



UNIVERSITÀ DI PISA

Scuola di Specializzazione in

Malattie dell'Apparato Cardiovascolare

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica,

Molecolare e dell'Area Critica

Tesi di Specializzazione

**Risonanza magnetica cardiaca e scintigrafia con
difosfonati nella diagnosi di amiloidosi cardiaca**

Candidato: Dr. Chrysanthos Grigoratos

Relatore: Prof. Mario Marzilli

Correlatore: Prof. Michele Emdin

Anno Accademico 2014-2015

Indice

| | |
|---|-----------|
| Riassunto..... | 3 |
| Introduzione..... | 5 |
| Definizione di amiloidosi e caratteristiche generali..... | 5 |
| Proprietà delle proteine amiloidi | 7 |
| Patogenesi..... | 10 |
| Classificazione | 12 |
| Caratteristiche cliniche | 19 |
| Diagnosi di amiloidosi | 24 |
| Prognosi | 31 |
| Terapia delle varie forme di amiloidosi | 34 |
| La risonanza magnetica | 42 |
| La scintigrafia con difosfonati..... | 51 |
| Scopo dello studio | 54 |
| Materiali e metodi | 55 |
| Analisi statistica | 65 |
| Risultati..... | 66 |
| Discussione | 81 |
| Limiti..... | 87 |
| Conclusioni..... | 88 |
| Bibliografia | 90 |
| Ringraziamenti..... | 99 |

Riassunto

Introduzione: L'amiloidosi cardiaca (*cardiac amyloidosis*, CA) rappresenta una patologia sistemica, che richiede uno sforzo diagnostico multidisciplinare, ancora oggi sottodiagnosticata. L'*imaging* con la risonanza magnetica cardiaca (*cardiac magnetic resonance*, CMR) tramite la valutazione del *late gadolinium enhancement* (LGE) e la scintigrafia con difosfonati hanno dimostrato recentemente di essere due utili strumenti nella sua diagnosi. A tutt'oggi mancano studi relativi alla distribuzione segmentaria del tracciante ed alla valutazione dell'estensione dell'interessamento cardiaco nella CA mediante scintigrafia multiplanare (*single photon emission computed tomography*, SPECT), che al confronto tra le due metodiche nei sottotipi di CA.

Scopo del lavoro: Confrontare i parametri qualitativi e quantitativi di distribuzione del tracciante alla SPECT e la presenza di LGE alla CMR in pazienti con CA da transtiretina (TTR-CA) e da catene leggere (AL-CA). Valutare la *feasibility* di CMR e scintigrafia con difosfonati in pazienti con CA. Valutare l'accuratezza diagnostica della scintigrafia con idrossi-metilen-difosfonato nella diagnosi di CA.

Risultati: Ottantadue pazienti sono stati sottoposti a scintigrafia con difosfonati presso la Fondazione Toscana G. Monasterio di Pisa tra Gennaio 2011 e Maggio 2015 in relazione al sospetto clinico di CA. Il 44% di loro non ha eseguito una CMR e pertanto esclusi dallo studio con il 30% di loro a causa di controindicazioni assolute o relative all'esecuzione dell'esame di CMR. Quarantasei pazienti sono stati sottoposti a entrambi gli esami e hanno rappresentato la nostra popolazione di studio. I gruppi di pazienti con TTR-CA e AL-CA non hanno mostrato differenze statisticamente significative in termini di volumi, masse e spessori biventricolari e presenza di LGE con l'eccezione del gradiente LGE apice-base osservato nel 26% dei pazienti con TTR-CA ed in nessun paziente con AL-CA ($p < 0.05$).

Nella diagnosi generica di CA, la scintigrafia ha mostrato una specificità del 100%, sensibilità del 66% e la CMR del 100% sia di specificità che di sensibilità. Nella

diagnosi di TTR-CA, la scintigrafia una specificità del 100% e sensibilità del 95%, mentre la CMR una sensibilità del 100% ed una specificità del 67%.

Una valutazione quantitativa SPECT mediante il numero dei conti per voxel per minuto (cvm) > 9851 ha permesso di individuare i segmenti verosimilmente interessati da depositi di amiloide con una specificità e sensibilità del 87%. Il confronto dei dati qualitativi per segmento ha evidenziato una concordanza tra SPECT e CMR del 93% ($p < 0.0001$) per il ventricolo sinistro ed una concordanza del 84% ($p < 0.005$) per il ventricolo destro. Dall'analisi ROC si evince che il *cut-point* di cvm > 12906 individua i segmenti descritti come LGE positivi con una specificità del 92,1% ed una sensibilità del 71,6%.

Anche la valutazione quantitativa CMR mediante *T1 mapping* correla ($r: 0,32$, $p < 0.005$) con i cvm.

Conclusioni: L'uso combinato di CMR e SPECT permette di sfruttare l'elevata accuratezza di CMR nella diagnosi generica di AC e l'elevata accuratezza diagnostica della scintigrafia nell'identificare le forme TTR-CA. Il confronto tra SPECT e CMR nella valutazione della distribuzione segmentaria biventricolare dell'interessamento amiloidotico è altamente concordante tra le due metodiche nella TTR-CA.

L'utilizzo della SPECT potrebbe avere in futuro un ruolo importante anche nella valutazione di progressione di malattia e nella valutazione dell'efficacia di nuove terapie farmacologiche specifiche per le forme TTR-CA.

Introduzione

Definizione di amiloidosi e caratteristiche generali

Le amiloidosi sono un gruppo di patologie caratterizzate da un'alterata conformazione di proteine autologhe o loro frammenti, le quali aggregano in fibrille e si depositano a livello extracellulare in vari organi e tessuti dell'organismo¹.

Il termine amiloidefu coniato dal patologo Virchow, nel 1854, per descrivere i depositi, rilevati su tessuti autoptici, di una sostanza che erroneamente egli identificò con l'amido o la cellulosa, in base al colore assunto dopo colorazione con acido solforico e iodio. In realtà, l'amiloide deriva dall'assemblarsi di precursori proteici anomali che assumono una struttura secondaria a foglietto β ripiegato e formano depositi fibrillari in associazione con altre sostanze di natura non proteica. A seconda della natura biochimica del precursore della proteina amiloide, le fibrille si possono depositare localmente o possono coinvolgere a livello sistemico virtualmente ogni organo.

Nel passato le amiloidosi sono state classificate in due grandi gruppi, costituiti, appunto, dalle *amiloidosi sistemiche* e dall'*amiloidosi localizzata*; tali gruppi comprendevano, tuttavia, forme eterogenee dal punto di vista biochimico ed eziopatogenetico. Una migliore comprensione della complessità chimica delle fibrille di amiloide ha determinato, negli ultimi decenni, la necessità di adottare un sistema di nomenclatura chiaro e uniformemente riconosciuto, in cui la classificazione delle amiloidosi si fondasse sulla natura biochimica delle proteine formanti le fibrille².

Le linee guida per la nomenclatura e la classificazione dell'amiloide e delle amiloidosi sono state aggiornate nel 2010 da parte del *Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis*². Ad oggi, sono state identificati almeno 27 tipi di amiloidosi, sulla base delle diverse proteine in grado di formare fibrille di amiloide in vivo (**Tabella 1**).

Tabella 1. Proteine costituenti le fibrille di amiloide e i loro precursori.

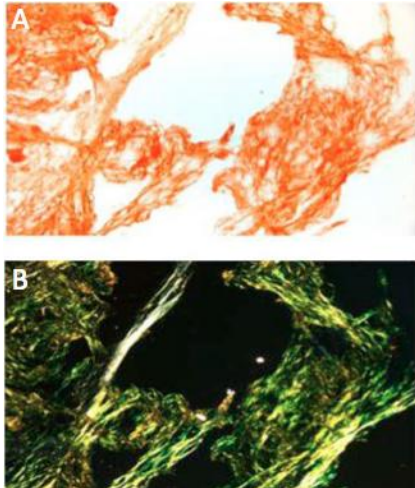
| Proteina amiloide | Precursore proteico | Forma sistemica (S) o localizzata (L) | Sindrome o tessuto coinvolto |
|--------------------------|--|--|--|
| AL | Catene leggere delle immunoglobuline | S,L | Primaria, associata a mieloma multiplo |
| AH | Catene pesanti delle immunoglobuline | S,L | Primaria, associata a mieloma multiplo |
| A β 2M | β 2-microglobulina | S | Emodialisi cronica |
| ATTR | Transtiretina | L S | Articolazioni Sistemica senile, familiare |
| AA | Amiloide sierica AA (apoSAA) | L | Tenosinovite |
| AApoA-I | Apolipoproteina AI | S | Secondaria, reattiva |
| AApoA-II | Apolipoproteina AII | S | Familiare |
| AApoA-IV | Apolipoproteina AIV | L | Aorta, menisco |
| AGel | Gelsolina | S | Familiare |
| ALys | Lisozima | S | Familiare |
| AFib | Catena α del fibrinogeno | S | Familiare |
| ACys | Cistatina C | S | Familiare |
| ABri | ABriPP | S | Demenza familiare |
| ALect2 | Fattore chemiotattico leucociti 2 | S | Prevalentemente Rene |
| ADan | ADanPP | L | Demenza familiare (Danimarca) |
| A β | Precursore della proteina A β (A β PP) | L | Malattia di Alzheimer, invecchiamento |
| AprP | Proteina prionica | L | Encefalopatia spongiforme |
| ACal | Procalcitonina | L | Tumori cellule C tiroidee |
| AIAPP | Polipeptide amiloide isole pancreatiche | L | Isole di Langerhans, insulinoma |
| AANF | Fattore natriuretico atriale | L | Atri cardiaci |
| Apro | Prolattina | L | Invecchiamento ipofisi, prolattinoma |
| AIns | Insulina | L | Iatrogena |
| AMed | Lactaderina | L | Senile, aorta |
| AKer | Cheratoepitelina | L | Cornea, familiare |
| ALac | Lattoferrina | L | Cornea |
| Aoaap | Proteina odontogena associata ad ameloblasto | L | Tumori odontogeni |
| ASemI | Seminogelina I | L | Vescicole seminali |

Proprietà delle proteine amiloidi

Struttura fisica

Al microscopio elettronico l'amiloide è formata da fibrille continue, non ramificate, di circa 7,5-10 nm di diametro e l'ultrastruttura è identica in tutti i tipi di amiloide. La cristallografia a raggi X e la spettroscopia all'infrarosso mostrano una caratteristica conformazione a foglietti β incrociati. Il foglietto β (*β -sheet*) o struttura β a pieghe è la seconda forma più diffusa di struttura secondaria delle proteine (la prima è l' α -elica), che consiste di più filamenti β disposti uno accanto all'altro e collegati tra loro da tre o più legami idrogeno che formano una struttura planare molto compatta. Nel dettaglio, si definisce filamento β (*β -strand*) una sequenza peptidica di aminoacidi (tipicamente composta da 5 – 10 aminoacidi) che si dispone linearmente ed è in grado di instaurare legami idrogeno. La natura del legame fra C-N è rigida e questo fa sì che i sei atomi che partecipano al legame carbaminico giacciono tutti sullo stesso piano. Questi piani si dispongono, nella struttura β , a zig-zag con un angolo di circa 120°. I residui aminoacidici (le catene R) sporgono al di sopra e al di sotto del foglietto alternativamente. Dal momento che tutte le catene peptidiche hanno una direzionalità conferita dalle estremità NTD (N-terminale) e CTD (C-terminale), anche i filamenti β possono essere definiti direzionali. Essi sono spesso rappresentati, infatti, da una freccia rivolta verso la coda CTD. Filamenti β adiacenti possono dunque formare legami idrogeno in modalità antiparallela, parallela o mista. Solitamente, gli aminoacidi aventi residui ingombranti e aromatici (ad esempio tirosina, fenilalanina e triptofano) si dispongono al centro dei foglietti. Alla base della formazione dei depositi di amiloide vi è probabilmente un'anomala deposizione di aminoacidi voluminosi alle estremità che causa un'elevata associazione tra foglietti adiacenti. La struttura fisica dell'amiloide è responsabile della caratteristica colorazione rossa e della birifrangenza verde dell'amiloide colorata con il Rosso Congo (**Figura 1**).

Figura 1.A. Colorazione con rosso Congo di agoaspirato di grasso periombelicale alla microscopia ottica (200x); B. Tipica birifrangenza giallo-verde dell'amiloide osservata al microscopio a luce polarizzata.



Struttura chimica

Il 95% circa dell'amiloide è formato da fibrille proteiche e il restante 5% dalla componente P (fattore proteico di derivazione sierica), da proteoglicani e glucosaminoglicani solforati, che insieme contribuiscono alla formazione dell'amiloide stabilizzando le fibrille e riducendone l'eliminazione.

Ad oggi sono state identificate oltre venti proteine amiloidi differenti. La nomenclatura attualmente accettata è AX, in cui A significa amiloidosi e X rappresenta la proteina che costituisce le fibrille. Le forme più frequenti sono l'amiloide da catene leggere (amiloidosi AL), la sieroamiloide A (amiloidosi AA), la β -amiloide (malattia di Alzheimer), le amiloidosi familiari (amiloidosi AF).

L'amiloidosi AL o amiloidosi primaria deriva dalla deposizione delle catene leggere complete delle Immunoglobuline (Ig) prodotte dalle plasmacellule, oppure dalle sole regioni N-terminali. La maggior parte delle proteine AL contiene catene leggere λ (o

loro frammenti), ma può anche contenere catene leggere κ . L'amiloide fibrillare di tipo AL deriva da un'abnorme secrezione di catene leggere libere delle Ig ad opera di un clone di plasmacellule, pertanto si ha un'importante associazione tra questa forma di amiloidosi e alcune neoplasie plasmacellulari (dalla gammopatia monoclonale di significato incerto o *monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS al mieloma multiplo).

