana E, Lahuerta Pueyo C, Menao Guillén S, Escota Villanueva J, Aibar Arregui MÁ. Atypical presentation of transthyretin amyloidosis in a non-endemic area. *Rev Clin Esp*. 2018
148. Calero Núñez S, Tercero Martínez A, García López JC, Jiménez-Mazuecos J. Amiloidosis cardiaca senil y estenosis aórtica degenerativa: 2 enfermedades interrelacionadas en el anciano. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2017;52(3):167–70.
149. Kapoor P, Thenappan T, Singh E, Kumar S, Greipp PR. Cardiac amyloidosis: A practical approach to diagnosis and management. *Am J Med*. 2011;124(11):1006–15.
150. Ueda M, Misumi Y, Mizuguchi M, Nakamura M, Yamashita T, Sekijima Y, et al. SELDI-TOF mass spectrometry evaluation of variant transthyretins for diagnosis and pathogenesis of familial amyloidotic polyneuropathy. *Clin Chem*. 2009;55(6):1223–7.
151. Buxbaum J, Koziol J, Connors LH. Serum transthyretin levels in senile systemic amyloidosis: Effects of age, gender and ethnicity. *Amyloid*. 2008;15(4):255–61.
152. Buxbaum J, Anan I, Suhr O. Serum transthyretin levels in Swedish TTR V30M carriers. *Amyloid*. 2010;17(2):83–5.
153. Chan GG, Koch CM, Connors LH. Blood Proteomic Profiling in Inherited (ATTRm) and Acquired (ATTRwt) Forms of Transthyretin-Associated Cardiac Amyloidosis. *J Proteome Res*. 2017;16(4):1659–68.

## 8.- ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Proteínas amiloidogénicas
- Tabla 2.** Tipos de depósitos amiloides de transtiretina y sus características
- Tabla 3.** Variación de la penetrancia en distintas regiones y edades
- Tabla 4.** Escala de Countinho et al. y escala de Yamamoto et al.
- Tabla 5.** Diferencias entre los dos tipos de presentación de la amiloidosis ATTR p.Val50Met
- Tabla 6.** Diferencias entre amiloidosis ATTRwt y ATTRm
- Tabla 7.** Primers utilizados para la amplificación PCR
- Tabla 8.** Condiciones establecidas para realiza la amplificación PCR
- Tabla 9.** Composición del tampón de electroforesis TBE 1X
- Tabla 10.** Composición Bromuro de Etidio
- Tabla 11.** Composición tampón de carga
- Tabla 12.** Composición reacción secuenciación
- Tabla 13.** Programa PCR de secuenciación
- Tabla 14.** Composición reacción HRMA
- Tabla 15.** Programa de PCR utilizado en HRMA
- Tabla 16.** Composición Buffer de IEF
- Tabla 17.** Composición Stock de urea 8.5 M
- Tabla 18.** Programa de isoelectroenfoque
- Tabla 19.** Composición solución de bloqueo
- Tabla 20.** Composición Stock de PBS
- Tabla 21.** Composición solución de lavado

- Tabla 22.** Variantes del gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como patológicas
- Tabla 23.** Distribución por poblaciones de las mutaciones más frecuentes
- Tabla 24.** Variantes europeas en el gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como patológicas
- Tabla 25.** Variantes del gen *TTR* en población africana clasificadas como patológicas
- Tabla 26.** Variantes del gen *TTR* en población latina clasificadas como patológicas
- Tabla 27.** Variantes del gen *TTR* en población asiática clasificadas como patológicas
- Tabla 28.** Variantes del gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como probablemente patológicas
- Tabla 29.** Análisis por poblaciones de las variantes probablemente patológicas más frecuentes
- Tabla 30.** Variantes del gen *TTR* en gnomAD y clasificadas como variantes de significado incierto
- Tabla 31.** Variantes del gen *TTR* en gnomAD clasificadas como probablemente benignas
- Tabla 32.** Variantes del gen *TTR* en gnomAD clasificadas como benignas
- Tabla 33.** Grupos en los que se ha dividido a los pacientes y requisitos.
- Tabla 34.** Descripción de los pacientes diagnosticados de amiloidosis cardíaca
- Tabla 35.** Análisis de Datos y Validación con la tecnología Sanger
- Tabla 36.** Peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas analizadas por IEF.

## 9.- ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Formación de depósitos amiloides
- Figura 2.** Estructura de la transtiretina
- Figura 3.** Mecanismo de formación de los depósitos amiloides en la amiloidosis por transtiretina
- Figura 4.** Fenotipos de las principales mutaciones
- Figura 5.** Manifestaciones de la amiloidosis ATTR
- Figura 6.** Algoritmo diagnóstico de amiloidosis ATTR
- Figura 7.** Resumen de los tratamientos disponibles y en investigación para la amiloidosis ATTR
- Figura 8.** Proceso de secuenciación Sanger
- Figura 9.** Esquema proceso del HRMA
- Figura 10.** Análisis de resultados en HRMA
- Figura 11.** Aplicación de la muestra y tira de IEF
- Figura 12.** Western Blot
- Figura 13.** Revelado de western Blot con luminol
- Figura 14.** Distribución de la población estudiada
- Figura 15.** Distribución variantes patológicas descritas en GnomAD
- Figura 16.** Distribución mutaciones en Europa
- Figura 17.** Descripción de pacientes con amiloidosis cardiaca y portadores de variantes en gen TTR.
- Figura 18.** Secuenciación exón 3, resultado normal / Resultados paciente 1
- Figura 19.** Árbol genealógico familia 1
- Figura 20.** Secuenciación exón 4 resultado normal / Resultados paciente 2
- Figura 21.** Árbol genealógico familia 2

**Figura 22.** Secuenciación exón 4 resultado normal / Resultados paciente 3

**Figura 23.** Árbol genealógico familia 3

**Figura 24.** Secuenciación polimorfismo p.Gly26Ser

**Figura 25.** Secuenciación polimorfismo p.Thr139Met

**Figura 26.** Representación global del programa de HRMA

**Figura 27.** Registro de fluorescencia exón 2

**Figura 28.** Programa Tm Calling. Curva de melting exón 2.

**Figura 29.** Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 2

**Figura 30.** Gene Scanning. Gráfica Temperature Shift

**Figura 31.** Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 2

**Figura 32.** Registro amplificación exón 3

**Figura 33.** Programa Tm Calling. Curva de melting exón 3

**Figura 34.** Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 3

**Figura 35.** Gene Scanning. Temperature Shift exón 3

**Figura 36.** Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 3

**Figura 37.** Registro amplificación exón 4

**Figura 38.** Programa Tm Calling. Curva de melting exón 4

**Figura 39.** Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 4

**Figura 40.** Gene Scanning. Temperature Shift exón 4

**Figura 41.** Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 4

**Figura 42.** Gene Scanning. Gráfico de normalización del exón 4

**Figura 43.** Gene Scanning. Temperature Shift exón 4

**Figura 44.** Gene Scanning Gráfico Difference Plot del exón 4

**Figura 45.** Tira IEF ReadyStrip®

**Figura 46.** A. IEF p.Glu74Gln, B. IEF wild type



## **10.- ANEXOS**



**ANEXO 1: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS****ESTUDIO DE AMILOIDOSIS GENÉTICA POR TRANSTIRETINA**

Nº PACIENTE
NHC
NOMBRE Y APELLIDOS
F. NACIMIENTO
F. ESTUDIO
ANTECEDENTES FAMILIARES/ GRADO DEL FAMILIAR

<b>MANIFESTACIONES CARDIACAS</b>		
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
Edema EEII		
Disminución diuresis		
Ortopnea		
Disnea paroxística nocturna		
Ingurgitación yugular		
Cianosis		
Reflujo hepatoyugular		

<b>MANIFESTACIONES NEUROLÓGICAS</b>		
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
Parestesias		
Disestesia		
Pérdida de fuerza		
Hipotensión ortostática		
Polineuropatía sensitiva		
Polineuropatía motora		

<b>MANIFESTACIONES GASTROINTESTINALES</b>		
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
Deposiciones líquidas		
Estreñimiento		
Náuseas y vómitos		

<b>OTRAS MANIFESTACIONES</b>		
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
Anasarca		
Pérdida de peso		
Astenia		

<b>DATOS ANALÍTICOS</b>				
Urea				
Creatinina				
Pro-BNP				
Troponina				
Función renal		FG		Proteinuria:
Enzimas hepáticas	AST	ALT	GGT	F. Alcalina
Hb				
PCR				
VSG				
<b>PROTEÍNA AMILOIDE</b>				
Tipo	AL	AA	TTR	WT
Cuantificación TTR en suero				
<b>ESTUDIO GENETICO</b>				
Realizado previamente	SI	NO		

Mutación descrita
-------------------

<b>PRUEBAS COMPLEMENTARIAS</b>	
<b>ECG</b>	Hipertrofia Bloqueos Arritmias
<b>ECOCARDIOGRAMA</b>	FEVI Grosor ventrículo izquierdo Disfunción sistólica/diastólica Patrón granular Engrosamiento del septo interauricular Engrosamiento septo interventricular Otros
<b>ELECTRONEUROGRAMA</b>	

## **ANEXO 2: HOJA DE INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO**

### **ESTUDIO DE AMILOIDOSIS GENÉTICA POR TRANSTIRETINA**

A continuación se detallan los aspectos del estudio que son de interés para usted:

Se le propone participar en un estudio, propuesto por el Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, en el que se realizará un estudio de detección de casos de amiloidosis genética por transtiretina.

La amiloidosis genética es una enfermedad rara pero que puede transmitirse a los hijos por lo que su diagnóstico no sólo es importante para usted sino también para sus familiares.

Si usted acepta participar en este estudio, se le citará una mañana para la realización de las siguientes pruebas:

- Historia clínica.
- Exploración Física completa.
- Realización de toma de muestras de sangre para estudio genético, proteómico y bioquímico.

De estas pruebas, la más invasiva, resulta la última de ellas. La toma de muestras consiste en la punción de una de las venas de la flexura del codo, sin ninguna característica especial (como la que se realiza en cualquier análisis de rutina) y recogida de sangre mediante punción capilar en el dedo.

Todas las pruebas son seguras, sin efectos secundarios, y bajo la supervisión facultativa. En su conjunto estas pruebas no implican ningún riesgo para el individuo.

En caso de que el estudio genético sea positivo se le informará debidamente, se organizará su seguimiento dentro del sistema público de salud y se le solicitará autorización para informar a sus familiares de primer grado y ofrecerles la posibilidad de

realizarse el estudio de la enfermedad.

En cualquier caso, usted recibirá un informe con sus resultados, y la interpretación de los mismos, al finalizar el estudio.

La participación es totalmente voluntaria y anónima, y toda la información obtenida será tratada confidencialmente de conformidad con la Ley 15/1999 de protección de datos personales. Sus datos permanecerán en formato papel hasta la finalización del Estudio siendo posteriormente destruidos. Sus datos se documentarán antes de su destrucción de manera anónima y se identificarán mediante un número, sus iniciales y la fecha de nacimiento en una base de datos informatizada, de modo que la información que se obtenga de los mismos no pueda asociarse a persona identificada o identificable.

Su médico personal será el único que conozca sus datos personales y adoptará las medidas oportunas para evitar su acceso a terceros no autorizados. Los Cuadernos de Recogida de Datos solo estarán disponibles a representantes autorizados o autoridades sanitarias apropiadas. En ningún caso estarán disponibles para terceras personas. Las personas autorizadas para su uso (médico personal, investigador principal) se comprometen a mantener la confidencialidad de sus datos personales.

Si precisa más información no dude en solicitárnosla antes de autorizar su inclusión en este estudio.

**ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO****ESTUDIO DE AMILOIDOSIS GENÉTICA POR TRANSTIRETINA**

Yo, \_\_\_\_\_,

con número de D.N.I. \_\_\_\_\_, habiendo sido informado de las pruebas que se realizarán:

- Revisión de su historial
- Historia clínica
- Exploración Física completa.
- Realización de toma de muestras de sangre para estudio genético, proteómico y bioquímico; y su conservación para estudios posteriores.

He leído la hoja de información que se me ha entregado, he podido hacer preguntas sobre el estudio, he recibido suficiente información sobre el estudio, y contestadas las dudas que por mí se planteen:

Doy mi consentimiento para que yo mismo/ mi representado

\_\_\_\_\_

Entre a formar parte de este estudio. Su participación es voluntaria y anónima, y toda la información obtenida será tratada confidencialmente de conformidad con la Ley 15/1999 de protección de datos personales.

Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. De igual modo declaro haber sido informado de las medidas que serán adoptadas en aras a garantizar la confidencialidad y disociación de cuanta información sobre mí mismo/ representado pudiera recogerse durante el desarrollo del estudio, así como de la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento.

Además en caso de que el estudio sea positivo para la enfermedad, acepto ser preguntado por la posibilidad de realizar el estudio pertinente a mis familiares de primer

grado para descartar que la enfermedad esté presente en ellos.

Acepto que los datos personales de mí mismo/representado (nombre, edad, sexo) sean conocidos únicamente por los investigadores y personal autorizado por estos para la realización del estudio, y utilizados según el protocolo del Estudio. Solamente mi médico personal conocerá mis datos personales y adoptará las medidas oportunas para evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados.

**Acepto y presto libremente mi conformidad para la inclusión en el estudio.**

Firma del Paciente

Firma del Investigador

Fecha \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Revoco mi aceptación al estudio y/o a transmitir la información de dicha enfermedad a mis familiares de primer grado.**

Firma del Paciente

Firma del Investigador

Fecha \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## ANEXO 4 DICTAMEN CEICA



### Informe Dictamen Favorable Proyecto Investigación Biomédica

C.P. - C.I. PI15/0189

9 de septiembre de 2015

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

#### CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 09/09/2015, Acta Nº 14/2015 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

**Título: Estudio de la amiloidosis en nuestro medio: análisis de los casos de amiloidosis genética asociados a mutaciones del gen de la transtiretina.**

**Investigador Principal: D. Miguel Ángel Aibar Arregui. HCU Lozano Blesa**

**Versión protocolo: v 1. de septiembre/2015**

**Versión hoja de información a los participantes y consentimiento informado: v 1. de septiembre/2015**

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 9 de septiembre de 2015

Fdo:

Dña. María González Hinjos  
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

## 11.- PUBLICACIONES

Lahuerta Pueyo C, Aibar Arregui MÁ, Gracia Gutierrez A, Bueno Juana E, Menao Guillén S. Estimating the prevalence of allelic variants in the transthyretin gene by analysing large-scale sequencing data. Eur J Hum Genet. 2019

Gracia Gutiérrez A, Bueno Juana E, Lahuerta Pueyo C, Menao Guillén S, Escota Villanueva J, Aibar Arregui MÁ. Atypical presentation of transthyretin amyloidosis in a non-endemic area. Rev Clin Esp. 2018





# Estimating the prevalence of allelic variants in the transthyretin gene by analysing large-scale sequencing data

Carmen Lahuerta Pueyo<sup>1</sup> · Miguel Ángel Aibar Arregui<sup>2</sup> · Anyuli Gracia Gutierrez<sup>2</sup> · Esperanza Bueno Juana<sup>2</sup> · Sebastián Menao Guillén<sup>1</sup>

Received: 10 May 2018 / Revised: 12 December 2018 / Accepted: 18 December 2018  
© European Society of Human Genetics 2019

## Abstract

Transthyretin amyloidosis (ATTR amyloidosis) is a rare disease characterised by extracellular deposition of amyloid fibrils composed by transthyretin. ATTR amyloidosis can be sub-classified as wild-type ATTR (ATTR-wt) or as hereditary amyloidosis (ATTR-m); the prevalence of both types are likely underestimated. There are tools that can help us to study ATTR-m, as gnomAD database. Our primary aim was to estimate prevalence of variants, especially amyloidogenic variants, in the TTR gene using gnomAD database. We analysed TTR missense variants found in gnomAD. The variables studied were classified according to their clinical significance and according to the different populations. We found 71 missense variants in the TTR gene. Eleven variants were described as affects function variants (prevalence 1:230). The most frequently detected variant were c.424G>A (p.(Val142Ile)) (prevalence 1:332, MAF 0.00151) and c.148G>A (p.(Val50Met)) (prevalence 1:4924, MAF 0.000102), which represented 88% and 5%, respectively, of all affects function variants detected. Seventeen variants were classified as probably affects function, 29 as unknown variants, 4 as probably does not affect function and 10 as does not affect function variants. In terms of different populations, c.424G>A (p.(Val142Ile)) was especially prevalent in African population (MAF 0.01602; prevalence of 1:31) and c.148G>A (p.(Val50Met)) in European population (MAF 0.000179; prevalence of 1:2792). Prevalence of amyloidogenic variants in the general population was higher than prevalence heretofore described. This difference could be explained by incomplete penetrance of the disease, but other factors contributing to this fact, fundamentally the underdiagnosis of the disease.

## Introduction

Systemic amyloidoses are a group of rare diseases characterised by extracellular deposition of amyloid fibrils. The most common subset of amyloidoses includes primary systemic amyloidosis (AL), reactive systemic amyloidosis (AA) and transthyretin (TTR) amyloidosis (ATTR amyloidosis). However, more than 30 different proteins have been described as causing these disease [1, 2].

Focusing on ATTR amyloidosis, amyloid deposition material is produced by the destabilisation of the

transthyretin protein (TTR). This protein is predominantly produced in the liver (>95%), the choroid plexus and the retinal pigment epithelia, and it is involved in the transport of thyroxine and retinol [3].

ATTR amyloidosis can be sub-classified as one of two types. One type is associated with aging, and it is known as senile systemic amyloidosis or “wild-type ATTR” (ATTR-wt). The other type is known as hereditary amyloidosis (ATTR-m) due to point changes in the TTR allele that cause a deposition of mutant TTR amyloid [4].

ATTR-m has an autosomal dominant inheritance. It is caused by single amino-acid changes in the transthyretin gene, which is located on chromosome 18 (18q12.1). This gene is divided into four exons and, despite being small, over 130 allelic variants have been described, most of which are amyloidogenic [5, 6].