L'amiloidosi AA o amiloidosi sistemica reattiva è determinata da una proteina fibrillare che non ha omologie di sequenze con le Ig. L'amiloide AA è una proteina di 76 aminoacidi, con un peso molecolare di 8,5 kDa e deriva dalla digestione proteolitica della sieroamiloide A (SAA), che ne rappresenta il precursore sierico di 12 kDa sintetizzato dal fegato, che circola associato alla lipoproteina ad alta densità 3 (HDL3). La produzione di SAA aumenta nel corso di infiammazioni e fa parte della risposta di fase acuta, pertanto l'amiloidosi AA è associata alla flogosi cronica e per questo è anche detta secondaria.

La proteina β -amiloide ($A\beta$) è un peptide di 4 kDa ed è il costituente principale delle placche cerebrali e dei depositi presenti nei vasi cerebrali caratteristici della malattia di Alzheimer. La proteina $A\beta$ deriva dalla digestione proteolitica di una glicoproteina transmembrana, detta proteina precursore dell'amiloide (APP). Altre proteine meno comuni sono state identificate nei depositi di amiloide, tra cui possiamo menzionare la transtiretina (TTR), la β 2-microglobulina, le proteine prioniche.

La TTR è una proteina sierica tetramerica secreta dal fegato e trasporta ormoni tiroidei, per i quali presenta un'affinità intermedia fra la TBG (*thyroxine-binding globulin*), l'albumina e il retinolo. Nel liquido cerebrospinale è l'unica proteina in grado di trasportare gli ormoni tiroidei, non essendo presenti in quantità apprezzabili né l'albumina né la TBG. Poiché numerose altre molecole, per lo più farmaci e altre sostanze esogene, si legano alla TTR, è probabile che un'altra funzione sia agevolare l'eliminazione di tali sostanze. In passato era chiamata "prealbumina" poiché più veloce

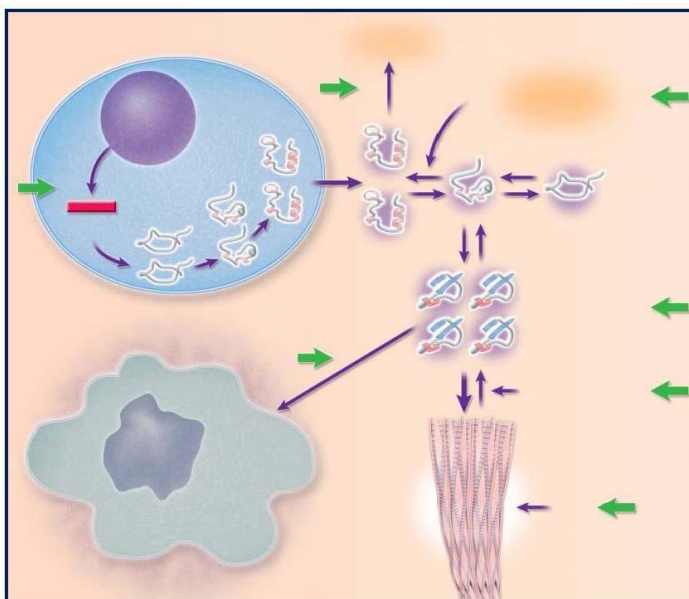
dell'albumina nel tracciato elettroforetico. Nella polineuropatia amiloide familiare (amiloidosi AF) si verifica la dissociazione della TTR e un'aggregazione anomala dei monomeri sotto forma di depositi di fibrille amiloidi; tuttavia, anche una TTR con una sequenza aminoacidica normale può depositarsi, soprattutto a livello del miocardio (amiloidosi senile)³.

La β 2-microglobulina è invece una componente delle molecole MHC-I ed una normale proteina sierica; in pazienti sottoposti ad emodialisi cronica, essa può costituire la subunità fibrillare ($A\beta$ 2m) responsabile del processo amiloidotico.

Patogenesi

L'amiloidosi deriva da un errato assemblaggio delle proteine che si depositano sottoforma di fibrille negli spazi interstiziali, distruggendo la normale funzione dei tessuti¹(**Figura 2**).

Figura 2: Formazione delle fibrille di amiloide



Alla base di questa anomala deposizione possiamo descrivere due fondamentali processi patogenetici:

- (1) un eccesso di proteine normali con tendenza intrinseca all'assemblaggio improprio, all'aggregazione e alla formazione di fibrille (ad esempio per un'estesa conformazione a foglietti β ripiegati);
- (2) la presenza di proteine mutate, strutturalmente instabili e inclini all'assemblaggio aberrante e alla conseguente aggregazione anche se prodotte nei livelli normali.

Altri fattori che contribuiscono alla fibrillogenesi sono un'alterata processazione proteolitica della proteina precursore, l'associazione con elementi del siero o della matrice extracellulare - ad esempio la siero amiloide P (SAP), il fattore di accrescimento dell'amiloide, il pH del tessuto. Inoltre, le proteine mal assemblate sono degradate da alcuni sistemi di difesa, quali i proteasomi all'interno della cellula o i macrofagi a livello interstiziale. È plausibile che nell'amiloidosi tali meccanismi di controllo della qualità siano difettosi, contribuendo all'accumulo proteico.

La disfunzione d'organo nell'amiloidosi classicamente viene attribuita all'alterazione dell'architettura tissutale da parte dei depositi di amiloide, ma in letteratura è segnalata con evidenza crescente che le proteine amiloidi possono avere un effetto citotossico diretto: in particolare, studi in vitro condotti su cardiomiociti adulti isolati hanno dimostrato che le catene leggere libere sono associate ad un danno ossidativo a carico dei cardiomiociti, caratterizzato da un aumento delle specie reattive dell'ossigeno intracellulari, con alterazione del rilascio di calcio durante la contrazione con possibile ruolo nella disfunzione sistolica⁴, con conseguente apoptosi⁵.

Classificazione

Dal punto di vista clinico, possiamo descrivere un'amiloidosi sistemica o generalizzata, quando la proteina amiloidogenica è prodotta in un sito che può essere anche molto distante dal sito di deposito e si ha il coinvolgimento di molteplici organi e apparati, e una forma localizzata, quando la proteina amiloide si deposita nel sito di produzione, interessando tipicamente un singolo organo (ad esempio il cuore)⁶.

In base al meccanismo patogenetico responsabile del processo morboso e alle proteine costituenti le fibrille di amiloide, possiamo ulteriormente classificare le amiloidosi associate a disordini del sistema immunitario (amiloidosi AL), quelle insorte come complicanza di malattie infiammatorie croniche e di processi associati a distruzione tissutale (amiloidosi AA), una forma ereditaria (amiloidosi ATTR, febbre familiare mediterranea), una forma senile, un'amiloidosi da emodialisi cronica, un'amiloidosi associata a malattie endocrine e metaboliche ed altre forme più rare.

Amiloidosi AL

Le discrasie immunologiche associate ad amiloidosi hanno generalmente un interessamento sistemico e possono interessare l'interstizio di qualsiasi organo, ad eccezione del SNC. L'amiloidosi AL rappresenta la forma di amiloidosi più frequente in Occidente, con un'incidenza annuale stimata nel Nord America di circa 4.5 casi ogni 100.000 persone, superiore all'incidenza del linfoma di Hodgkin e della leucemia mieloide cronica. Tuttavia, l'approccio diagnostico convenzionale è verosimilmente inadeguato e la vera incidenza potrebbe essere significativamente più elevata. I pazienti con amiloidosi AL seguiti presso un centro di riferimento nazionale europeo (Centro per lo Studio delle Amiloidosi Sistemiche di Pavia) presentano un'età media di 62 anni, con una leggera prevalenza del genere maschile (57%)⁷. Il disordine immunologico associato meglio definito è il mieloma multiplo, un tumore plasmacellulare con lesioni

osteolitiche multiple diffuse a tutto l'apparato scheletrico. I linfociti B neoplastici sintetizzano un'abnorme quantità di un'unica immunoglobulina specifica (gammopatia monoclonale), che si può manifestare attraverso l'elettroforesi delle proteine sieriche come un picco monoclonale (picco M). Oltre alle Ig intere, possono essere identificate nel siero le sole catene leggere κ e λ (proteine di Bence-Jones). Queste ultime hanno un basso peso molecolare e vengono escrete nelle urine; pertanto, quasi tutti i pazienti con mieloma multiplo mostrano un aumento delle proteine di Bence-Jones nel siero, nelle urine o in entrambe. I depositi di amiloide contengono questa proteina; tuttavia, solo il 10-15% dei pazienti con mieloma sviluppa amiloidosi. Ciò vuol dire che la proteina di Bence-Jones è necessaria, ma non sufficiente a causare amiloidosi. Altri fattori dunque, come il tipo di catena leggera prodotta e la sua suscettibilità alla degradazione determinano se la proteina si deposita come amiloide o meno. L'amiloidosi AL può manifestarsi anche in corso di altre malattie linfoproliferative B, come il linfoma non Hodgkin, la macroglobulinemia di Waldenström, le MGUS.

Tuttavia, bisogna considerare che la maggioranza dei pazienti con amiloidosi AL non è affetta da mieloma multiplo classico, né da linfomi a cellule B. Questi casi sono classificati come amiloidosi primaria, in quanto il quadro clinico deriva solo dagli effetti dell'accumulo di amiloide in assenza di altre malattie associate. Anche in questi casi però sono sempre presenti nel siero e nelle urine Ig o catene leggere libere monoclonali o entrambe. Inoltre, spesso si verifica nel midollo osseo un aumento del numero di plasmacellule. In definitiva, questi pazienti possiedono una discrasia plasmacellulare la cui manifestazione principale è la produzione di una proteina alterata (proteina AL) anziché di una massa tumorale.

Gli organi specifici maggiormente interessati sono: il rene (72%, con sindrome nefrotica nel 53% dei casi), il cuore (63%), il fegato (26%), il sistema nervoso periferico (neuropatia periferica sensitiva, 19%; sindrome del tunnel carpale, 25%), il sistema nervoso autonomo (turbe della motilità intestinale e ipotensione ortostatica, 16%), la

lingua (15%, è patognomonica di amiloidosi AL), la milza, la cute e gli annessi (ecchimosi cutanee, distrofia delle unghie, alopecia nel 15% dei casi), le articolazioni. Il 72% dei pazienti presenta più di un organo coinvolto al momento della diagnosi⁷.

Amiloidosi AA

L'amiloidosi sistemica reattiva deriva dalla deposizione di proteine AA e viene classicamente considerata una forma di amiloidosi secondaria, perché causata da patologie infiammatorie croniche concomitanti. In passato, la tubercolosi, le broncopneumoniti, l'osteomielite, l'endocardite batterica subacuta erano le malattie principali associate, ma con l'avvento della terapia antibiotica tali patologie sono diventate più rare o meglio controllabili (in Occidente coinvolge meno dell'1% dei pazienti affetti da amiloidosi). Attualmente, l'amiloidosi AA è principalmente una complicanza dell'artrite reumatoide, della spondilite anchilosante e di altre connettiviti, oppure delle malattie infiammatorie croniche intestinali, come il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa. Tra queste, la patologia più frequentemente riscontrata è l'artrite reumatoide; l'amiloidosi colpisce il 3% circa dei pazienti affetti da tale connettivopatia ed è clinicamente significativa in più della metà dei casi. Tuttavia, negli Stati Uniti e in Europa l'amiloidosi AA può considerarsi rara, grazie ai progressi nelle terapie antinfiammatorie; invece, essa è più frequente in Turchia e Medio Oriente, dove si manifesta soprattutto in associazione con la febbre mediterranea familiare. Nell'amiloidosi AA i depositi di fibrille sono più limitati rispetto all'amiloidosi AL e colpiscono generalmente il rene; solo nelle fasi avanzate può riscontrarsi epatomegalia, splenomegalia, neuropatia autonoma (raro il coinvolgimento cardiaco).

Amiloidosi A β 2m

I pazienti uremici sono costretti a continui cicli di dialisi. La β_2 -microglobulina è una proteina sierica escreta dal rene e i suoi livelli si innalzano in luogo di un'insufficienza renale. La sua massa molecolare è di circa 12 kDa, ovvero al di sopra della soglia di massa molecolare di alcune membrane di dialisi. In passato, le manifestazioni reumatologiche tipicamente associate alla deposizione di $A\beta_2m$ si osservavano nel 50% dei pazienti sottoposti a dialisi per più di 12 anni, mentre oggi l'incidenza di questa malattia sembra essere in calo con le tecniche di dialisi più moderne.

Amiloidosi AF

Sono state identificate molte forme di amiloidosi a carattere ereditario, ognuna rara e con distribuzione etnica o geografica ben definita. La forma più comune è la febbre mediterranea familiare (FMF), una malattia a trasmissione autosomica recessiva. È una malattia rara, che tuttavia raggiunge un'incidenza non trascurabile nei paesi che si affacciano sul mar Mediterraneo ed in particolare armeni, ebrei sefarditi, arabi, turchi, italiani. Si tratta di una sindrome "autoinfiammatoria", associata a iperproduzione di $IL-1^8$; il gene responsabile si trova sul braccio corto del cromosoma 16 (MEFV, *Mediterranean Fever*) e codifica una proteina denominata pirina (o marenostrina): essa partecipa alla regolazione del processo infiammatorio, inibendo la produzione di citochine proinfiammatorie. Mutazioni inattivanti del gene che codifica per la pirina conducono a un processo infiammatorio incontrollato, che si caratterizza per attacchi ricorrenti e tendenza alla cronicizzazione. Il quadro clinico è caratterizzato da episodi ricorrenti di attacchi febbrili e sierositi con versamenti di tipo essudatizio sterile: i segni di una peritonite sono presenti nel 95% dei pazienti, ma è possibile osservare anche dolore articolare (sinovite nel 75% dei casi), dolore toracico (pleurite e pericardite nel 40% dei pazienti), dolore scrotale o coinvolgimento della tonaca vaginale (5% dei casi), raramente mialgie e lesioni erisipeloidi. Gli episodi febbrili iniziano precocemente, anche nell'infanzia (il primo attacco avviene nel 90% dei casi entro i 20 anni di età). La

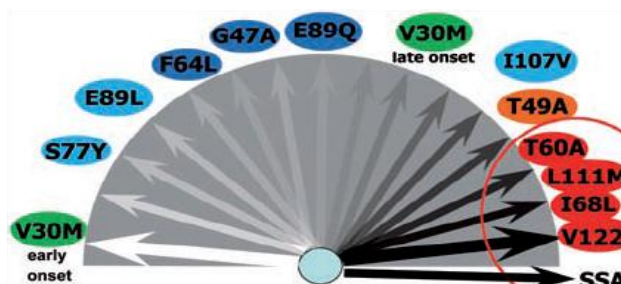
deposizione di proteine fibrillari formate da amiloide AA costituisce una complicanza tardiva e si manifesta principalmente con insufficienza renale, vasculiti (porpora di Schönlein-Henoch, panarterite nodosa), interessamento di surreni, intestino, milza, polmone, testicoli⁹.