ATTR amyloidosis was first described in 1952 by Andrade in Portugal. In the following decades, other endemic areas in Japan and Sweden were also described [7]. Although the

✉ Carmen Lahuerta Pueyo  
carmenpueyo@gmail.com

<sup>1</sup> Service of Clinical Biochemistry, Hospital Clínico Universitario de Zaragoza (HCUZ)-IIS Aragón, Zaragoza, Spain

<sup>2</sup> Service of Internal Medicine, HCUZ-IIS Aragón, Zaragoza, Spain

disease first appeared to be endemic, advances in diagnostic techniques have led to diagnoses worldwide [5].

Clinical manifestations depend mainly on the existing variant. In the c.148G>A (p.(Val50Met)) located in exon 2 (most common in Europe), neurological manifestations are predominant (familial amyloid polyneuropathy [FAP]); in other variants, such as c.424G>A (p.(Val142Ile)) located in exon 4 (most common in the United States), a cardiac phenotype is predominant. In any case, there are described mixed phenotypes and other organ involvement [4, 8].

FAP has an estimated prevalence of 1/100,000 in Europe and the United States. In endemic regions of Portugal, Japan, Brazil or Sweden, the prevalence ranges from 1/1000 to 1/10,000 people. In Majorca, 5/100,000 people have been observed with FAP, and in Cyprus, 3.72/100,000 people [9–11]. ATTR-m with a cardiac phenotype has a higher frequency than FAP; the c.424G>A (p.(Val142Ile)) in the African population is 3–4%, while in Caucasian and Latin populations are <0.5% [5, 12].

The age of onset ranges from the second to ninth decade of life [13]. There is great heterogeneity in penetrance data depending on the phenotype, genotype and environmental factors. There are few references in the literature regarding the penetrance of the disease, the available data focus on the variant c.148G>A (p.(Val50Met)), the penetrance of the disease in carriers of these variant is different in different areas, increasing the risk of suffering the disease with age. In Portugal, the penetrance at 50 years is 80% compared with an 18% in French population. These percentages increase considerably with age, so at 70 years penetrance in Portugal increases to 91 and 50% in France. Swedish carriers have an even lower risk of 11% by age 50 and 36% by age 70 years [10, 14]. Anticipation phenomenon has been observed and furthermore, there is a risk of earlier onset when the mutation is inherited from the mother [12, 15].

In addition to the difficulties of knowing the true prevalence and penetrance of the disease, there are many references that suggest that the disease is underdiagnosed due to the clinical variability and the lack of specific symptoms or biomarkers [16–18]. For those reasons, we find the study of population data to be relevant to the analysis of both the TTR gene variants and the frequency of each of those variants.

There are tools that can help us to study rare diseases, such as ATTR amyloidosis. Also, there are large genomic databases—for example, the gnomAD database—that can support the study of genetic variation frequencies [19]. Our primary aim was to estimate the allele frequencies of variants in the TTR gene using the gnomAD database, especially those variants that are known to play a role in pathological processes.

## Materials and methods

GnomAD is an update of the ExAC project. The gnomAD database currently contains 123,136 exomes and 15,496 genomes from unrelated individuals and from different populations, sequenced as part of various disease-specific and population genetic studies. Individuals known to be affected by severe paediatric disease, as well as their first-degree relatives, have been removed, so this data set should serve as a useful reference of allele frequencies for severe disease studies—however, individuals with severe disease may still be included in the data set, albeit likely at a frequency equivalent to or lower than that seen in the general population. No statistical methods were used to predetermine sample size. The experiments were not randomised [19].

The analysis of GnomAD data was carried out from November 2017 to January 2018. All TTR (canonical transcript ENST00000237014) variants were selected from the gnomAD database (<http://gnomad.broadinstitute.org/>). The variants studied were missense variants for which a change of one amino acid for another occurred; variants of disease are those that affect protein folding and that induce the accumulation of misfolded proteins, not those leading to a non-functional truncated protein. Thus, splicing variants, stop codons or frameshift changes were eliminated. Intron variants, variants in non-coding regions, or synonymous variants were not taken into account.

The variables studied were classified according to their clinical significance and according to the different populations studied in gnomAD.

- In terms of the clinical significance, variants of the TTR gene were identified based on descriptions in other databases and in the literature. The variants found in the database, previously described in the literature, have been classified mainly according to their clinical significance, placing special interest on those described in the literature as disease producers.

The following sources were used: ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), the Mutations in Hereditary Amyloidosis database (<http://www.amyloidosismutations.com/>), the Human Genetic Mutation database ([www.hgmd.cf.ac.uk/](http://www.hgmd.cf.ac.uk/)) and available literature from PubMed Central ([www.PubMed.com](http://www.PubMed.com)).

Following the recommendations of Human Genome Variation Society, the variants were classified as affects function, probably affects function, unknown, probably does not affect function and does not affect function [20].

It has been considered if these variants were described or not before or, also if there were or not changes described in that protein's position. In this study we have been mainly

**Table 1** Affects function variants of the TTR gene from the gnomAD database

	Variant	Allele count	Exome/genome number	Number of homozygotes	Allele frequency
Affects function variants	c.88T>C (p.(Cys30Arg))	1	15492	0	0.0000323
	c.122G>A (p.(Arg41Gln))	2	123121	0	0.0000081
	c.148G>A (p.(Val50Met))	25	123118	0	0.000102
	c.190T>C (p.(Phe64Leu))	14	138600	0	0.0000505
	c.227A>G (p.(His76Arg))	1	15491	0	0.0000323
	c.238A>G (p.(Thr80Ala))	1	123108	0	0.0000041
	c.250T>C (p.(Phe84Leu))	1	123106	0	0.0000041
	c.262A>T (p.(Ile88Leu))	6	138591	0	0.0000217
	c.301G>A (p.(Ala101Thr))	3	123095	0	0.0000122
	c.349G>T (p.(Ala117Ser))	2	138367	0	0.0000072
	c.424G>A (p.(Val142Ile))	417	138570	3	<b>0.00151</b>

Bold values indicate only that it is the highest allele frequency value in the group

**Table 2** Population descriptions of c.424G>A (p.(Val142Ile)) and c.148G>A (p.(Val50Met)) of the TTR gene

	c.424G>A (p.(Val142Ile))			c.148G>A (p.(Val50Met))		
	Allele count	%	Allele frequency	Allele count	%	Allele frequency
African	385	92.33	0.016	0	0	0
Latino	23	5.52	0.000668	2	8	0.0000596
European (Non-Finnish)	5	1.2	0.0000395	20	80	0.000179
European (Finnish)	0	0	0	1	4	0.0000448
South Asian	2	0.48	0.000065	0	0	0
Other	2	0.48	0.000309	2	8	0.000365
Total	417			25		

focused on the group of variants that produce disease, these variants are associated to the formation of misfolded proteins. For those variants which are probably pathological or those with an uncertain significance, most of them not described in the literature yet, these studies are not available.

The pathogenic potential of each unreported variant was classified as recommended by the American College of Medical Genetics and Genomics [21].

- In terms of populations, all variants analysed were classified according to the diverse ethnicities defined in the gnomAD database. The population classifications were as follows: non-Finnish European (45.71%), African/African American (8.67%), Latino (12.41%), Finnish (9.30%), Ashkenazi Jewish (3.66%), East Asian (6.81%), South Asian (11.10 %) and other (2.33%).

## Results

We found 71 missense variants in the TTR gene, with an average of 115,780 exomes studied. The variants were divided into the following categories: affects

function, probably affects function, unknown, probably does not affect function and does not affect function variants.

### Affects function variants

From the database search results, 11 variants were described in this group (Table 1). The frequency of variants that affect function was 1:230 people. The most frequently detected were c.424G>A (p.(Val142Ile)) and c.148G>A (p.(Val50Met)) which represented 88% and 5%, respectively, of all affect function variants detected.

The c.424G>A (p.(Val142Ile)) variant had a minor allelic frequency (MAF) of 0.00151 and a prevalence of 1:332. The most commonly represented population was African, with a prevalence of 1:31 people (MAF 0.01602). The c.148G>A (p.(Val50Met)) variant represented 5% of this group, resulting in an estimated prevalence of 1:4924 (MAF 0.000102). The distribution by subpopulations of these variants is presented in Table 2. By dividing this group by ethnicity, we found that in Europe, the prevalence was 1:1269 people, and the most frequent was c.148G>A (p.(Val50Met)), with one carrier per 2792 inhabitants (MAF 0.000179) (Table 3).