Amiloidosi TTR

Un altro gruppo di amiloidosi ereditarie a trasmissione autosomica dominante si caratterizza per la deposizione di proteine fibrillari nei nervi del sistema nervoso periferico (SNP) e autonomo (SNA), a livello renale e nel miocardio. Tali forme di amiloidosi AF sono causate dalla produzione di transtiretina mutante (ATTR); si tratta di patologie rare, con un'incidenza minore di 1:100000. Sono note oltre 100 mutazioni della TTR e la maggior parte di esse si esprime con un'amiloidosi ATTR. La mutazione più frequente è la Met-30 e si associa a difetti di conduzione cardiaca che possono richiedere l'impianto di un *pacemaker*; un'altra particolare variante da ricordare è Ile-122, che interessa fino al 4% della popolazione afroamericana e si associa ad amiloidosi cardiaca a esordio tardivo¹⁰.

L'amiloidosi TTR è una malattia autosomica dominante con espressività variabile e penetranza incompleta, che può essere causata da oltre 100 mutazioni del gene della TTR. La TTR nativa è un tetramero solubile; nelle amiloidosi TTR-relate, i 4 monomeri che compongono la proteina si dissociano e vanno incontro ad un processo di *misfolding* con successiva aggregazione in fibrille insolubili che infiltrano vari organi e tessuti causando alterazioni morfo-funzionali progressive. L'ATTRm è una patologia sistemica e multiorgano caratterizzata da un tropismo particolare per il tessuto nervoso e cardiaco: esistono casi con fenotipo prevalentemente neurologico (neuropatia autonoma, sensitiva e motoria), casi con prevalente interessamento cardiaco e casi misti (**Figura 3**).

Figura 3: Spettro di correlazioni genotipo-fenotipo nell'amiloidosi transtiretino-relata. L'espressione fenotipica varia da un interessamento quasi esclusivamente neurologico (mutazione Val30Met *early onset*) ad uno esclusivamente cardiaco (mutazioni Thr60Ala, Leu111Met, Ile68Leu e Val122Ile). Altre mutazioni sono legate ad un fenotipo misto con gradi variabili di coinvolgimento neurologico e cardiaco.



Queste variazioni fenotipiche dipendono in gran parte dal tipo di mutazione genica della TTR. Al contrario, nella SSA è in genere dominante il fenotipo cardiologico e le manifestazioni neurologiche sono limitate alla sindrome del tunnel carpale, che spesso è il sintomo iniziale in questi pazienti e può anticipare di anche 10 anni la comparsa dei sintomi cardiologici. Questa estrema eterogeneità clinica rende la diagnosi e il trattamento delle amiloidosi TTR-relate una vera sfida: infatti l'amiloidosi cardiaca TTR-relata è spesso sottodiagnosticata, soprattutto quando il coinvolgimento neurologico è lieve o assente.

Amiloidosi senile

L'amiloidosi sistemica senile consiste nel deposito sistemico di amiloide negli anziani, generalmente dopo i 60 anni (può essere riscontrata in sede autoptica in una percentuale fino al 25% dei pazienti di età superiore agli 80 anni). Questa forma interessa prevalentemente individui di sesso maschile e si caratterizza per essere una forma lentamente progressiva che colpisce soprattutto il cuore, determinando una cardiomiopatia restrittiva e la comparsa di aritmie. L'amiloide è costituita da

transtiretina normale (TTR *wild type*). Più raramente, in individui con scompenso cardiaco end-stage, è possibile osservare una forma localizzata negli atri, costituita da depositi di proteine derivate dal peptide natriuretico atriale, che contribuisce al rimodellamento atriale¹¹. La stessa malattia di Alzheimer può essere descritta come una forma di amiloidosi cerebrale senile, in cui si osserva la presenza di placche cerebrali costituite da proteina β -amiloide.

Amiloidosi associata a malattie endocrine e metaboliche

In alcuni tumori neuroendocrini, l'esame istologico rileva la presenza di depositi localizzati di amiloide; le proteine amiloidogeniche sembrano derivare da ormoni polipeptidici, come la calcitonina nel carcinoma midollare della tiroide. Nelle isole di Langerhans dei pazienti con diabete mellito di tipo 2, si possono descrivere depositi di proteine specifiche derivate dal polipeptide amiloide insulare (*insulin amyloid polypeptide*, IAPP) o amilina. Si tratta di una proteina secreta dalle cellule β pancreatiche insieme con l'insulina, entrambe in forma di pro-peptidi. L'amilina gioca un ruolo nella regolazione glicemica, rallentando lo svuotamento gastrico e inducendo un senso di sazietà, prevenendo quindi i picchi post-prandiali di glicemia. Non a caso dunque, la sintesi di IAPP è regolata dagli stessi fattori che controllano la produzione di insulina. Nel diabete di tipo 2, l'insulino-resistenza conduce quindi ad una aumentata produzione non solo di insulina, ma anche di IAPP; in particolare si accumulano i precursori della IAPP, che si depositano nelle isole pancreatiche e conducono a morte per apoptosi delle cellule β . È ancora da appurare se questa forma di amiloidosi intracellulare sia semplicemente una conseguenza del diabete mellito di tipo 2 o sia direttamente coinvolta nella patogenesi della insulino-resistenza.

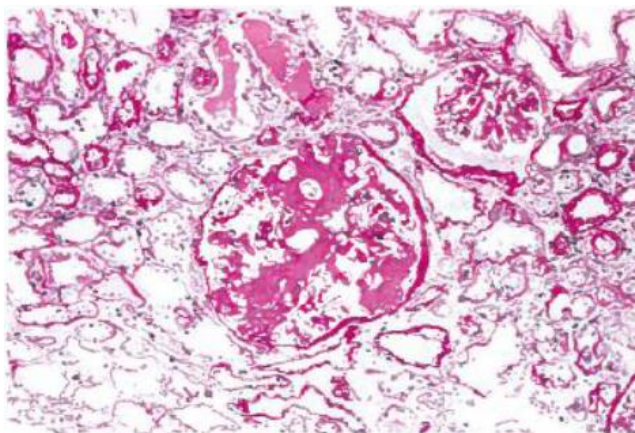
Caratteristiche cliniche

L'amiloidosi può costituire un reperto istologico isolato totalmente asintomatico o produrre un quadro clinico conclamato, fino a determinare *l'exitus*. I sintomi dipendono dall'entità e dalle sede d'organo dei depositi. Il quadro clinico iniziale è spesso aspecifico: astenia, calo ponderale, vertigini, sincope. Sintomi più specifici compaiono tardivamente e dipendono dall'organo interessato.

Coinvolgimento extra-cardiaco

L'amiloidosi renale rappresenta la forma più comune di amiloidosi. I reni appaiono normali per forma e dimensioni, riducendosi di volume solo negli stadi avanzati per l'ischemia causata dall'occlusione dei vasi per deposizione di amiloide nella parete delle arterie e delle arteriole. L'esame istologico conferma un interessamento prevalentemente glomerulare, ma possono essere coinvolti anche l'interstizio peritubulare, le arterie e le arteriole. L'amiloidosi glomerulare progredisce fino a deformare e obliterare i capillari glomerulari (**Figura 4**).

Figura 4. Glomerulo obsolecente: la citoarchitettura glomerulare è completamente alterata a causa del notevole accumulo di amiloide.



Dal punto di vista clinico, ciò si esprime in una sindrome nefrosica che può evolvere fino all'insufficienza renale e all'uremia. In una piccola percentuale di casi (10%) la deposizione di amiloide si verifica a livello tubulointerstiziale, causando una disfunzione renale senza proteinuria significativa.

Il sistema digerente può essere interessato a qualsiasi livello, dal cavo orale fino all'ano. Le lesioni sono inizialmente vascolari e si estendono successivamente alle aree adiacenti della sottomucosa, della *muscularis mucosae* e della sottosierosa. L'amiloidosi gastroenterica può essere completamente asintomatica o esprimersi con una sintomatologia variabile: diarrea, malassorbimento, sanguinamento e altri disturbi digestivi. Il coinvolgimento linguale può causare una tumefazione e una rigidità tali da produrre afasia e ostacolare la deglutizione; in alcuni casi la macroglossia è talmente imponente da prendere il nome di amiloidosi tumorale della lingua (**Figura 5A**).

L'amiloidosi splenica può essere invisibile all'ispezione o arrivare a causare una splenomegalia marcata (fino a 800 g). I depositi di amiloide a tale livello possono essere di due tipi: nel primo caso interessano solamente i follicoli splenici mentre nel secondo tipo la deposizione ha inizio a livello della polpa rossa e si formano grandi masse confluenti.

L'amiloidosi epatica può causare un'epatomegalia variabile da moderata a grave. Le fibrille si accumulano inizialmente nello spazio di Disse, comprimendo progressivamente gli epatociti e i sinusoidi adiacenti. Con il tempo gli epatociti vanno incontro ad atrofia da compressione ed alla fine ampie aree di parenchima epatico vengono completamente sostituite da depositi di amiloide. Nonostante ciò, la funzionalità epatica è conservata fino alle fasi più avanzate.

L'amiloidosi dei nervi periferici e autonomi è una caratteristica delle neuropatie amiloidotiche ereditarie. La neuropatia periferica inizia come deficit sensitivo-motorio

delle estremità inferiori e progredisce verso le estremità superiori; la neuropatia autonoma si manifesta con sintomi gastrointestinali (diarrea, stipsi, anoressia, perdita di peso), ipotensione ortostatica e impotenza⁷.

Nei dializzati cronici, l'amiloide si accumula nel legamento trasverso del carpo, causando la compressione del nervo mediano e di conseguenza la sindrome del tunnel carpale. Altre tipiche manifestazioni reumatologiche sono i versamenti articolari persistenti, la spondiloartropatia, le lesioni ossee cistiche. L'interessamento articolare è più frequentemente bilaterale e colpisce le grandi articolazioni (spalle, ginocchia, polsi, anche); inoltre, il liquido sinoviale ha caratteristiche non infiammatorie e presenta depositi di amiloide.

Molti pazienti riferiscono una propensione all'ecchimosi, a causa di una diatesi emorragica secondaria all'accumulo di depositi di amiloide nei capillari e a un deficit del fattore X della coagulazione, che viene assorbito sulle fibrille amiloidi, in sede cutanea, soprattutto periorbitale (**Figura 5B**). Altri reperti consistono nella distrofia delle unghie (**Figura 5C**), alopecia e artropatia amiloide con ispessimento sinoviale.

Figura 5. A: macroglossia; B: ecchimosi periorbitali; C: distrofia ungueale



Coinvolgimento cardiaco

L'amiloidosi cardiaca (*cardiac amyloidosis*, CA) è una forma di cardiomiopatia infiltrativa a carattere progressivo. Il coinvolgimento cardiaco è presente nel 45% dei pazienti con amiloidosi AL, spesso rapidamente progressivo, e rappresenta la seconda manifestazione clinica più comune, dopo quella legata all'interessamento renale, e la principale causa di morte. Nelle amiloidosi ATTR la frequenza del coinvolgimento cardiaco varia a seconda del tipo di mutazione; tuttavia le manifestazioni cliniche risultano più attenuate rispetto all'amiloidosi AL e la progressione verso lo scompenso cardiaco più lenta, sebbene spesso si osservi un quadro caratterizzato da disautonomia e blocchi di conduzione. Infine, il cuore è l'organo maggiormente coinvolto nell'amiloidosi cardiaca senile, in cui si manifesta con un quadro di insufficienza cardiaca congestizia, mentre è piuttosto raro nella forma AA (è presente in meno del 5% dei pazienti con questo tipo di amiloidosi). La CA è osservata più frequentemente negli uomini che nelle donne ed è rara prima dei 40 anni di età, ad eccezione delle forme con TTR mutata, in cui il coinvolgimento cardiaco può anche verificarsi in precedenza.

Il danno cardiaco è legato soprattutto alla diffusa deposizione interstiziale di materiale proteico a livello miocardico ed al coinvolgimento intramurale e perivascolare delle arterie e arteriole coronariche, che vanno incontro ad ispessimento, restringimento

e potenzialmente occlusione ab extrinseco o per complicanza trombotica; a questo meccanismo patogenetico si associa un possibile danno citotossico diretto, studiato in vitro e associato con danno ossidativo^{4,5}. Le manifestazioni cliniche sono riassunte in quattro forme più significative, che possono presentarsi singolarmente o sovrapporsi in ogni paziente: la cardiomiopatia restrittiva, lo scompenso cardiaco sistolico, l'ipotensione ortostatica, i disturbi del sistema di conduzione del cuore. Nelle fasi avanzate può comparire un quadro di scompenso cardiaco biventriolare.

Il *pattern* restrittivo rappresenta l'evoluzione tipica di ogni cardiomiopatia infiltrativa: nonostante una frazione di eiezione ventricolare sinistra (VS) normale o solo leggermente diminuita, si osserva un aumento della rigidità delle pareti cardiache, che appaiono ispessite. Ne deriva un aumento delle pressioni di riempimento e riduzione dei relativi volumi, soprattutto nelle camere sinistre. Si tratta quindi di una disfunzione diastolica VS, che si manifesta con edemi periferici, epatomegalia, ascite, aumento della pressione venosa giugulare, versamento pleurico e pericardico (è possibile che l'amiloide stessa possa esercitare un effetto tossico diretto sulle sierose¹². Al cateterismo cardiaco, le pressioni sinistre e destre sono elevate, con predominanza delle prime; inoltre, le curve ventricolari destre e sinistre sono caratterizzate da una rapida e precoce caduta pressoria (*dip* diastolico) seguito da un *plateau* diastolico elevato e costante che rappresenta una pressione telediastolica elevata. Lo scompenso cardiaco sistolico deriva da un deterioramento della funzione contrattile e si verifica tardivamente nel corso della malattia, quando cioè i depositi di amiloide diventano diffusi e possono provocare un isolamento funzionale dei cardiomiociti. È possibile osservare uno scompenso cardiaco ad alta portata in alcuni casi di amiloidosi AL associata a mieloma multiplo, probabilmente secondario alla formazione di fistole artero-venose intramidollari o alla produzione di citochine pro-infiammatorie con azione vasodilatatrice da parte del clone plasmacellulare neoplastico¹³.