**Table 3** Variants of the TTR gene classified as affects function variants from the gnomAD database in the European population

Variant	Allele count	Exome/genome number	Number of homozygotes	Allele frequency
c.88T>C (p.(Cys30Arg))	1	1747	0	0.000067
c.148G>A (p.(Val50Met))	20	55847	0	0.000179
c.190T>C (p.(Phe64Leu))	1	63352	0	0.000008
c.227A>G (p.(His76Arg))	1	7507	0	0.000067
c.238A>G (p.(Thr80Ala))	1	55842	0	0.000009
c.250T>C (p.(Phe84Leu))	1	55838	0	0.000009
c.262A>T (p.(Ile88Leu))	5	63342	0	0.00004
c.301G>A (p.(Ala101Thr))	2	55824	0	0.000018
c.424G>A (p.(Val142Ile))	5	63331	0	0.00004

### Probably affects function variants

Seventeen variants were classified as probably affects function variants, and the allelic frequencies of those variants ranged from 0.0000041 to 0.0000646. The most frequently identified variants were c.235A>G (p.(Thr79Ala)), with an estimated prevalence of 1:11,191 people (0.0000447 MAF), and c.406T>C (p.(Tyr136His)), with an estimated prevalence of 1:17,588 people (MAF 0.0000284) (Table 4).

### Unknown variants

There were 29 variants that were classified as effect on function not known. The highest frequencies were for c.14G>A (p.(Arg5His)) and c.368G>A (p.(Arg123His)), with prevalence rates of 1:3959 people (MAF 0.000126) and 1:6927 people (MAF 0.0000722), respectively (Table 4).

### Probably does not affect function variants

Four variants were classified as probably does not affect function variants, with a prevalence of 1:15,371 (MAF 0.0000325). The c.355G>A (p.(Asp119Asn)) variant was the most common in this group. Other variants included c.98T>C (p.(Met33Thr)), c.362G>A (p.(Gly121Asp)) and c.383C>T (p.(Ala128Val)) (Table 4).

### Does not affect function variants

The most frequent variant in the group of no functional effect variants was c.76G>A (p.(Gly26Ser)), representing 94.5% of this group (MAF 0.0515) (Table 4).

## Discussion

We used the gnomAD database to estimate the population prevalence of ATTR-m. In most papers published about this

disease, the prevalence was estimated from the recorded data of patients already diagnosed. In our work, we started from a general population sample, in which we analysed allele frequency [9, 22]. Although ATTR-m is considered to be a rare disease, there is sufficient evidence to conclude that it is underdiagnosed [17, 18], and until now data of the true prevalence in the general population are not conclusive.

After analysing all exonic variants present in the gnomAD database, 71 missense variants were detected. Only 28 had been previously reported, of which 11 were considered to be amyloidogenic [6]. We classified 17 of the variants as variants that probably affects function; these had not been described before, but pathological changes in the same position had already been reported. Only 6 of the 29 variants that we determined to be of unknown significance had been described as such in the bibliography (c.14G>A (p.(Arg5His)), c.25C>T (p.(Leu9Phe)), c.52T>G (p.(Ser18-Ala)), c.68C>T (p.(Thr23Met)), c.140A>G (p.(Asn47Ser)) and c.368G>A (p.(Arg123His))) [6], the others 23 are not described variants or with no changes reported in that position. Within the probably does not affect function group, the c.355G>A (p.(Asp119Asn)) variant was included, all variants with similar amino acid modifications described previously as does not affect function (c.98T>C (p.(Met33Thr)), c.362G>A (p.(Gly121Asp)) and c.383C>T (p.(Ala128Val)) [6]. Finally, in the group of does not affect function variants, all variants have been previously described, among which the most common was c.76G>A (p.(Gly26Ser)), which represented 94.5% of the group (MAF 0.0515).

If only the 11 recognised affects function variants were considered, the prevalence of amyloidogenic variants in the general population was 1:230 cases. If data from the most represented group in the gnomAD database (that is, participants with European ancestry) were considered, the prevalence decreased to 1:1269 people, probably due to the influence of the African population on the whole population. If we included variants classified as probably affects function, the overall prevalence was 1:207.

**Table 4** Variants of the TTR gene from the gnomAD database. Classified as probably affects function, unknown, probably does not affect function and does not affect function variants

	Variant	Allele count	Exome/genome number	Number of homozygotes	Allele frequency	
Probably affects function variants	c.118G>C (p.(Val40Leu))	1	123121	0	0.00000406	
	c.119T>C (p.(Val40Ala))	1	123127	0	0.00000406	
	c.127A>C (p.(Ser43Arg))	1	15485	0	0.0000323	
	c.208A>G (p.(Ser70Gly))	1	123081	0	0.00000406	
	c.209G>A (p.(Ser70Asn))	6	123083	0	0.0000244	
	c.212A>C (p.(Glu71Ala))	1	15481	0	0.0000323	
	c.215C>A (p.(Ser72Tyr))	1	123086	0	0.00000406	
	c.226C>T (p.(His76Tyr))	1	123090	0	0.00000406	
	c.235A>G (p.(Thr79Ala))	11	123104	0	0.0000447	
	c.226A>G (p.(Tyr89Cys))	1	123103	0	0.00000406	
	c.268A>C (p.(Lys90Gln))	2	138593	0	0.00000722	
	c.301G>T (p.(Ala101Ser))	1	123095	0	0.00000406	
	c.301A>C (p.(Ile104Leu))	1	123089	0	0.00000406	
	c.367C>G (p.(Arg123Gly))	2	15483	0	0.0000646	
	c.367C>T (p.(Arg123Cys))	3	123074	0	0.0000122	
	c.380T>C (p.(Ile127Thr))	1	123105	0	0.00000406	
	c.406T>C (p.(Tyr136His))	7	123118	0	0.0000284	
	Unknown variants	c.11A>T (p.(His4Leu))	1	123081	0	0.00000406
		c.13C>T (p.(Arg5Cys))	3	138566	0	0.0000108
		c.14G>A (p.(Arg5His))	35	138570	1	0.000126
c.23T>A (p.(Leu8His))		1	123101	0	0.00000406	
c.25C>T (p.(Leu9Phe))		2	123098	0	0.00000812	
c.37G>A (p.(Gly13Arg))		1	123095	0	0.00000406	
c.40C>G (p.(Leu14Val))		1	123099	0	0.00000406	
c.50T>C (p.(Val17Ala))		1	123090	0	0.00000406	
c.52T>G (p.(Ser18Ala))		1	123091	0	0.00000406	
c.65C>T (p.(Pro22Leu))		1	15490	0	0.0000323	
c.68C>T (p.(Thr23Met))		7	123046	0	0.0000284	
c.70G>A (p.(Gly24Ser))		1	123117	0	0.00000406	
c.71G>A (p.(Gly24Asp))		1	123116	0	0.00000406	
c.125G>A (p.(Gly42Asp))		1	123117	0	0.00000406	
c.136A>G (p.(Ile46Val))		7	123120	0	0.0000284	
c.140A>G (p.(Asn47Ser))		7	138599	0	0.0000253	
c.151C>A (p.(His51Asn))		4	123118	0	0.0000162	
c.152A>C (p.(His51Pro))		1	123121	0	0.00000406	
c.169G>A (p.(Ala57Thr))		1	123123	0	0.00000406	
c.170C>A (p.(Ala57Asp))		2	123122	0	0.00000812	
c.246G>C (p.(Glu82Asp))		3	123111	0	0.0000122	
c.305T>C (p.(Leu102Pro))		1	123102	0	0.00000406	
c.358T>G (p.(Ser120Ala))		1	122574	0	0.00000408	
c.368G>A (p.(Arg123His))		20	138547	0	0.0000722	
c.377C>A (p.(Thr126Asn))		1	15487	0	0.0000323	
c.409T>A (p.(Ser137Thr))		1	123115	0	0.00000406	
c.413C>T (p.(Thr138Ile))		1	123112	0	0.00000406	
c.431A>G (p.(Asn144Ser))		2	123105	0	0.00000812	

**Table 4** (continued)

	Variant	Allele count	Exome/genome number	Number of homozygotes	Allele frequency
Probably does not affect function variants	c.441A>T (p.(Glu147Asp))	2	123093	0	0.00000812
	c.98T>C (p.(Met33Thr))	1	123126	0	0.0000041
	c.362G>A (p.(Gly121Asp))	2	122012	1	0.0000082
Does not affect function variants	c.383C>T (p.(Ala128Val))	1	15487	0	0.0000323
	c.355G>A (p.(Asp119Asn))	9	138343	0	0.0000325
	c.76G>A (p.(Gly26Ser))	14283	138587	520	<b>0.0515</b>
	c.280G>C (p.(Asp94His))	13	138590	0	0.0000469
	c.328C>A (p.(His110Asn))	152	138574	0	0.000548
	c.361G>A (p.(Gly121Ser))	10	122896	0	0.0000407
	c.370C>T (p.(Arg124Cys))	15	138560	1	0.0000541
	c.371G>A (p.(Arg124His))	205	138537	2	0.00074
	c.385G>A (p.(Ala129Thr))	17	138582	0	0.0000613
	c.386C>T (p.(Ala129Val))	5	138590	0	0.000018
	c.416C>T (p.(Thr139Met))	406	138589	0	0.00147
	c.437A>G (p.(Lys146Arg))	88	138569	0	0.000318

Bold values indicate only that it is the highest allele frequency value in the group

The results show a much higher frequency of amyloidogenic variants of the expected prevalence of disease according to the heretofore described 1:100,000 inhabitants or less [9, 22]. Part of this difference could be explained by incomplete penetrance of the disease, but we believe that there are likely other factors contributing to this fact, such as a fundamentally the underdiagnosis of the disease, as previously discussed [17].