Un'ipotensione ortostatica franca è presente nel 10% dei casi di amiloidosi ed è causata principalmente dal coinvolgimento del sistema nervoso e delle pareti dei vasi; l'infiltrazione del miocardio, così come il coinvolgimento delle ghiandole surrenali e del rene, contribuisce a peggiorare l'emodinamica del paziente attraverso l'incremento della ritenzione idrica o un'ostruzione del tratto di efflusso ventricolare sinistro. Episodi frequenti di sincope, spesso associata a stress emozionali o fisici, possono preannunciare la presenza di eventi più gravi, associati a disturbi di conduzione. L'interessamento del sistema di conduzione dell'impulso cardiaco è raro, ma la sua importanza deriva dalla possibile evoluzione verso aritmie maligne con esito verso la morte cardiaca improvvisa.

Diagnosi di amiloidosi

La diagnosi di amiloidosi deve essere presa in considerazione nei pazienti che presentano forme inspiegabili di nefropatia, miocardiopatia, neuropatia, enteropatia o alterazione patognomoniche dei tessuti molli (come macroglossia ed ecchimosi periorbitali). La diagnosi clinica è confermata attraverso l'identificazione anatomopatologica delle fibrille di amiloide. Nelle amiloidosi sistemiche è possibile reperire depositi di amiloide in qualsiasi tessuto del corpo. Storicamente venivano esaminati i vasi sanguigni della mucosa gengivale o rettale; tuttavia, il tessuto più facilmente accessibile è il tessuto adiposo. Tale procedura mininvasiva rappresenta un test abbastanza specifico, ma poco sensibile (risulta positivo in circa l'80-88% dei pazienti affetti da amiloidosi sistemica); pertanto, se la procedura è negativa, si può considerare l'opportunità di una biopsia delle ghiandole salivari minori labiali.

Gli esami di laboratorio di routine mostrano generalmente alterazioni aspecifiche: l'emocromo è generalmente normale, con una velocità di eritrosedimentazione (VES) spesso elevata. I pazienti con interessamento renale presentano i segni di una sindrome nefrosica (proteinuria >3,5 g/die). L'interessamento epatico si manifesta con lievi segni di colestasi (aumento della fosfatasi alcalina e della γ -glutammina-transpeptidasi),

innalzamento minimo o assente delle transaminasi e mantenimento della funzione di sintesi. Negli stadi più avanzati, possono verificarsi endocrinopatie, opportunamente documentate da esami di laboratorio, quali ipotiroidismo, iposurrenalismo, ipopituitarismo.

Nel sospetto di amiloidosi immunitaria, sono indicate l'elettroforesi con immunofissazione (*immunofixation electrophoresis*, IFE) e l'analisi delle catene leggere libere del siero mediante studio nefelometrico (test Freelite™), che insieme identificano oltre il 99% dei pazienti con amiloidosi AL. In passato, si utilizzava il dosaggio delle catene leggere κ e λ totali, misurando quindi sia le catene leggere libere, che quelle legate alle Ig intatte (i valori di riferimento per le catene leggere κ totali sono 170-370 mg/dL, per le catene leggere λ totali 90-120 mg/dL); tuttavia il dosaggio delle sole catene leggere libere ha dimostrato una sensibilità maggiore. L'elettroforesi standard delle proteine nel siero (SPEP) e nelle urine (UPEP) non è affidabile come test di *screening*, poiché le Ig monoclonali prodotte nell'amiloidosi AL spesso non sono in quantità tale da produrre un picco M. Il livello normale di catene leggere libere nel sangue è approssimativamente di 1 mg/dL, ma tale livello dovrebbe essere 50 volte superiore per essere rilevato con la SPEP e 15 volte i valori normali per la IFE. L'analisi delle catene leggere libere del siero è in grado di rilevarle anche quando sono presenti a valori normali; inoltre, è un test quantitativo, quindi presenta un'utilità non solo diagnostica, ma anche nel monitoraggio dell'evoluzione della malattia e della risposta alla terapia. Infine, il dosaggio è automatizzato e perciò richiede meno tempo rispetto a SPEP, UPEP, IFE⁶. Tuttavia, tale analisi non è in grado di identificare le Ig intatte e quindi conviene eseguirla in combinazione un IFE, come consigliato dall'*International Myeloma Working Group*. Nell'amiloidosi AL le catene leggere λ sono molto più comuni delle κ (rapporto 3:1), con una conseguente inversione del rapporto κ/λ . I valori normali delle catene leggere libere nel siero secondo l'*International Myeloma Foundation* sono: Catene κ : 0,33 – 1,94 mg/dL Catene λ : 0,57 – 2,63 mg/dL Rapporto κ/λ : 0,26 – 1,65. Il rapporto κ/λ è molto importante per la diagnosi ed il monitoraggio

del disordine immunologico, poiché quanto più si allontana dai valori di riferimento, tanto più indica che la malattia è in una fase attiva. Allo stesso modo, un rapporto che dopo il trattamento tende alla normalità è indice di remissione e rappresenta un fattore prognostico positivo (in caso di insufficienza renale, la *clearance* delle catene libere è ridotta, quindi entrambe le catene presentano valori elevati ed il rapporto può rientrare nei livelli normali). Per definizione dell'*International Myeloma Working Group*, una risposta ematologica completa alla terapia è rappresentata dalla normalizzazione di SPEP, UPEP, IFE e dall'assenza di espansione monoclonale nel midollo osseo (la biopsia osteomidollare in corso di malattia mostra plasmocitosi in circa il 90% dei casi).

La sola presenza di una componente monoclonale nel siero, in assenza di un esame istologico, non è di per sé diagnostica di amiloidosi, poiché un MGUS è comune negli anziani (5-10% dei soggetti oltre i 70 anni). Nello stesso tempo, il reperto di depositi di amiloide in un organo, in presenza di una componente monoclonale, è un elemento necessario ma non sufficiente per porre diagnosi di amiloidosi AL. Si deve infatti tenere presente la possibilità di un'associazione casuale tra amiloidosi non-AL e gammopatia monoclonale. L'identificazione della proteina amiloidogenica è quindi essenziale per evitare una diagnosi scorretta e un trattamento inappropriato⁷. L'immunoistochimica ultrastrutturale caratterizza con certezza i depositi di amiloide grazie alla colocalizzazione di anticorpi contro le diverse proteine amiloidogeniche con le fibrille e può essere eseguita su campioni di grasso periombelicale.

Le amiloidosi AF si manifestano in modo variabile e possono simulare un'amiloidosi AL. Tuttavia, la clinica è di solito costante nelle famiglie che presentano la stessa mutazione; pertanto, un'anamnesi familiare positiva rende la diagnosi di amiloidosi AF più probabile. Nei casi tipici, la diagnosi di FMF è posta solo su basi cliniche, mentre il test genetico è riservato per casi ambigui. Patognomoniche invece dell'amiloidosi ATTR sono le opacità del corpo vitreo causate da deposito di amiloide. In generale, tutti i pazienti con amiloidosi che non hanno un disturbo immunologico dovrebbero essere

sottoposti a screening per AF, soprattutto coloro che appartengono a gruppi etnici a rischio (ad es. afroamericani). Le proteine TTR mutate vengono generalmente identificate mediante *focusing* isoelettrico o sequenziamento del DNA.

Diagnosi di amiloidosi cardiaca

Per quanto riguarda la clinica della CA, bisogna indagare i sintomi tipici dello scompenso cardiaco (la dispnea da sforzo o notturna, l'affaticamento cronico, l'intolleranza allo sforzo, la tosse, l'ortopnea), al fine di collocare correttamente il paziente all'interno della classificazione funzionale della *New York Heart Association*.

All'esame obiettivo possiamo ricercare i segni di edemi declivi, aumento di peso, epatomegalia, ascite, turgore giugulare. All'auscultazione si può evidenziare un ritmo di galoppo a tre tempi (S3), ad evidenza di un riempimento ventricolare rapido e tumultuoso. Il quarto tono (S4) è tipicamente assente quando i depositi di amiloide coinvolgono gli atri determinando una disfunzione atriale.

Nelle fasi iniziali di malattia, la radiografia del torace non evidenzia alterazioni, mentre nelle fasi avanzate di scompenso si può osservare cardiomegalia, congestione polmonare e versamento pleurico.

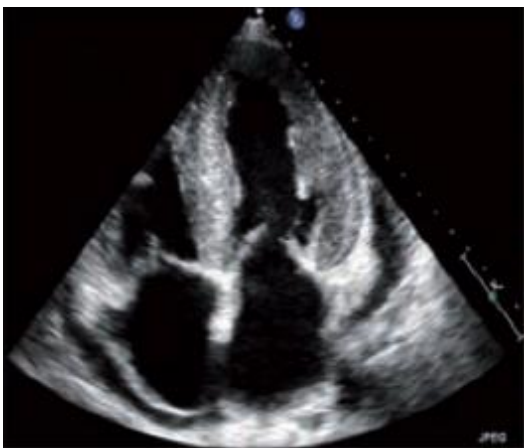
L'elettrocardiogramma spesso rivela complessi QRS a basso voltaggio, onde Q di pseudonecrosi (**Figura 6**), un blocco di branca e un asse cardiaco anomalo; sono piuttosto comuni rispetto alla popolazione generale la fibrillazione e il flutter atriale, la malattia del nodo del seno, i blocchi di conduzione atrio-ventricolari ed aritmie ventricolari.

Figura 6. Elettrocardiogramma con presenza di emiblocco anteriore sinistro e pseudonecrosi anteriore in un paziente con amiloidosi AL



All'ecocardiografia è possibile osservare ispessimento delle pareti ventricolari con una riduzione del volume delle camere cardiache, dilatazione degli atri, ispessimento del setto interatriale(**Figura 7**). La deposizione di amiloide può rendersi evidente lungo le pareti, che assumono un aspetto granulare e brillante. Le valvole possono apparire ispessite, ma generalmente normofunzionanti o con lieve insufficienza soprattutto a carico della mitrale¹⁴. Il versamento pericardico è spesso osservabile, ma raramente presenta una severità tale da esitare in un tamponamento cardiaco.

Figura 7. Ecocardiogramma (4 camere apicale): ipertrofia simmetrica del ventricolo sinistro con iperrifrangenza di tutte le pareti; ipertrofia del ventricolo destro e del setto interatriale; ispessimento dei lembi della valvola atrioventricolare e versamento pericardico diffuso



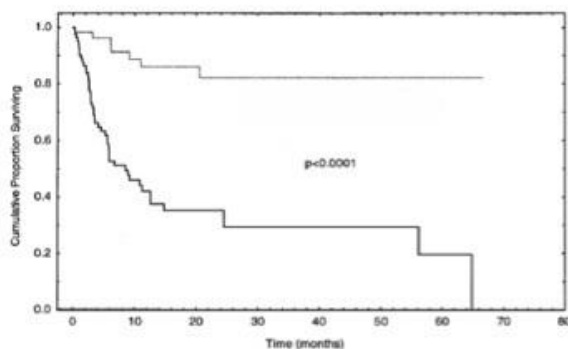
In definitiva, possiamo osservare numerosi parametri ecocardiografici alterati nell'amiloidosi, ma nessuno di essi, preso singolarmente, può essere considerato specifico per CA; inoltre, spesso si tratta di modificazioni che si rendono evidenti solo

nelle fasi tardive della malattia¹⁵ e che entrano in diagnosi differenziale con altre patologie più frequenti come per esempio un'ipertrofia miocardica acquisita¹⁶.

La migliore combinazione capace di individuare un interessamento cardiaco con le metodiche fino ad ora descritte è rappresentata dalla valutazione combinata dell'ispessimento ventricolare con l'ecocardiografia e della riduzione dell'ampiezza dei voltaggi all'ECG con una sensibilità del 79% e specificità > 90%¹⁷.

Negli ultimi anni è stato messo in luce l'importante ruolo dei marcatori biochimici di danno cardiaco nell'amiloidosi AL^{18,19}. Livelli elevati di troponine cardiache sono correlati ad una prognosi sfavorevole²⁰, mentre il centro di Pavia ha dimostrato che, utilizzando un *cut-off* > 332 ng/L²⁰ per la valutazione del frammento N-terminale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP), è possibile predire il coinvolgimento cardiaco con una sensibilità del 93%, una specificità del 90% ed un'accuratezza del 92%, tutti valori superiori rispetto ai parametri ecografici convenzionali. Inoltre, è stato possibile distinguere due gruppi con una differente sopravvivenza complessiva ($p < 0.001$) (Figura 8).

Figura 8: Sopravvivenza dei pazienti con amiloidosi AL in base al valore di NT-proBNP di 332 ng/L²⁰



Ciò rende l'NT-proBNP l'indice più sensibile di disfunzione miocardica e il più potente fattore prognostico nel determinare il miglioramento o il peggioramento clinico della

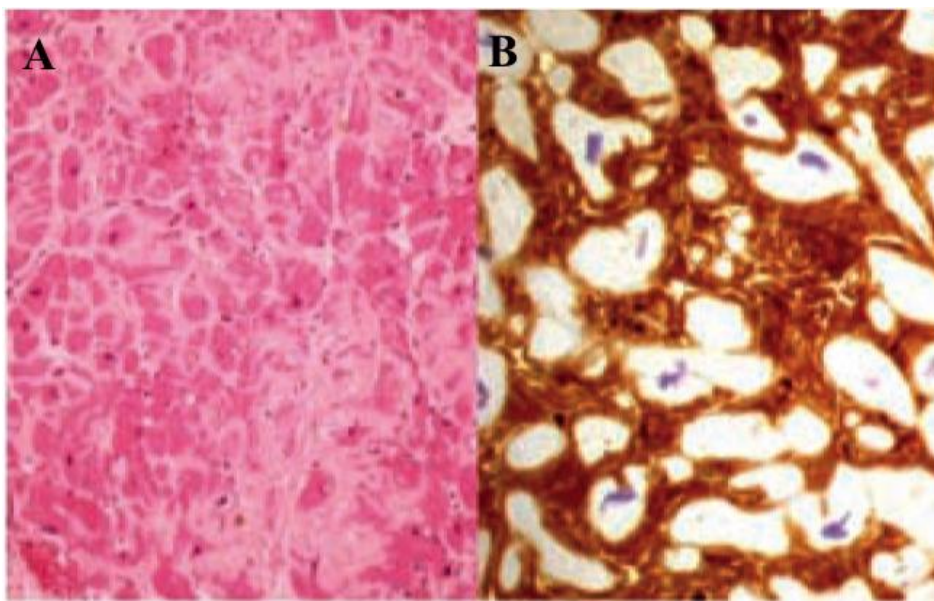
CA durante il *follow-up*^{20,21}.

Biopsia endomiocardica

L'esame *gold standard* per effettuare la diagnosi di certezza di CA è l'analisi istologica di una biopsia endomiocardica (BEM). Questa tecnica permette di valutare il quadro istologico-istochimico specifico oltre che fornire una serie di ulteriori informazioni morfologiche riguardanti la sede, l'entità ed il tipo di distribuzione dei depositi, il danno d'organo ed eventuali reazioni infiammatorie associate, acquisendo un importante valore prognostico²²(**Figura 9A**). Contribuisce poi, alla diagnosi eziologica la caratterizzazione immunoistochimica (**Figura 9B**). Tuttavia, a causa della deposizione eterogenea dell'amiloide, è possibile incorrere in falsi negativi, così come sono possibili falsi positivi legati a depositi incidentali di TTR *wild type* in pazienti anziani. Anche le indagini immunoistochimiche sono associate a risultati contraddittori in letteratura, poiché vi sono alcuni elementi problematici legati alla natura stessa della sostanza amiloide: la colorazione specifica, che può essere soggetta a notevoli variazioni di intensità, di regolarità della distribuzione e di uniformità; la colorazione aspecifica di fondo, che può essere di grado variabile soprattutto in relazione al tipo di amiloide e al tessuto in esame; l'eventuale contemporanea positività immunoistochimica di più di un anticorpo in uno stesso tipo di amiloide, fenomeno piuttosto frequente, con conseguente equivoco *pattern* di marcatura dei depositi, difficoltà interpretative o impossibilità di definire con tali indagini la natura delle fibrille di amiloide.

Infine, si tratta di un'indagine invasiva che non può essere considerata una pratica di routine. È importante dunque sviluppare tecniche diagnostiche non invasive sempre più accurate.

Figura 9: (A) Analisi istologica della biopsia endomiocardica con ematossilina-eosina: evidenza di depositi di amiloide a livello interstiziale (rosa chiaro). (B) Immunohistochimica della biopsia endomiocardica: positività per transtiretina (marrone) con forte intensità.

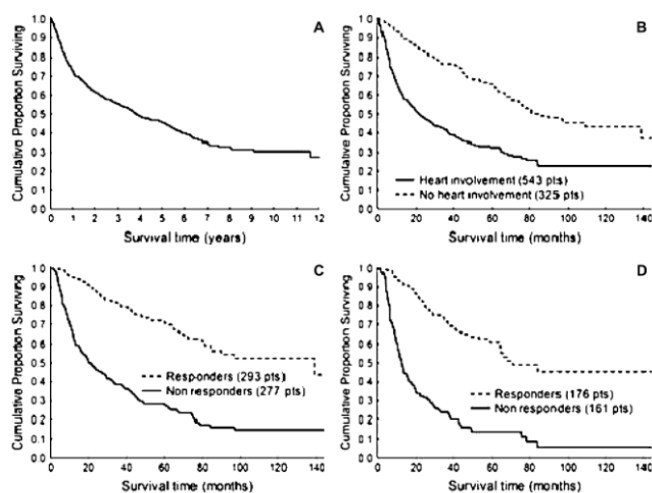


Prognosi delle forme AL

In generale la prognosi dell'amiloidosi sistemica è infausta. I parametri che influenzano maggiormente l'aspettativa di vita del paziente con amiloidosi sistemica sono l'eziologia alla base del processo patologico ed il tipo di organo maggiormente coinvolto. In particolare, le forme AL presentano una prognosi peggiore rispetto alle forme ATTR e all'interno delle forme AL, la prognosi è peggiore quando è associata a discrasie immunologiche più gravi quali il mieloma multiplo. I pazienti con discrasie

immunologiche seguiti presso il centro di Pavia hanno una sopravvivenza mediana di 3,8 anni dalla diagnosi, con un 27% di malati che muore entro l'anno ed una sopravvivenza cumulativa a 10 anni pari al 31%⁷(Figura 10A). L'importanza del coinvolgimento cardiaco nella stratificazione prognostica dei pazienti con amiloidosi AL, dimostrata nel lavoro di Merlini e Palladini (Figura 10B), e rappresenta un dato associato in letteratura^{23,24}. Una diagnosi precoce è fondamentale per ottenere una buona risposta alla terapia, che deve mirare ad arrestare sia il processo di deposizione dell'amiloide che la progressione del danno d'organo. Infatti, la CA aumenta in modo significativo la morbilità correlata al trattamento e la mortalità associata a regimi terapeutici aggressivi, come l'autotrapianto di cellule staminali²⁵. Nonostante il grande impatto prognostico negativo della CA, la risposta ematologica al trattamento conferisce un beneficio in termini di sopravvivenza, sia nella popolazione generale di pazienti (Figura 10C), che in coloro che presentano coinvolgimento del cuore alla diagnosi (Figura 10D). L'analisi multivariata di Cox condotta a Pavia ha ulteriormente dimostrato che gli unici fattori predittivi indipendenti di mortalità sono il coinvolgimento cardiaco e la risposta ematologica alla malattia⁷.

Figura 10.(A) Sopravvivenza complessiva di 868 pazienti con amiloidosi AL (mediana: 3,8 anni). (B) Sopravvivenza in base al coinvolgimento cardiaco. (C) Sopravvivenza in base alla risposta alla chemioterapia in 570 pazienti. (D) Sopravvivenza in base alla risposta alla chemioterapia in 347 pazienti con coinvolgimento cardiaco⁷.



In particolare, la concentrazione sierica di NT-proBNP varia insieme a quella della componente monoclonale amiloidogenica ed è correlata ai sintomi clinici d'insufficienza cardiaca nell'AL²¹. La riduzione della concentrazione di catene leggere circolanti indotta dalla chemioterapia si traduce immediatamente in una riduzione significativa (>30%) della concentrazione di NT-proBNP nel siero e in un miglioramento del quadro clinico di scompenso²⁶. La modificazione della concentrazione plasmatica di NT-proBNP avviene nella maggior parte dei casi prima della normalizzazione degli altri indici di risposta cardiaca stabiliti dall'*International Society for Amyloidosis* (riduzione ≥ 2 mm dello spessore della parete del VS o aumento $\geq 20\%$ della frazione di eiezione VS all'ecocardiografia rispetto al valore basale, miglioramento di due classi NYHA senza necessità di aumentare il dosaggio del diuretico)²⁷. Tali osservazioni confermano che l'NT-proBNP nel siero può essere usato come marcatore di risposta della funzione cardiaca alla chemioterapia ed è un utile strumento per il *follow-up* dei pazienti con amiloidosi AL.

Prognosi delle amiloidosi TTR

Mentre la prognosi per le forme AL è infausta, con sopravvivenza media inferiore a 12 mesi, se il paziente non viene tempestivamente e adeguatamente trattato, la prognosi dei pazienti con amiloidosi TTR viene misurata in anni. Questo perché le forme TTR presentano generalmente una progressione lenta e clinicamente ben tollerata, spesso difficile da diagnosticare fino a quando non compare ispessimento ventricolare sinistro marcato con disfunzione diastolica significativa e disturbi di conduzione elettrica.

La forme di amiloidosi TTR seppur con progressione più lenta, evolvono verso forme di scompenso cardiaco e morte secondaria a scompenso cardiaco refrattario od aritmie. Lo studio TRACS (*Transthyretin Amyloidosis Cardiac Study*), studio

prospettico, multicentro, osservazionale, ha confrontato pazienti con amiloidosi TTR da mutazione di V122I e pazienti con amiloidosi *wild type* dimostrando una sopravvivenza differente per le due forme (26 verso 46 mesi rispettivamente)¹⁰. La sopravvivenza in questo studio era particolarmente bassa ed in disaccordo con la nostra esperienza clinica molto probabilmente dovuta ad uno stadio avanzato di interessamento cardiaco della popolazione in studio la sopravvivenza documentata in altri registri mostra valori medi tra 43 e 75 mesi²⁸.

Terapia dell'amiloidosi AL

L'attuale approccio terapeutico alle amiloidosi sistemiche è basato sulla terapia eziologica, al fine di ridurre o annullare la sintesi del precursore amiloidogenico e quindi far regredire o arrestare la disfunzione d'organo. Lo scopo della terapia nell'amiloidosi AL è quindi diminuire rapidamente la concentrazione delle catene leggere monoclonali circolanti tramite la soppressione del clone plasmacellulare, analogamente a quanto viene perseguito nella terapia del mieloma multiplo. In questi pazienti non solo bisogna considerare l'alterazione ematologica, ma anche le disfunzioni d'organo, che li rendono particolarmente suscettibili agli effetti tossici della chemioterapia. Il trattamento con melphalan e prednisone per via orale è stato la terapia standard per l'amiloidosi AL per molto tempo e ora è riservata ai pazienti a cattiva prognosi. Essa induce una remissione ematologica completa solo in una piccola percentuale di pazienti, con risultati scarsi in termini di risposta d'organo e miglioramento della sopravvivenza nel breve termine. Il trattamento oggi più efficace è rappresentato da alte dosi di melphalan (*high dosage melphalan*, HDM) per via endovenosa, a un dosaggio variabile tra 100 e 200 mg/m², seguite da trapianto autologo di cellule staminali (*autologous stem cell transplant*, ASCT). La tecnica dell'ASCT consiste nell'asportare e conservare in modo adeguato le cellule staminali dello stesso paziente, contenute in prevalenza nell'interno del midollo osseo, ma

presenti anche nel sangue periferico e nel sangue del cordone ombelicale al momento della nascita. Infatti, le cellule staminali si possono estrarre dal midollo osseo, attraverso una serie di punture midollari a livello delle ossa del bacino eseguite in anestesia generale, oppure ottenerle dal sangue periferico mediante l'aferesi, introducendo direttamente in vena ad ogni braccio: il sangue prelevato da un braccio passa attraverso l'apparecchiatura dell'aferesi, capace di rimuovere e conservare le cellule staminali, e ritorna (senza le cellule staminali) attraverso l'ago posto nell'altro braccio. Sono necessarie più sedute per avere cellule staminali sufficienti ma il procedimento è indolore e può essere eseguito anche su pazienti non ricoverati. Tuttavia, possono essere necessari giorni o anche settimane di raccolta per avere sufficienti cellule staminali per il trapianto, mentre la raccolta del midollo osseo può essere completata in appena due ore. Infine, le cellule staminali emopoietiche possono provenire dal sangue del cordone ombelicale, in cui sono molto abbondanti (si estraggono dal cordone, con il consenso della madre, subito dopo il parto). Le cellule staminali sono conservate a -180° C e reinfuse al malato dopo la chemioterapia con HDM. La percentuale di risposta ematologica completa è intorno al 40% e in alcuni casi si dimostra decisamente durevole (fino a 10 anni). Analogamente, si osserva un'evoluzione positiva per quanto riguarda le funzioni d'organo e la qualità della vita, con un prolungamento della sopravvivenza che supera ogni precedente terapia. Tuttavia, questa procedura si associa ad un'alta mortalità (15-40% in centri di riferimento), decisamente maggiore dei pazienti affetti esclusivamente da mieloma multiplo (<5%), a causa del tipico coinvolgimento multiorgano dell'amiloidosi AL⁶. Anche la morbilità correlata alla terapia è molto alta; in particolare, l'insufficienza renale acuta è una complicanza frequente (fino al 21%), pur reversibile nel 50% dei casi²⁹. Ne deriva la necessità di iniziare la terapia il più precocemente possibile, in condizioni di minore compromissione. Nei pazienti non eleggibili per HDM/ASCT, il gruppo di Pavia ha dimostrato che l'associazione di alte dosi di desametasone e melphalan per os induce una risposta ematologica nel 67% dei pazienti, con il 33% di

remissioni complete e miglioramento della funzionalità d'organo nel 48% dei casi³⁰. Tuttavia, la terapia steroidea non è ben tollerata dai pazienti con cardiopatia o edemi importanti (alte dosi di desametasone possono causare un'importante ritenzione idrica o lo scatenamento di aritmie ventricolari fatali). Altre opzioni terapeutiche in questi pazienti ed in quei casi che non rispondono al trattamento con HDM/ASCT sono rappresentate dalla talidomide e dalla lenalidomide, due agenti capaci di indurre soppressione citochinica, aumentare la risposta immunitaria ed inibire l'angiogenesi. Tali farmaci hanno dimostrato una certa efficacia (48% di risposta ematologica, 19% di remissione completa, 26% di risposta d'organo) in associazione con il desametasone, soprattutto nei casi di scompenso cardiaco ad alta portata, grazie all'attività antiangiogenetica capace di contrastare la formazione di fistole artero-venose. Tuttavia, la talidomide è mal tollerata nell'amiloidosi AL ed è stata confermata un'alta incidenza (65%) di tossicità grave, se pure in assenza di mortalità correlata al trattamento. In particolare è stata documentata astenia, neuropatia, peggioramento della funzione renale, bradicardia sintomatica con sincope, complicazioni tromboemboliche³¹. Si raccomanda pertanto un monitoraggio elettrocardiografico Holter seriato nei pazienti con amiloidosi AL trattati con talidomide. Farmaci di più recente introduzione, sia nel trattamento dell'amiloidosi AL che del mieloma multiplo, sono gli inibitori del proteasoma (bortezomib), da soli o in associazione con il desametasone (negli studi fino ad ora condotti è stata osservata una risposta ematologica nel 60% dei pazienti⁶). Un trattamento sperimentale piuttosto promettente è rappresentato da un derivato iodato della doxorubicina, che lega le fibrille amiloidi con elevata affinità e promuove la loro disaggregazione³². Recentemente è stato individuato un nuovo *target* per la terapia dell'amiloidosi: la proteina siero amiloide (*serum amyloid protein, SAP*). Il razionale di un tale trattamento si basa sul riscontro che la SAP conferisce alle fibrille amiloidi una particolare stabilità e resistenza alla proteolisi; inoltre, la SAP è presente in tutte le forme di amiloide, rendendo quindi il trattamento potenzialmente efficace in tutte i tipi di malattia. Il nuovo farmaco prende

il nome di CPHPC (R-1-[6-[R-2-carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid) ed è in grado di legare con alta affinità la SAP, inducendo la formazione di dimeri di SAP e occludendo il sito di legame con le fibrille amiloidi. I primi studi sono stati condotti su pazienti con Alzheimer con risultati molto incoraggianti, dimostrando un rapido e significativo calo dei livelli circolanti di SAP³³. Anche l'immunoterapia potrebbe presto diventare un'altra possibile scelta terapeutica, poiché sono stati testati con successo alcuni anticorpi umanizzati anti-catene leggere diretti contro lo specifico epitopo correlato con la deposizione di amiloide³⁴. Infine, nell'amiloidosi AL localizzata, i depositi di amiloide possono rispondere alla terapia chirurgica o radiante.