In terms of the amyloidogenic variants described, the most common in the gnomAD database was the c.424G>A (p.(Val142Ile)), with a carrier frequency of 1:332 (MAF 0.00151), followed by c.148G>A (p.(Val50Met)) with a frequency of 1:4924 people (MAF 0.000102). For both variants, ethnic differences were observed—c.424G>A (p.(Val142Ile)) was especially prevalent in the African population (MAF 0.01602; prevalence of 1:31) and c.148G>A (p.(Val50Met)) was especially prevalent in the European population (MAF 0.000179; prevalence of 1:2,792).

The c.424G>A (p.(Val142Ile)) variant is currently recognised as the most common cause of hereditary amyloid heart disease worldwide, which is consistent with the results of our work in which it represents 88% of all affect function variants. Our data show that 92.33% of the carriers of this variants detected in the gnomAD database were of African descent (385 of 417 registered c.424G>A (p.(Val142Ile)) variant), 5.52% were of Latino descent and 1.2% were of European descent. According to the THAOS registry, data from the United States demonstrated similar proportions; of the 91 American patients registered as

c.424G>A (p.(Val142Ile)) carriers, 79 (86.8%) were of African descent compared to 6 (6.6%) of Caucasian descent [23].

There are limited data on the overall prevalence of the c.424G>A (p.(Val142Ile)) variant, but there are several studies that focus on the African-American population. In 1996, Jacobson et al. concluded that the allelic frequency of this variant in people of African descent was 0.02, which was equivalent to 4% of that population [24]. In a new study by Jacobson et al. in 2015, a study of 1688 African-Americans showed an allelic prevalence of 0.0193 [25]. In data released by Buxbaum et al. in 2017, the allele frequency in an African-American population was estimated to be 0.017 [26]. An analysis of gnomAD data resulted in a similar pattern, with a prevalence of 1:31, which indicated that 3.2% of the African population carried the c.424G>A (p.(Val142Ile)) variant (MAF 0.01602).

A recent study of Jacobson et al in 2016, establishes the prevalence of c.424G>A (p.(Val142Ile)) in the African population [27]. The results of the countries studied show a higher prevalence in West African countries (allele frequency 0.0253) and a mean allele frequency of 0.011 in the rest of the countries. These data support the idea of a small number of founder carriers of the amyloidogenic allele in southern West Africa

Revised data showed that the single amyloidogenic variant that appears in homozygosity is c.424G>A (p.(Val142Ile)), probably due to the low number of total cases of other variants. According to the present study,

1.56% of c.424G>A (p.(Val142Ile)) carriers are homozygous; this ratio is slightly below ratios that have been described so far (3.0–9.2%) [28–31].

Accepting that c.424G>A (p.(Val142Ile)) is much more prevalent in African populations, it is possible to find patients with the c.424G>A (p.(Val142Ile)) variant worldwide. According to data from gnomAD, 1:12,666 Europeans carry this variant (MAF 0.00003948), 1:748 people in a Latin population (MAF 0.0006683) and 1:7695 people in a South Asian population carry this amyloidogenic variant (MAF 0.00006497). In the literature there are few cases of patients with no African descent, which were presented as sporadic cases, and there was a small series of cases described in Italy by Capelli et al., in which 5 of the 33 Caucasian patients diagnosed at its centre carried the variant c.424G>A (p.(Val142Ile)) [32–34].

The second most common amyloidogenic variant identified in the gnomAD database was c.148G>A (p.(Val50Met)) (MAF 0.000102; prevalence of 1:4924), which represented 5% of all affect function variants. To date, c.148G>A (p.(Val50Met)) has been described in many patients globally, and it represents more than 50% of the cases of familial amyloid polyneuropathy that have been described in the literature [9]. This discrepancy in the percentage is probably due to the increased aggressiveness of neurological manifestations; a greater awareness by being the first described variant; and, above all, that is present in areas considered endemic, for example, Portugal, Sweden or Japan, where this variant is responsible for almost all cases [7, 9, 12].

As for the association between c.148G>A (p.(Val50Met)) and an ethnic group, our data are consistent with previously reported data in terms of the association with European and Latin-American populations [35]. Of the 25 cases identified in gnomAD, 20 people belong to European populations, with a prevalence of 1:2792 (MAF 0.000179), and 2 people were of Latin descent, with a prevalence of 1:8395 (MAF 0.00005956).

The remaining variants that were classified as affects function occurred less frequently, including c.262A>T (p.(Ile88Leu)), with a prevalence of 1:23,098 (MAF 0.00002165). This variant is primarily associated with people of European ancestry, in which the prevalence is 1:12,668 (MAF 0.00003947). The clinical manifestations are almost exclusively cardiac; in fact, in a number of cases of Caucasian patients, c.262A>T (p.(Ile88Leu)) was the variant that was found most frequently [36]. This is in contrast to the data in African populations, in which the most frequent cardiac variant was c.424G>A (p.(Val142Ile)).

The c.190T>C (p.(Phe64Leu)) variant, described in the literature as producing a mixed phenotype [37, 38], was identified in 1:9900 persons studied in the gnomAD

database (MAF 0.00005051). It was mainly present in people of African descent, with a prevalence of 1:924 (MAF 0.0005411), and only one case was identified in a person in the European population (MAF 0.000007892).

The c.238A>G (p.(Thr80Ala)) variant that only appeared in the European population in our study, with a prevalence of 1:7507 (MAF 0.00006660), has been described previously in a cluster in Northern Ireland, where it was estimated that 1.1% of the population carries these variant, and in isolated cases in England and Scotland [22, 39].

Cases of c.349G>T (p.(Ala117Ser)) that appeared in the gnomAD database were all people of an Eastern Asia population, where the prevalence was estimated at 1:9,431 (MAF 0.000106). This amyloidogenic variant has been described in the literature as one of the most common in data from Chinese populations [40], which is consistent with our findings.

In the group of variants that probably affects function there is predominance according to ethnicity in some variants. The variants c.367C>T (p.(Arg123Cys)) and c.367C>G (p.(Arg123Gly)) appear in gnomAD only in European population, other frequent variants as c.235A>G (p.(Thr79Ala)) or c.406T>C (p.(Thr136His)) are represented, almost exclusively, for Latin population. Therefore, in this group there is also an association between the variants and the ethnic groups.

The data derived from the present study supports the idea of an underdiagnosis of ATTR-m. Some current studies indicate this trend, concluding that the overall prevalence figure is higher than what has been reported to date [7, 17]. The prevalence of ATTR-m polyneuropathy has been estimated to be 5000 to 10,000 cases of disease worldwide, and some authors have concluded that it could be as high as 40,000 cases [17]. Other studies indicated that 32% of patients are undiagnosed [35]. For ATTR-m with cardiomyopathy, there are an estimated 40,000 cases [17]. This is thought to be an underestimation because, for example, 5% patients with hypertrophic cardiomyopathy have ATTR-m [18].

According to the data obtained in this work and comparing it with the current literature, the prevalence of the c.424G>A (p.(Val142Ile)) variant is well established in the African population, but not in the rest of the populations, with lower frequency such as in the European population. The problem of underdiagnosis of this variant is frequent in all population. For other variants, including c.148G>A (p.(Val50Met)), there is an underestimation of prevalence and underdiagnosis more notable in non-endemic areas than in those regions recognised as endemic. This may be caused in part due to the low clinical suspicion and the lack of family history of the patients in the non-endemic areas.

Because of large population studies like gnomAD, the prevalence of variants involved in various diseases can be

studied; [41–43] however, one of the apparent limitations of the use of these databases in amyloidosis ATTR is that the prevalence of amyloidogenic variants in the population is not the same as disease prevalence, so the data should be taken with caution. In addition, phenotype data are not available for gnomAD samples. That is, this study describes the frequency of people carriers, presymptomatic carriers should be identified and receive adequate follow-up so that in the event of the occurrence of symptoms, pharmacological treatment should be instituted without delay [12].

Another fact to take into account is that affects function variants are associated to the formation of misfolded proteins. But for new variants included in other groups, these studies are not available, it would be an interesting study to better understand of the new variants.

In addition, it should be considered that not all populations are equally represented, with the European population being the majority. Populations like Asian or Latino should be more present to have more appropriate conclusions to these groups.