La disponibilità di diversi regimi terapeutici efficaci rende possibile definire la strategia terapeutica più opportuna per ogni singolo paziente, al fine di ottenere una soppressione rapida ed efficace della sintesi delle catene leggere amiloidogeniche al minimo costo in termini di tossicità. Sebbene una remissione ematologica completa sia sempre auspicabile, una riduzione delle catene leggere amiloidogeniche del 50- 75% è spesso sufficiente a portare a una stabilizzazione o regressione della disfunzione d'organo correlata all'amiloide e a un miglioramento della sopravvivenza³⁵. Per ridurre il più possibile la tossicità e per guadagnare tempo prezioso nel caso sia necessario ricorrere a una terapia di seconda linea, è raccomandato un *follow-up* molto stretto con misurazioni seriate della componente monoclonale.

Terapia dell'amiloidosi AA

L'amiloidosi sistemica reattiva presenta un'evoluzione più benigna rispetto all'amiloidosi AL. La terapia primaria è rappresentata dalla cura della malattia infiammatoria o infettiva di base e in alcuni casi è stato descritto anche il riassorbimento dei depositi di amiloide dopo il trattamento. Recentemente è stato introdotto un nuovo

farmaco, l'eprodinato, appartenente a una nuova classe di composti che agiscono sull'interazione tra le proteine amiloidogene e i glicosaminoglicani, inibendo così la polimerizzazione delle fibrille di amiloide e la loro deposizione³⁶. Questo farmaco è ben tollerato e sembra ritardare marcatamente la progressione della malattia renale, indipendentemente dal processo infiammatorio sottostante; tuttavia, per confermare questi dati positivi bisogna attendere ulteriori studi di conferma³⁷.

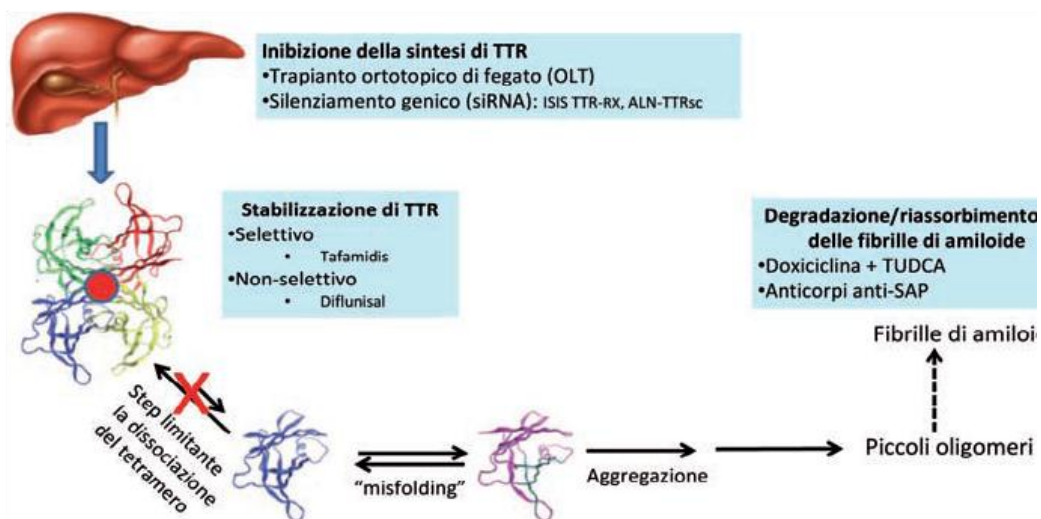
Terapia nelle amiloidosi AF e nella amiloidosi senile

La sopravvivenza dei pazienti con amiloidosi ATTR senza terapia è di 5-15 anni a partire dall'esordio della malattia. Il trapianto ortotopico di fegato rimuove la principale fonte di produzione di TTR mutata e fornisce una nuova sorgente di TTR normale. In tal modo, la maggior parte dei pazienti arresta la progressione della malattia e in alcuni si osserva un miglioramento della neuropatia autonoma e periferica; purtroppo la miocardiopatia spesso non migliora e in alcuni casi si aggrava a causa della deposizione di TTR normale, analogamente a quanto avviene nell'amiloidosi senile³⁸. Una terapia medica molto promettente in talsenso è rappresentata dal diflunisal, un farmaco antinfiammatorio non steroideo che agisce stabilizzando la TTR in una conformazione tetramerica non patogena³⁹. Con un meccanismo d'azione analogo, a novembre 2011 un nuovo farmaco che inibisce la dissociazione della TTR chiamato tafamidis, è stato approvato dalla Commissione Europea per il trattamento delle amiloidosi AF.

Il trattamento di scelta per la FMF è rappresentato dalla colchicina per via orale, che riduce la frequenza e l'intensità degli attacchi e previene lo sviluppo dell'amiloidosi. Purtroppo sono comuni effetti collaterali quali distensione e crampi addominali, intolleranza al lattosio, diarrea, che possono essere minimizzati cominciando a basse dosi e progredendo gradualmente fino alla dose massima tollerata. Non esistono alternative definite per l'esiguo numero di pazienti che non risponde alla colchicina o

non è in grado di tollerare i dosaggi terapeutici; sono in corso di sperimentazione alcuni farmaci biologici quali l'antagonista del recettore di IL-1 (Anakinra), gli inibitori di INF- α o di TNF (infliximab) (**Figura 11**).

Figura 11. Rappresentazione schematica dei target di trattamento. Il primo passo è la produzione da parte degli epatociti della transtiretina (TTR) a partire dal processo di traduzione del TTR-RNA messaggero (TTRmRNA) seguita dal rilascio del tetramero nel sangue. Il punto critico nella genesi dei depositi di amiloide è la dissociazione del tetramero in monomeri, cui segue l'aggregazione in fibrille mature. I farmaci volti a fermare il processo amiloidogenico agiscono bloccando la sintesi di TTR, bloccando i siti di legame per la tiroxina con conseguente stabilizzazione del tetramero oppure promuovendo la rimozione di fibrille già depositate. SAP, componente sierica P dell'amiloide; siRNA, *small interfering RNA*; TUDCA, acido biliare taurodesossicolico.



Terapia dell'amiloidosi sistemica senile

La terapia specifica della amiloidosi senile si avvale delle stesse opzioni terapeutiche utilizzate nelle altre forme di amiloidosi da transtiretina come la stabilizzazione selettiva o non-selettiva della proteina TTR e l'utilizzo di farmaci atti a promuovere la degradazione delle fibrille di amiloide. L'efficacia terapeutica tuttavia rimane ancora subottimale.

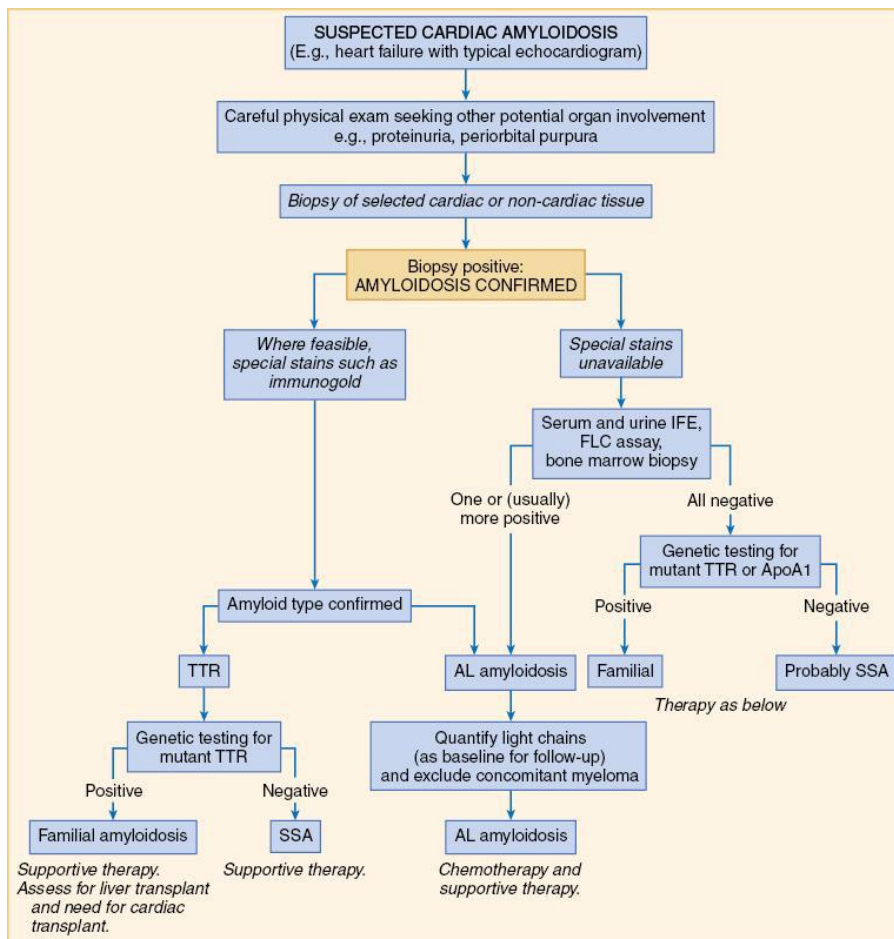
La popolazione affetta da amiloidosi senile è composta solitamente da pazienti che si trovano nella loro settima/ottava decade di vita e visto che la forma senile è caratterizzata da un decorso relativamente meno grave e meno aggressivo rispetto alle forme AL, la terapia attuata è una terapia sintomatica per contrastare e limitare la progressione della insufficienza cardiaca. I farmaci utilizzati in tal senso vengono descritti in maniera dettagliata successivamente.

Terapia cardiologica

La terapia di supporto è importante per i pazienti affetti da qualsiasi tipo di amiloidosi, in particolare per i pazienti con CA(**Figura 12**). La terapia cardine è basata sull'uso di diuretici. Alti dosaggi di diuretici prevalentemente utilizzati per via endovenosa sono più spesso utilizzati nei pazienti con stato anasarcatico. Gli ACE inibitori e sartanici si possono utilizzare anche se sono spesso mal tollerati anche a basse dosi a causa della comparsa di ipotensione arteriosa associata al loro uso. Non esistono studi in letteratura riguardo l'efficacia terapeutica dall'utilizzo di betabloccanti ma in ogni caso il loro utilizzo è spesso difficile da attuare a causa di episodi recidivanti di scompenso cardiaco o ipotensione severa secondaria alla malattia cardiaca di base. I calcio antagonisti invece sono considerati farmaci controindicati a causa del loro effetto inotropo negativo. Non esistono studi in letteratura sull'utilizzo di inotropi per via endovenosa in pazienti con scompenso cardiaco severo da CA. L'utilizzo infine della digitale è controindicato a causa dell'alto rischio di tossicità digitalica dovuta alla capacità della digitale di legarsi alla amiloide ed accumularsi a livello cardiaco provocando una intossicazione anche con livelli sierici in range terapeutico. Dal punto di vista dei dispositivi è cruciale l'utilizzo in questi pazienti dei defibrillatori impiantabili (*implantable cardioverter-defibrillator*, ICD) e dei *pacemaker* (PM) biventricolari per la stimolazione sincrona dei due ventricoli (*cardiac resynchronization therapy*, CRT), quando indicate⁴⁰. La terapia

specifica della fibrillazione atriale non differisce nell'amiloidosi rispetto alla popolazione generale (cardioversione medica o elettrica, ablazione dei *trigger* focali, terapia *ablate and pace*). Inoltre, tali pazienti spesso presentano ipotensione basale e/o ortostatica, che in alcuni casi deve essere trattata con terapia medica. In alcuni studi, è stato evidenziato come il trapianto cardiaco abbia significativamente migliorato nel paziente con amiloidosi AL e scompenso cardiaco la sopravvivenza a 4 (39%) e a 5 anni (30%), quando tale procedura avviene in associazione a terapia specifica (melphalan ad alte dosi e ASCT) per evitare la deposizione di amiloide nel cuore trapianto e in altri organi⁴¹.

Figura 12: Algoritmo per la valutazione ed il trattamento del paziente con amiloidosi cardiaca. Il sospetto clinico deve essere avvalorato da un'analisi istologica, condotta su di una biopsia cardiaca o extracardiaca. Per identificare il tipo di amiloidosi sono necessari ulteriori studi, in particolare esami immunoistochimici, il dosaggio delle catene leggere libere (*free light chains*, FLC) nel siero o nelle urine, la biopsia osteomidollare, il test genetico. ApoA1: apolipoproteina A1; IFE: elettroforesi con immunofissazione; SSA: amiloidosi sistemica senile; TTR: transtiretina.



Risonanza magnetica cardiaca e scintigrafia con difosfonati nella CA.

La risonanza magnetica cardiaca

La risonanza magnetica cardiaca (CMR), che rappresenta un metodo d'indagine relativamente recente se paragonata alle altre tecniche di *imaging* utilizzate in cardiologia (ecocardiografica, nucleare, radiologica), si sta affermando come tecnica di riferimento nella diagnosi non invasiva di varie forme di cardiopatia. La CMR infatti è in grado di fornire una valutazione complessiva della funzione cardiaca: definizione precisa dei volumi e delle funzioni ventricolari; identificazione delle cause dello

scompenso; valutazione della vitalità del miocardio; valutazione della perfusione del miocardio; valutazione della dissincronia meccanica; valutazione di eventuali malattie del pericardio⁴².

Le sue potenzialità e i suoi margini di utilizzo sono ancora oggetto di studio e ciò è particolarmente vero per la CA. Infatti, la CMR è particolarmente sensibile nell'identificare l'ispessimento delle pareti ventricolari e atriali causato dalla deposizione di amiloide. Inoltre, questa metodica permette un'analisi precisa del rapporto tra la massa ventricolare sinistra e il volume telesistolico, utile nel differenziare la CA dalla cardiomiopatia ipertrofica, soprattutto negli stadi precoci della malattia. Infine, bisogna considerare la capacità unica e innovativa di questa metodica di poter realizzare un'analisi tissutale "in vivo", senza bisogno di prelievi biotici.

Nell'iter diagnostico convenzionale comunque, la CMR ha un ruolo tardivo: viene effettuata dopo le metodiche descritte in precedenza e, piuttosto che un ruolo diagnostico, essa viene interrogata a completamento dello studio della funzione cardiaca.

Una via "atipica" di diagnosi può essere descritta nel momento in cui il paziente giunge alla valutazione CMR in assenza di sospetto clinico di CA e/o sistemica, con un sospetto clinico o ecocardiografico non dirimente: un *pattern* suggestivo di CA alla CMR può condurre alla diagnosi, che può essere confermata con una biopsia cardiaca o extra-cardiaca. Infatti, sempre più lavori in letteratura dimostrano l'elevata accuratezza di questa metodica. Lo studio del 2008 del gruppo di Vogelsberg⁴³ condotto su 33 pazienti, sottoposti a CMR e BEM; la CMR ha dimostrato una sensibilità dell'85% ed una specificità del 94%, con un valore predittivo positivo del 92% ed un valore predittivo negativo pari all'85%. Uno studio analogo è stato eseguito nel 2009⁴⁴ su 28 pazienti, ottenendo risultati paragonabili: sensibilità 86%, specificità 86%, valore predittivo positivo 95%, valore predittivo negativo 67%; inoltre, è stata osservata una correlazione diretta tra l'estensione della malattia valutata alla CMR con la tecnica del

Late Gadolinium Enhancement (LGE) e i livelli plasmatici di NT-proBNP ($p < 0.001$). Nello stesso anno a Cleveland 47 pazienti hanno eseguito i seguenti esami: ECG, ecocardiografia, CMR e BEM⁴⁵; l'accuratezza diagnostica della CMR si è rivelata superiore a tutte le altre metodiche non invasive, con una sensibilità dell'88%, una specificità del 90%, un valore predittivo positivo dell'88% e un valore predittivo negativo del 90% e alla *Cox proportional hazards analysis* la positività alla CMR rappresentava il più forte predittore di mortalità ad un anno ($p = 0,03$). La superiorità della CMR rispetto alle altre tecniche di *imaging* non invasive, in particolare l'ecocardiografia, è stata sottolineata anche nel lavoro del gruppo di Syed⁴⁶; in particolare, in una popolazione di 35 pazienti con diagnosi istologica di CA, la CMR è risultata positiva nel 97% dei casi, mentre la positività dell'ecocardiografia (intesa come ispessimento della parete del ventricolo sinistro) è stata registrata nel 91% dei pazienti. Un limite comune a tutti questi lavori è il ridotto numero di pazienti arruolati, legato soprattutto all'invasività e al conseguente limitato numero di BEM.

Late Gadolinium Enhancement

Negli ultimi anni numerosi studi hanno validato l'utilità della metodica di LGE ed in particolare delle immagini postcontrastografiche nella diagnosi di CA, nella diagnosi differenziale tra AL-CA e TTR-CA e anche nella stratificazione del rischio di morte cardiaca in popolazioni di pazienti affetti da CA (**Tabella 2**).

Tabella 2. Studi principali di risonanza magnetica cardiaca nella amiloidosi cardiaca.

| <i>Autore</i> | <i>Giornale</i> | <i>Casistica</i> | <i>Tecnica</i> | <i>Messaggio chiave</i> |
|---------------|------------------|------------------|----------------|---|
| Maceira | Circulation 2005 | 30 pz | LGE | LGE presenta un caratteristico pattern di distribuzione subendocardico. |

| | | | | |
|------------|----------------------|--------|--|---|
| Perugini | Heart 2006 | 21 pz | LGE | LGE è comune ma non presente in tutti i casi di CA. |
| Maceira | JCMR 2008 | 29 pz | LGE | Valore prognostico di LGE nelle CA. |
| Austin | JACC CVI 2009 | 47 pz | LGE | LGE rappresenta un predittore di mortalità nella CA, più forte e più accurato rispetto ad altre tecniche di imaging non invasivo. |
| Mongeon | JACC CVI 2012 | 38 pz | T1 mapping postcontrastografico | VEC identifica una espansione sostanziale dello spazio interstiziale. |
| Banypersad | Circulation CVI 2013 | 60 pz | T1 mapping precontrastografico | VEC medio significativamente maggiore rispetto ai soggetti sani. |
| Karamitsos | JACC CVI 2013 | 53 pz | T1 mapping precontrastografico | T1 mapping pre-contrasto presenta una accuratezza diagnostica maggiore rispetto a LGE. |
| Dungu | JACC CVI 2014 | 97 pz | LGE | Pattern di distribuzione transmurale di LGE distingue TTR-CA dagli AL-CA. |
| Aquaro | Int J CVI 2014 | 59 pz | T1 mapping e decadimento intensità segnale | L'analisi del decadimento dell'intensità di segnale postcontrastografico migliora l'accuratezza diagnostica nella CA. |
| Di Bella | J CV Med 2014 | 28 pz | LGE | L'interessamento amiloidotico atriale provoca rimodellamento e disfunzione atriale sinistra. |
| Fontana | JACC CVI 2014 | 121 pz | T1 mapping pre e postcontrastografico | T1 mapping pre-contrasto identifica i pazienti con TTR-CA con simile accuratezza diagnostic rispetto ai pazienti con AL-CA. |
| Barison | J Int Med 2015 | 36 pz | T1 mapping postcontrastografico | Il VEC miocardico è aumentato in pazienti con amiloidosi e correla con la severità di malattia. |
| Banypersad | EHJ 2015 | 100 pz | T1 mapping pre e postcontrastografico | Il VEC miocardico e T1 mapping precontrastografico predicono la mortalità in pazienti con amiloidosi sistemica. |

LGE: *late gadolinium enhancement*; pz: pazienti; CA: amiloidosi cardiaca; VEC: volume extracellulare;

AL-CA: amiloidosi cardiaca AL; TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR.

Nello specifico, l'analisi tissutale effettuata si realizza tramite l'utilizzo di sequenze *fast gradient echo inversion recovery* (GRE IR) e prevede la somministrazione di mezzi di contrasto paramagnetici (in cardiologia viene utilizzato il Gadolinio acido Dietilen-Triamin-Penta-Acetico, Gadolinio DTPA) con acquisizione tardiva (a distanza di 10-15 minuti dall'infusione del mezzo di contrasto) di immagini T1 pesate. In tal modo è possibile ottenere immagini con un elevato rapporto segnale/rumore, altamente riproducibili, caratterizzate da zone di miocardio patologico ad elevato segnale (*definite late gadolinium enhancement* LGE) e zone di miocardio sano ipointense. Tale fenomeno si basa su due concetti fondamentali: i mezzi di contrasto paramagnetici sono

di tipo extracellulare e in condizioni normali non sono in grado di oltrepassare il sarcolemma⁴⁷ nel miocardio sano i miociti sono fittamente stipati fra loro e la componente cellulare rappresenta la maggioranza del volume (80-85%).

Pertanto, in condizioni normali, il volume di distribuzione del gadolinio DTPA, (espressione del LGE) è minimo perché il *voxel* è occupato principalmente dalla componente cellulare (segnale ipointenso). Invece, in tutte le condizioni patologiche in cui avviene un aumento dello spazio interstiziale, si osserva una maggior distribuzione del mezzo di contrasto e conseguentemente un *hyperenhancement* legato all'accorciamento del T1. Inoltre, la cinetica del mezzo di contrasto presenta in tali aree un ritardo nel lavaggio del gadolinio rispetto al miocardio normale, giustificandol'acquisizione tardiva delle immagini⁴⁸. Infine, attraverso sequenze di *inversion recovery* (IR) si acquisiscono immagini dopo un tempo di inversione tale da annullare il segnale del miocardio normale (circa 220-250 msec), al fine di esaltare il contrasto tra le aree normale e le aree di *hyperenhancement*. La presenza, l'estensione e la localizzazione del LGE permette di distinguere una disfunzione VS legata ad una cardiopatia ischemica (distribuzione subendocardica o transmurale in corrispondenza del letto vascolare di un'arteria coronaria) o non ischemica (figura 13), come si verifica nella CA, in cui si apprezza un *hyperenhancement* diffuso del subendocardio, ed in misura minore del subepicardio, a livello delle pareti ventricolari ispessite, con possibile coinvolgimento anche delle pareti atriali (**figura 14 A e B**).

Figura 13. Pattern di distribuzione LGE in cardiopatie ischemiche e non ischemiche.

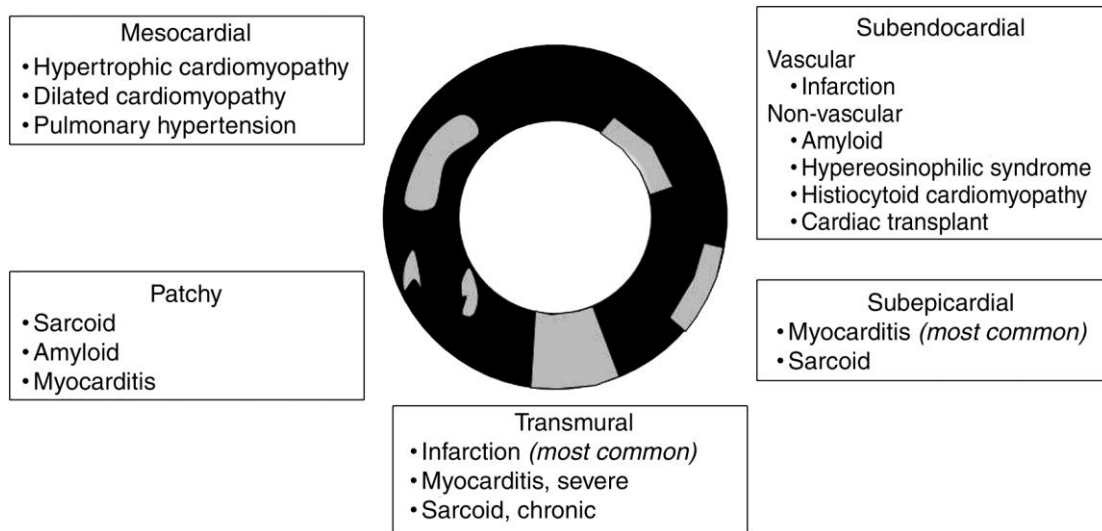
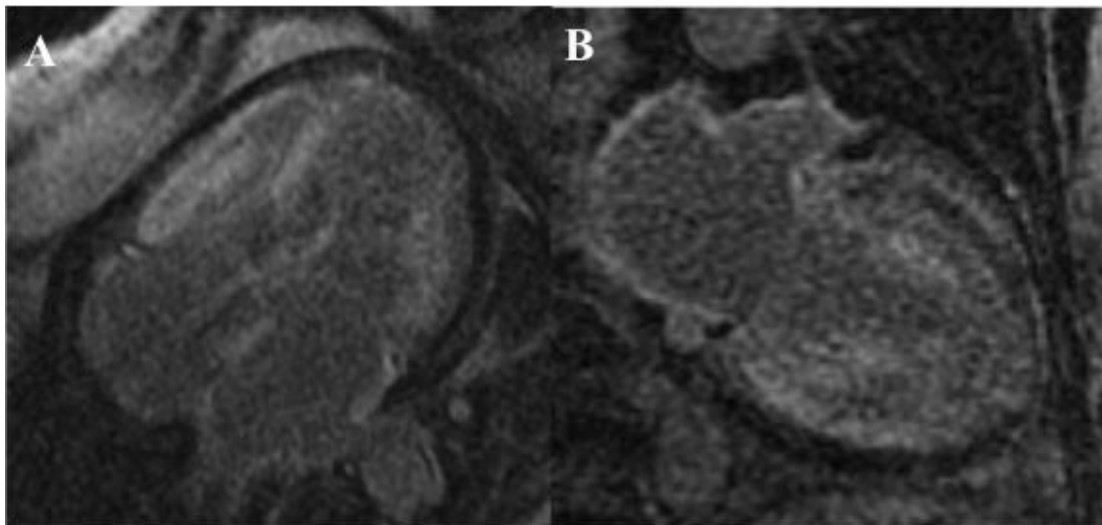


Figura 14. Immagini postcontrastografiche 4 camere (A) e 2 camere (B) con evidenza di diffuso e transmurale *late gadolinium enhancement* a carico di tutte le camere cardiache.