In conclusion, although recent data suggest that the actual prevalence of amyloidosis ATTR-m could be much higher than what has been reported to date, data provided by an analysis of the gnomAD database are even more compelling, opening the possibility that might be hundreds of thousands of people having potentially disease-causing variants.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## References

- Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *Lancet*. 2016;387:2641–54.
- Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJM, et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*. 2016;23:209–13.
- Gertz MA, Benson MD, Dyck PJ, Grogan M, Coelho T, Cruz M, et al. Diagnosis, prognosis, and therapy of transthyretin amyloidosis. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66:2451–66.
- Sekijima Y. Transthyretin (ATTR) amyloidosis: clinical spectrum, molecular pathogenesis and disease-modifying treatments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86:1036–43.
- Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon B, Ikeda S, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:31.
- Mutations in Hereditary Amyloidosis [Internet]. Available from <http://www.amyloidosismutations.com/>
- Galant NJ, Westermark P, Higaki JN, Chakrabarty A. Transthyretin amyloidosis: an under-recognized neuropathy and cardiomyopathy. *Clin Sci*. 2017;131:395–409.
- Coelho T, Maurer MS, Suhr OB. THAOS – The Transthyretin Amyloidosis Outcomes Survey: initial report on clinical manifestations in patients with hereditary and wild-type transthyretin amyloidosis. *Curr Med Res Opin*. 2013;29:63–76.
- Hawkins PN, Ando Y, Dispenzeri A, Gonzalez-Duarte A, Adams D, Suhr OB. Evolving landscape in the management of transthyretin amyloidosis. *Ann Med*. 2015;47:625–38.
- Parman Y, Adams D, Obici L, Galán L, Guergueltcheva V, Suhr OB, et al. Sixty years of transthyretin familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Europe: where are we now? A European network approach to defining the epidemiology and management patterns for TTR-FAP. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(Suppl 1):S3–S13.
- Reinés JB, Vera TR, Martín UM, Serra HA, Millán JMD, Lezaun CG, et al. Epidemiology of transthyretin-associated familial amyloid polyneuropathy in the Majorcan area: Son Llàtzer Hospital descriptive study. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:29.
- Obici L, Kuks JB, Buades J, Adams D, Suhr OB, Coelho T, et al. Recommendations for presymptomatic genetic testing and management of individuals at risk for hereditary transthyretin amyloidosis. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(Suppl 1):S27.
- Conceição I, González-Duarte A, Obici L, Schmidt HHJ, Simoneau D, Ong ML, et al. Red-flag symptom clusters in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2016;21:5–9.
- Hellman U, Alarcon F, Lundgren H-E, Suhr OB, Bonaiti-Pellié C, Planté-Bordeneuve V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. *Amyloid*. 2008;15:181–6.
- Lemos C, Coelho T, Alves-Ferreira M, Martins-da-Silva, A, Sequeiros, J, Mendonça, D, et al. Overcoming artefact: anticipation in 284 Portuguese kindreds with familial amyloid polyneuropathy (FAP) ATTRV30M. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:326–30.
- Molina OG, Judge D, Campbell W, Chahal H, Mugmon M. Transthyretin cardiac amyloidosis: an under-diagnosed cause of heart failure. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2014;4:25500.
- Schmidt HH, Waddington-Cruz M, Böttner MF, Carter JA, Chopra AS, Hopps M, et al. Estimating the global prevalence of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Muscle Nerve*. 2018;57:829–37.
- Damy T, Costes B, Hagège AA, Donal E, Eicher JC, Slama M, et al. Prevalence and clinical phenotype of hereditary transthyretin amyloid cardiomyopathy in patients with increased left ventricular wall thickness. *Eur Heart J*. 2015;37:1826–34.
- Lek, M, Karczewski, K, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536:285–91.
- Human Genome Variation Society. [Internet]. Available from <http://varnomen.hgvs.org>
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405–24.
- Lachmann HJ, Booth DR, Booth SE, Bybee A, Gilbertson JA, Gillmore JD, et al. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *N Engl J Med*. 2002;346:1786–91.
- Maurer MS, Hanna M, Grogan M, Dispenzieri A, Wittes R, Drachman B, et al. Genotype and phenotype of transthyretin cardiac amyloidosis in the United States: THAOS (The Transthyretin Amyloid Outcome Survey). *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:161–72.

24. Jacobson DR, Pastore R, Pool S, Malendowicz S, Kane I, Shivji A, et al. Revised transthyretin Ile 122 allele frequency in African-Americans. *Hum Genet.* 1996;98:236–8.
25. Jacobson DR, Alexander AA, Tagoe C, Buxbaum JN. Prevalence of the amyloidogenic transthyretin (TTR) V122I allele in 14 333 African-Americans. *Amyloid.* 2015;22:171–4.
26. Buxbaum J, Alexander A, Koziol J, Tagoe C, Fox E, Kitzman D. Significance of the amyloidogenic transthyretin Val 122 Ile allele in African Americans in the Arteriosclerosis Risk in Communities (ARIC) and Cardiovascular Health (CHS) Studies. *Am Heart J.* 2010;159:864–70.
27. Jacobson DR, Alexander AA, Tagoe C, Garvey WT, Williams SM, Tishkoff S, et al. The prevalence and distribution of the amyloidogenic transthyretin (TTR) V122I allele in Africa. *Mol Genet Genom Med.* 2016;4:548–56.
28. Dungu JN, Papadopoulou SA, Wykes K, Mahmood I, Marshall J, Valencia O, et al. Afro-Caribbean Heart Failure in the United Kingdom: cause, outcomes, and ATTR V122I cardiac amyloidosis. *Circ Hear Fail.* 2016;9:e003352.
29. Yamashita T, Asl KH, Yazaki M, Benson MD. A prospective evaluation of the transthyretin Ile122 allele frequency in an African-American population. *Amyloid.* 2005;12:127–30.
30. Reddi H V., Jenkins S, Theis J, Thomas BC, Connors LH, Van Rhee F, et al. Homozygosity for the V122I mutation in transthyretin is associated with earlier onset of cardiac amyloidosis in the African American population in the seventh decade of life. *J Mol Diagn.* 2014;16:68–74.
31. Gillmore JD, Booth DR, Pepys MB, Hawkins PN. Hereditary cardiac amyloidosis associated with the transthyretin Ile122 mutation in a white man. *Heart.* 1999;82:e2–e2.
32. Cappelli F, Frusconi S, Bergesio F, Grifoni E, Fabbri A, Giuliani C, et al. The Val142Ile transthyretin cardiac amyloidosis: Not only an Afro-American pathogenic variant? A single-centre Italian experience. *J Cardiovasc Med.* 2016;17:122–5.
33. Asl KH, Nakamura M, Yamashita T, Benson MD. Cardiac amyloidosis associated with the transthyretin Ile122 mutation in a Caucasian family. *Amyloid.* 2001;8:263–9.
34. Nienhuis HL, Bijzet J, Hazenberg BP. The prevalence and management of systemic amyloidosis in Western countries. *Kidney Dis.* 2016;2:10–19.
35. Plante-Bordeneuve V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy: an update. *J Neurol.* 2018;265:976–83.
36. Rapezzi C, Quarta CC, Obici L, Perfetto F, Longhi S, Salvi F, et al. Disease profile and differential diagnosis of hereditary transthyretin-related amyloidosis with exclusively cardiac phenotype: an Italian perspective. *Eur Heart J.* 2012;34:520–8.
37. Damy T, Judge DP, Kristen AV, Berthet K, Li H, Aarts J. Cardiac findings and events observed in an open-label clinical trial of tafamidis in patients with non-Val30Met and non-Val122Ile hereditary transthyretin amyloidosis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2015;8:117–27.
38. Wixner J, Mundayat R, Karayal ON, Anan I, Karling P, Suhr OB. THAOS: gastrointestinal manifestations of transthyretin amyloidosis - common complications of a rare disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:61
39. Reilly MM, Staunton H, Harding AE. Familial amyloid polyneuropathy (TTRala60) in north west Ireland: a clinical, genetic, and epidemiological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;59:45–9.
40. Meng LC, Lyu H, Zhang W, Liu J, Wang ZX, Yuan Y. Hereditary transthyretin amyloidosis in eight Chinese families. *Chin Med J.* 2015;128:2902.
41. Hughes BG, Harrison PM, Hekimi S. Estimating the occurrence of primary ubiquinone deficiency by analysis of large-scale sequencing data. *Sci Rep.* 2017;7:17744.
42. Song W, Gardner SA, Hovhannisyan H, Natalizio A, Weymouth KS, Chen W, et al. Exploring the landscape of pathogenic genetic variation in the ExAC population database: insights of relevance to variant classification. *Genet Med.* 2016;18:850–4.
43. Nicolas G, Charbonnier C, Campion D, Veltman JA. Estimation of minimal disease prevalence from population genomic data: application to primary familial brain calcification. *Am J Med Genet Part B.* 2018;177:68–74.





# Revista Clínica Española

www.elsevier.es/rce



## ORIGINAL BREVE

# Presentación atípica de amiloidosis por transtiretina en un área no endémica

A. Gracia Gutiérrez<sup>a,\*</sup>, E. Bueno Juana<sup>a</sup>, C. Lahuerta Pueyo<sup>b</sup>, S. Menao Guillén<sup>b</sup>, J. Escota Villanueva<sup>c</sup> y M.Á. Aibar Arregui<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

<sup>c</sup> Departamento de Cardiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. ISS-Aragón, Zaragoza, España

Recibido el 20 de julio de 2018; aceptado el 17 de septiembre de 2018

### PALABRAS CLAVE

Amiloidosis hereditaria;  
Transtiretina;  
Miocardiopatía;  
Polineuropatía;  
Enfermedad heterogénea

### Resumen

**Antecedente y objetivo:** Existen 2 tipos de amiloidosis producidas por depósitos de transtiretina, el tipo salvaje (wt-ATTR) y el tipo mutante (m-ATTR), transmitido por herencia autosómica dominante con penetrancia variable, manifestándose con clínica neurológica y/o cardíaca. Describimos 3 familias afectadas por m-ATTR diagnosticadas en un área no endémica.

**Material y métodos:** Se estudiaron 63 pacientes con alta sospecha de amiloidosis TTR. Posteriormente, el diagnóstico se realizó por amplificación mediante PCR de ADN y en los casos positivos se estudiaron a los familiares de primer grado.

**Resultados:** Se detectaron 7 casos positivos para m-ATTR, distribuidos en 3 familias (Glu74Gln, Val142Ile en heterocigosis y Val142Ile en homocigosis) y 3 casos de variantes no patogénicas.

**Conclusiones:** La amiloidosis hereditaria por TTR es una enfermedad rara, pero presente en áreas no endémicas, por lo que debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de los pacientes con polineuropatía y/o insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Todos los derechos reservados.

### KEYWORDS

Hereditary amyloidosis;  
Transthyretin;  
Cardiomyopathy;  
Polyneuropathy;

### Atypical presentation of transthyretin amyloidosis in a non-endemic area

### Abstract

**Background and objective:** There are 2 types of amyloidosis caused by transthyretin deposits: the wild type (wt-ATTR) and the mutant type (m-ATTR), transmitted by autosomal dominant inheritance with variable penetrance, manifesting with neurological and/or cardiac symptoms. We report on 3 families affected by m-ATTR diagnosed in a nonendemic area.

**Abreviaturas:** ATTR:, amiloidosis por transtiretina; w-ATTR:, transtiretina tipo salvaje; m-ATTR:, transtiretina tipo mutante; TTR:, transtiretina; NT-proBNP, N: terminal péptido natriurético cerebral; DPD:, gammagrafía con difosfonopropanodocarboxílico.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [agraciagut@gmail.com](mailto:agraciagut@gmail.com) (A. Gracia Gutiérrez).

<https://doi.org/10.1016/j.rce.2018.09.011>

0014-2565/© 2018 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Gracia Gutiérrez A, et al. Presentación atípica de amiloidosis por transtiretina en un área no endémica. Rev Clin Esp. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2018.09.011>

Heterogeneous disease

**Material and methods:** We studied 63 patients with a high suspicion of ATTR. The diagnosis was subsequently performed by magnification through polymerase chain reaction of DNA. For the positive cases, we studied the first-degree relatives.

**Results:** We detected 7 positive cases of m-ATTR, distributed among 3 families (Glu74Gln, Val142Ile in heterozygosity and Val142Ile in homozygosity), and 3 cases of nonpathogenic variants.

**Conclusions:** Hereditary ATTR is a rare disease but is present in nonendemic areas and should therefore be considered in the differential diagnosis of patients with polyneuropathy and/or heart failure with preserved ejection fraction.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). All rights reserved.

## Introducción

Las amiloidosis sistémicas son enfermedades caracterizadas por el depósito extracelular de material amiloide<sup>1</sup>. Los tipos más frecuentes de amiloidosis son la primaria o AL, la secundaria o AA y la amiloidosis por transtiretina (ATTR)<sup>1,2</sup>.

La transtiretina (TTR) es la proteína transportadora de tiroxina y retinol<sup>3</sup>; presenta una tendencia natural a formar fibrillas amiloides que se depositan causando daño y toxicidad celular<sup>4,5</sup>. Hay 2 tipos de amiloidosis por TTR, una variante senil o *Wild Type ATTR* (ATTR-wt) y otra debida a variantes patogénicas del gen de la TTR (ATTR-m) de la que hay descritas alrededor de 100 variantes patogénicas<sup>1,3,6-8</sup>.

La ATTR-m es una enfermedad progresiva y mortal, con gran variabilidad en las manifestaciones clínicas, predominantemente neurológicas en forma de neuropatía sensitivo-motora y cardíacas en forma de miocardiopatía. Esta variabilidad depende de la variante genética, transmitida de forma autosómica dominante con una penetrancia fenotípica variable, y de factores como el área geográfica, lo que se traduce en una importante dificultad para su diagnóstico<sup>3,5,7,9,10</sup>.

## Material y métodos

Se seleccionaron 63 pacientes con sospecha de amiloidosis por TTR en el Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, atendidos en los servicios de Medicina Interna o Cardiología entre el 1 de mayo de 2016 y el 30 junio de 2017. El estudio fue autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

### Criterios de inclusión:

- Insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada sin historia de enfermedad cardíaca valvular o hipertensión arterial.
- Antecedentes de disautonomía o síndrome del túnel del carpo (STC) bilateral.
- Polineuropatía de etiología no filiada.
- Pruebas de imagen compatibles con amiloidosis: gammagrafía (captación de <sup>99m</sup>Tc-DPD a nivel cardíaco), ecocardiograma (engrosamiento de pared libre ventrículo

izquierdo [ $> 12$  mm] o del septo [ $> 13$  mm] y/o patrón granular), RMN cardíaca (realce de gadolinio tardío).

- ENG/EMG compatible con polineuropatía amiloidótica familiar.
- Antecedentes de amiloidosis no filiada.

### Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de edad.
- Rechazo del paciente.

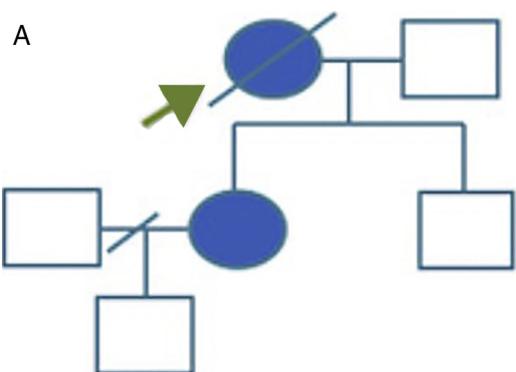
Se incluyeron los pacientes que cumplían 2 o más criterios para obtener una muestra con alta probabilidad de ATTR. Una vez seleccionados se informó a los pacientes, se solicitó el pertinente consentimiento y se realizó el estudio genético mediante secuenciación tipo Sanger. En los pacientes con resultado positivo se ofreció la posibilidad de estudiar a los familiares de primer grado.

## Resultados

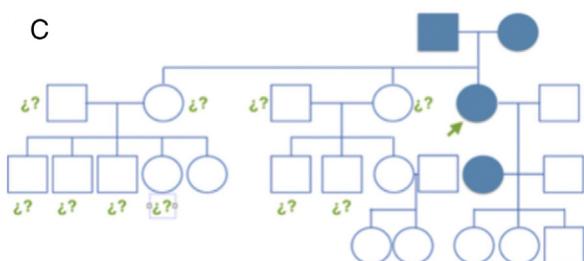
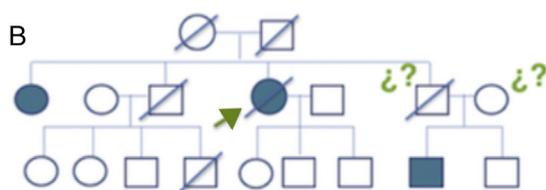
Hemos estudiado 63 pacientes, la mitad de ellos varones, con una edad media de 73,08 ( $\pm 17,8$ ) años. El 95% eran españoles. Los síntomas que presentaron al diagnóstico fueron predominantemente cardíacos (disnea, dolor torácico y edemas) y neurológicos (parestias y debilidad muscular). Se obtuvieron 7 casos positivos para ATTR-m distribuidos en 3 familias y 3 polimorfismos no asociados a enfermedad.

A continuación se describen los 3 casos con variantes genéticas de la TTR.

**Familia A.** Variante genética Glu74Gln (fig. 1). Mujer de 43 años, originaria de Rumanía, sin antecedentes familiares y con historia de STC bilateral que ingresó por insuficiencia cardíaca (IC) descompensada. A lo largo de su ingreso se le realizaron numerosas pruebas complementarias hallando una miocardiopatía restrictiva en ecocardiograma y sospecha de amiloidosis en RMN cardíaca; se realizó el estudio genético hallando la variante genética Glu74Gln. Encontrándose en lista de espera para doble trasplante cardíaco y hepático, falleció tras sufrir un ictus isquémico masivo. Se realizó consejo genético a sus 2 hijos, un varón sano y una hija portadora de la misma variante genética en



**Figura 1** Familia A. Madre e hijas portadoras de la variante genética Glu74Gln.



**Figura 2** Familia B. Hermanas y sobrino portadores de la variante genética Val142Ile. Familia C. Madre con la variante genética Val142Ile en forma homocigota. Hija portadora de la misma variante genética.

heterocigosis que se encuentra actualmente asintomática y en seguimiento en consultas de medicina interna.

**Familia B.** Variante genética Val142Ile, en heterocigosis (fig. 2). Mujer de 86 años española, sin antecedentes familiares y con historia de HTA, fibrilación auricular e IC. Ingresó por un cuadro de IC descompensada. En las pruebas realizadas presentaba una hipertrofia ventricular simétrica sugestiva de amiloidosis senil; un estudio de gammagrafía monoclonal negativo, valores de NT-proBNP elevados y PAAF de grasa abdominal negativa. No se realizó gammagrafía. Se solicitó estudio genético, obteniendo la variante genética Val142Ile. Se estudió también a su hermana de 90 años, con antecedentes de HTA, IC y degeneración macular, que ingresó por síncope secundario a un bloqueo auriculoventricular completo. En el ecocardiograma valvulopatía moderada y fracción de eyección conservada. Tampoco se realizó estudio gammagráfico ni biopsia. En el estudio genético se detectó la misma variante que su hermana, Val142Ile. Se realizó el estudio al resto de la familia, detectando la misma variante genética en un sobrino de 42 años, asintomático y con pruebas complementarias compatibles con la normalidad.

**Familia C.** Variante genética Val142Ile, en homocigosis (fig. 2). Mujer de 59 años, originaria de Ghana, con antecedentes médicos de HTA, DM tipo 2, dislipidemia, ictus lacunar sin secuelas, TEP crónico y fibrosis pulmonar, portadora de oxigenoterapia domiciliaria. En el ecocardiograma se observa miocardiopatía infiltrativa con severa hipertrofia concéntrica, función sistólica conservada, patrón diastólico restrictivo e hipertensión pulmonar severa, y la RMN cardíaca sugiere como primera opción amiloidosis cardíaca. Presentaba disnea en clase funcional II-III de la NYHA. También se realizó una gammagrafía miocárdica revelando una intensa captación en ambos ventrículos. Se le realizó una PAAF de grasa subcutánea que fue negativa y un estudio genético positivo para ATTR debido a la variante genética Val142Ile en forma de homocigosis. Se ha realizado el estudio genético a su hija, siendo portadora de la misma variante patológica, y a 2 de sus sobrinas con resultados negativos. Se presupone que los padres del caso índice son portadores de la variante genética por la afectación en homocigosis del caso índice.

## Discusión

Se presentan las variantes patológicas de 3 familias con clínica compatible y estudio genético positivo para variantes amiloidogénicas. El área de Zaragoza (Aragón) es una zona no endémica para ATTR-m y, aunque evidentemente se trata de una muestra muy seleccionada y los resultados de este estudio no pueden extrapolarse a la población general, ni entenderse como un estudio de prevalencia, no es menos cierto que la presencia de 3 casos de una enfermedad considerada rara, en una muestra de tan solo 63 pacientes, tiene cierto valor y apoya la idea de que estamos ante una enfermedad infradiagnosticada.

La primera familia presenta la variante patológica Glu74Gln, cuya afectación inicial suele ser el STC, y posteriormente manifestaciones cardíacas<sup>11</sup>. Esta variante genética ha sido descrita en 2 individuos rumanos, además de nuestro caso índice<sup>11</sup>. Estos datos apoyan la idea de que existen clústeres en regiones consideradas no endémicas, de las que no disponemos de datos.

Las otras 2 familias presentan la variante patológica Val142Ile, una en heterocigosis y la otra en homocigosis. Según lo descrito en la literatura esta variante genética es la más frecuente en EE. UU. (23%) sobre todo en personas de ascendencia afroamericana, siendo rara en otros grupos étnicos<sup>9</sup>; su frecuencia en población caucásica e hispana en EE. UU. es de 0,44% y 0%<sup>9</sup>. En nuestra población la primera familia descrita es española, y la segunda de Ghana, lo que demuestra que pueden darse casos en zonas no endémicas, autóctonos o importados.

El alelo Val142Ile se presenta por lo general en forma de heterocigosis y con clínica cardíaca<sup>5,6</sup>. Nuestras 2 familias comenzaron con afectación cardíaca y, en la paciente homocigota, con afectación pulmonar catalogada de «fibrosis» que no hemos podido filiar por la negativa a realizar una biopsia pulmonar. La afectación pulmonar en la ATTR-m consiste fundamentalmente en una amiloidosis alveolar septal difusa que puede confundirse con fibrosis pulmonar si no se busca específicamente el depósito de amiloide<sup>12</sup>.

En nuestra serie se presentan 2 familias con la variante Val142Ile, una de las pacientes en homocigosis y los demás en heterocigosis. Aunque no es la norma, habitualmente los casos homocigotos desarrollan clínica unos 10 años antes que los heterocigotos<sup>13,14</sup>.

Determinadas variantes génicas se caracterizan por presentar una fuerte correlación genotipo/fenotipo, estando asociadas con enfermedad predominantemente neurológica (Val50Met), cardíaca (Val142Ile) o mixta (Thr80Ala)<sup>15</sup>. No obstante, es una enfermedad con una gran variabilidad fenotípica que dificulta su diagnóstico<sup>15,16</sup>.

Esta dificultad es mayor en zonas no endémicas y en casos atípicos como los que presentamos.

El primero destaca por ser una variante rara e importada, el segundo por presentar una variante con afectación homocigota y, probablemente con afectación pulmonar; y el tercero por diagnosticarse en una familia autóctona de un área no endémica y afecta de una variante patogénica casi exclusiva de población afroamericana.

Consideramos que este estudio resalta la necesidad de incluir la ATTR en nuestro diagnóstico diferencial de enfermedades tan frecuentes como es la neuropatía periférica y la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada, sobre todo en pacientes jóvenes sin una clara etiología.

Como limitación de nuestro trabajo hay que tener en cuenta el escaso tamaño muestral, debido a que se decidió exigir 2 criterios para la inclusión de los pacientes y así aumentar la posibilidad de reclutar pacientes positivos; sin embargo, con uno de los criterios mencionados podría ser suficiente para incluirlos en el diagnóstico diferencial de ATTR.

## Conclusiones

La ATTR es una enfermedad rara que se manifiesta fundamentalmente en áreas endémicas, pero que puede aparecer en cualquier población, tanto en pacientes autóctonos como en formas importadas. Mantener un alto índice de sospecha es fundamental para poner en marcha los métodos diagnósticos adecuados que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad.

## Financiación

El presente trabajo ha sido financiado parcialmente por Pfizer.

## Bibliografía

1. Wechalekar A, Gilmore J, Hawkins P. Systemic amyloidosis. *Lancet*. 2106;387:2641-2654.

2. Sipe J, Benson M, Buxbaum J, Ikeda S, Merlini G, Saraiva M, et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification international society of amyloidosis 2016 nomenclature guidelines. *Amyloid*. 2016;23:209-13.
3. Dzung JN, Anderson LJ, Whelan CJ, Hawkins PN. Cardiac transthyretin amyloidosis. *Heart*. 2012;98:1546-54.
4. Gertz MA, Benson MD, Dyck PJ, Grogan M, Coelho T, Cruz M, et al. Diagnosis, prognosis and therapy of transthyretin amyloidosis. *JACC*. 2015;66:2451-66.
5. Galant N, Westermark P, Higaki J, Chakrabartty. Transthyretin amyloidosis: An under-recognized neuropathy and cardiomyopathy. *Clin Sci*. 2017;131:395-409.
6. Ton VK, Mukherjee M, Judge DP. Transthyretin cardiac amyloidosis: Pathogenesis, treatments, and emerging role in heart failure with preserved ejection fraction. *Clin Med Insights Cardiol*. 2015;8:39-44.
7. Suhr O, Lundgren E, Westermark P. One mutation, two distinct disease variants: Unravelling the impact of transthyretin amyloid fibril composition. *J Intern Med*. 2017;281:337-47.
8. Nienhuis H, Bijzet J, Hazenberg B. The prevalence and management of systemic amyloidosis in western countries. *Kidney Dis*. 2016;2:1-9.
9. Ando Y, Coelho T, Berk J, Waddington M, Ericzon B, Ikeda S, et al. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *J Rare Dis*. 2013;8:31.
10. Ritts A, Cornell R, Swiger K, Singh J, Goodman S, Lenihan DJ. Current concepts of cardiac amyloidosis. Diagnosis, clinical management, and the need for collaboration. *Heart Failure Clin*. 2017;13:409-16.
11. Torres-Courchoud I, Martínez-Gil R, Aibar-Arregui MA, Andrés-Gracia A, Torralba-Cabeza MA. Amiloidosis cardíaca secundaria a la mutación familiar Glu54Gln del gen de la transtiretina. *Rev Esp Cardiol*. 2017;70:297-9.
12. Khor A, Colby T. Amyloidosis of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141:247-54.
13. Buxbaum JN, Ruberg FL. Transthyretin V122I (pV142I)\* cardiac amyloidosis: An age-dependent autosomal dominant cardiomyopathy too common to be overlooked as a cause of significant heart disease in elderly African Americans. *Genet Med*. 2017;19:733-42.
14. Reddi H, Jenkins S, Theis J, Thomas B, Connors LH, Van Rhee F, et al. Homozygosity for the V122I mutation in transthyretin is associated with earlier onset of cardiac amyloidosis in the african american population in the seventh decade of life. *J Mol Diagn*. 2014;16:68-74.
15. Gillmore J, Maurer M, Falk R, Merlini G, Damy T, Dispenzieri A, et al. Non-biopsy diagnosis of cardiac transthyretin amyloidosis. *Circulation*. 2016;133:2404-12.
16. Maurer M, Elliott P, Comenzo R, Semigran M, Rapezzi C. Addressing common questions encountered in the diagnosis and management of cardiac amyloidosis. *Circulation*. 2017;135:1357-77.