Inoltre, anche il sangue contenuto nelle cavità cardiache presenta modificazioni nell'cinetica del gadolinio: 2 minuti dopo l'iniezione del mezzo di contrasto, il T1 del sangue è simile tra pazienti con amiloidosi e i controlli, ma la clearance del gadolinio appare nei malati più veloce, determinando un allungamento del T1. In conseguenza di tali effetti, la differenza tra il T1 del sangue ed il T1 del miocardio nei casi di amiloidosi

è marcatamente ridotta rispetto ai casi controllo; tale parametro, insieme all'analisi del pattern di LGE, è stato in grado di raggiungere in alcuni studi un'accuratezza nell'identificare l'AC del 97%¹⁶.

Significato istopatologico del LGE

Per comprendere il significato istopatologico del LGE sono stati fondamentali gli studi che hanno confrontato le zone di LGE ottenute con la CMR e i corrispondenti campioni biopsici. In tal senso, importanti studi condotti su animali con cardiopatia ischemica e pazienti con cardiomiopatia ipertrofica⁴⁹ hanno rilevato rispettivamente come le zone di LGE rappresentavano rispettivamente aree di fibrosi miocardica⁵⁰ e aree con fibrosi, *disarray* (cellule cardiache con orientamento estremamente disorganizzato) e alterazioni dei piccoli vasi. Nella CA, il significato istopatologico del LGE è più controverso. Secondo alcuni autori il LGE è espressione di un'espansione degli spazi interstiziali a livello miocardico, secondaria all'infiltrazione di amiloide¹⁶. Altri studi hanno però messo in discussione l'associazione diretta tra LGE e depositi di amiloide, ipotizzando un'espansione interstiziale legata a un processo infiammatorio, a un danno cellulare di membrana che determina la penetrazione intracellulare del gadolinio o ancora alla presenza di fibrosi interstiziale seguente a un'ischemia miocardica⁵¹. Quest'ultima ipotesi è stata effettivamente dimostrata grazie ad un'analisi istologica completa condotta in 5 pazienti con CA che hanno subito trapianto cardiaco⁵², ma sono necessari ulteriori e più ampi studi per confermare questa associazione, anche perché un'infiltrazione di amiloide senza fibrosi interstiziale può comunque causare LGE¹⁵. Resta infine da spiegare l'assenza di LGE in alcuni pazienti con diagnosi istologica di CA: alcuni autori hanno speculato che un'infiltrazione miocardica diffusa e uniforme possa eliminare le differenti aree di segnale che sono alla base del riconoscimento del LGE⁵¹.

Significato clinico del LGE

In generale, il rilievo di LGE a livello cardiaco è molto importante dal punto di vista clinico, perché si associa ad aritmie cardiache, disfunzione microcircolatoria, disfunzione miocardica, progressione verso le forme di scompenso cardiaco *end-stage* e peggior prognosi *quoad vitam* e *quoad valetudinem*. Alcuni lavori hanno già evidenziato come nell'amiloidosi il LGE sia associato a una ridotta sopravvivenza e abbia un valore indipendente e aggiuntivo rispetto alla valutazione clinica della funzione cardiaca^{45,53,54}, ma sono necessari studi più ampi.

T1 mapping

Oltre alle metodiche LGE tradizionali sopra descritte, negli ultimi anni si sono sviluppate tecniche di mappaggio del tempo T1 pre- e post-contrasto. Il tempo T1 varia in base alla presenza e concentrazione delle molecole di acqua e pertanto è in grado di caratterizzare ogni tessuto diverso in maniera precisa. Il tessuto miocardico sano presenta tempo T1 diverso, rispetto al sangue o al tessuto adiposo. Questo valore, oltre a variare però in base al tessuto analizzato, varia anche in base allo stato patologico del tessuto stesso. In presenza di edema, infiammazione o fibrosi il tempo T1 pre e post contrasto cambia. In particolare il tempo T1 aumenta in presenza di edema miocardico⁵⁵, fibrosi⁵⁶ ed amiloidosi⁵⁷ e diminuisce in patologie come la emocromatosi⁵⁸ e la malattia di Fabry⁵⁹.

Queste innovazioni tecnologiche nel campo della RMN permettono oggi di ottenere il valore di T1 miocardico ed ematico documentando in tale maniera fenomeni fisiopatologici che si verificano a livello miocardico, quantificando alterazioni miocardiche. Il T1 *mapping* pre-contrasto o nativo ha il vantaggio di offrire delle informazioni diagnostiche importanti senza necessità di somministrazione del mezzo di

contrasto, permettendo in tal modo di poter utilizzare questa tecnica anche in pazienti dove l'utilizzo del mezzo di contrasto viene utilizzato molto raramente come nel caso dei pazienti con insufficienza renale cronica di grado avanzato. Nel caso specifico della CA, Karamitsos et al. hanno già dimostrato come il T1 nativo è presenta una accuratezza diagnostica maggiore rispetto a LGE in una popolazione di pazienti con AL-CA⁵⁷. Anche nella TTR-CA il T1 nativo dimostra di essere un potente strumento diagnostico⁶⁰.

L'utilizzo del T1 nativo però ci permette di ottenere delle informazioni sulla presenza di uno stato patologico a livello miocardico senza essere in grado però di differenziare tra una patologia intracellulare o una patologia legata ad un aumento dello spazio extracellulare. In ausilio a ciò, il T1 mapping post contrasto permette di ottenere la misurazione del volume extracellulare dopo la somministrazione di mezzo di contrasto ottenendo in tale maniera informazioni preziose sullo stato dello spazio interstiziale. La tecnica post-contrasto riesce a dicotomizzare il miocardio nella sua parte cellulare ed extracellulare. Banyersad et al. hanno dimostrato come il volume extracellulare medio è significativamente maggiore in pazienti con CA⁶¹. Oltre al potere diagnostico il T1 *mapping* post-contrasto si è dimostrato anche un potente marcatore prognostico. Barison et al. hanno descritto oltre ad un aumento del volume extracellulare in pazienti con CA anche la sua correlazione con la severità di malattia⁶². Nello stesso anno Banyersad et al. hanno documentato il ruolo sia del T1 pre- che post-contrasto come indici predittivi di mortalità in 100 pazienti affetti da CA⁶³.

Limitazioni della CMR

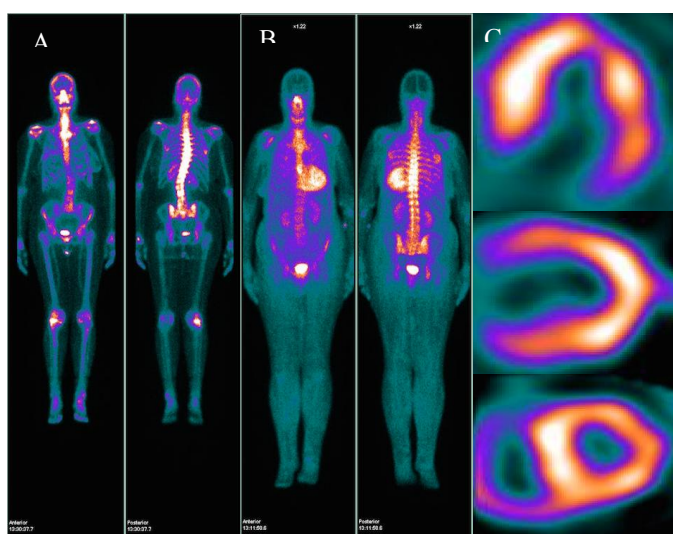
Le principali limitazioni della CMR sono rappresentate dai dispositivi cardiaci impiantabili, dall'insufficienza renale e dalle ridotte dimensioni del tunnel che impedisce l'esecuzione dell'esame ad una percentuale variabile di pazienti che soffrono

di claustrofobia. I campi magnetici a elettrofrequenza possono potenzialmente causare movimenti degli elettrocateri, variazioni nella programmazione del dispositivo e riscaldamento del *device*⁶⁴. Dato il crescente numero di pazienti portatori di pacemaker, defibrillatori cardiaci impiantabili o di registratori del ritmo cardiaco impiantabili, sono stati brevettati alcuni dispositivi compatibili con la CMR⁶⁵. Per quanto riguarda la funzione renale, le limitazioni riguardano l'uso di gadolinio, che è responsabile della fibrosi sistemica nefrogenica (*nephrogenic systemic fibrosis*, NSF) nei pazienti con insufficienza renale. La fisiopatologia della NSF non è ancora completamente conosciuta, ma è stato ipotizzato che l'accumulo del gadolinio nei tessuti e negli organi determini un effetto tossico che conduce alla fibrosi ed alla disfunzione d'organo. La NSF è stata osservata solo in pazienti con insufficienza renale severa (definita come una stima del filtrato glomerulare <30 mL/min/1,73 m²) poiché l'eliminazione del gadolinio, che avviene per via renale, è sostanzialmente prolungata in questi pazienti. L'incidenza di NSF nella popolazione generale è stimata tra 0,04% e 0,001%, ma sale fino al 2,4% se considera i pazienti in terapia sostitutiva renale (dialisi). La mortalità della NSF è alta e al momento non è disponibile un trattamento specifico; pertanto, la funzione renale deve essere valutata prima di ogni somministrazione di gadolinio e una CMR senza gadolinio deve essere preferita in tutti i pazienti con riduzione severa della funzione renale.

Scintigrafia ossea con difosfonati

Le metodiche di medicina nucleare hanno dimostrato un ruolo non trascurabile nella diagnosi precoce della CA (**Tabella 3**). Nel corso degli ultimi decenni sono stati studiati diversi traccianti scintigrafici (principalmente fosfonati) per la valutazione dei depositi di amiloide a livello cardiaco, con risultati molto eterogenei e talora contraddittori. La scintigrafia con siero amiloide componente P marcato con 123 iodio (*¹²³I labeled-serum amyloid P component, ¹²³I-SAP*) fornisce una affidabile valutazione semiquantitativa dell'estensione e della distribuzione dei depositi di amiloide in varie parti del corpo ma non specificamente nel cuore⁶⁶. La scintigrafia con aprotinina marcata con tecnezio 99 (^{99m}Tc-aprotinina) identifica i depositi di amiloide extra-addominali inclusi quelli cardiaci. La scintigrafia con difosfonati identifica il deposito miocardico di amiloide nella forma TTR relata ma non in quella da AL facilitando la diagnosi differenziale tra le due nella pratica clinica⁶⁷ (**Figura 15**).

Figura 15: Esempi rappresentativi dello spettro di uptake miocardico di ^{99m}Tc-HMPD tra pazienti con amiloidosi cardiaca TTR-relata e controllo non affetto. La figura riporta le immagini anteriori e posteriori total-body di un controllo non affetto (A) e di un paziente con amiloidosi cardiaca TTR (B), mentre a destra (C) vengono rappresentate le immagini multiplanari cardiache trasversali ed asse corto del secondo paziente.



Inoltre, nei pazienti con TTR-CA, la scintigrafia con tecnezio 99 dicarbossi-propanodifosfonato (^{99m}Tc -DPD), può identificare precocemente l'infiltrazione miocardica ancora prima che appaiano alterazioni ecocardiografiche. La captazione miocardica del tracciante è correlata in modo lineare con la massa ventricolare sinistra e rappresenta un determinante prognostico dell'*outcome* nella TTR-CA sia da solo che in combinazione con lo spessore parietale del ventricolo sinistro⁶⁷. La tomografia a emissione di fotone singolo (*single photon emission computed tomography*, SPECT) associata a meta-iodobenzilguanidina marcata con Iodio 123 (^{123}I -MIBG), un analogo della noradrenalina, è in grado di accumularsi a livello delle terminazioni presinaptiche del sistema nervoso simpatico, permettendo di valutare l'innervazione noradrenergica a livello cardiaco. Tipicamente, una denervazione si osserva nelle fasi anche precoci della TTR-CA e nei pazienti con AL-CA e segni di neuropatia autonoma^{68,69}.

Tabella 3. Studi principali di medicina nucleare con difosfonati nella amiloidosi cardiaca.

| Autore | Giornale | Casistica | Tracciante | Messaggio chiave |
|-----------|-------------------------|-----------|------------------|---|
| Wizenberg | Am Heart J 1982 | 10 pz | Tc-99m-PYP | Captazione intensa e diffusa di Tc -99m-PYP in pz con TTR-CA. |
| Falk | Am J Card 1983 | 20 pz | Tc-99m-PYP | Tc-99m-PYP è sensibile e specifico nella diagnosi di CA. |
| Hawkins | NEJM 1990 | 50 pz | 123I-SAP | 123I-SAP può essere usato per la diagnosi, localizzazione e monitoraggio di progressione della amiloidosi sistemica. |
| Tanaka | JACC 1997 | 12 pz | 123-MIBG | I pz con FAP mostrano elevate incidenza di denervazione adrenergica miocardica. |
| Hongo | Am Heart J 2002 | 16 pz | 123-MIBG | 123-MIBG in pz con AL-CA e neuropatia autonoma mostra prominente denervazione adrenergica miocardica. |
| Schaadt | J Nucl Med 2003 | 22 pz | Aprotinina | L'aprotinina rappresenta un tracciante con buona specificità e sensibilità nella diagnosi di CA. |
| Perugini | JACC 2005 | 25 pz | 99mTc-DPD | La scintigrafia con 99mTc-DPD è utile nella diagnosi differenziale tra TTR-CA ed AL-CA. |
| Rapezzi | Eur J Nucl 2011 | 77 pz | 99mTc-DPD | 99mTc-DPD è utile nella differenziazione tra TTR-CA ed AL-CA, con lieve captazione anche in circa un terzo di pz con AL-CA. |
| Rapezzi | JACC CVI 2011 | 63 pz | 99mTc-DPD | 99mTc-DPD è un marcatore prognostico per eventi cardiaci nell'AL-CA. |
| Bohkari | Circulation CVI 2013 | 45 pz | Tc-99m-PYP | Tc-99m-PYP distingue tra AL-CA ed TTR-CA. |
| Minutoli | AJR 2013 | 18 pz | Tc-99m-PYP | La risonanza magnetica cardiaca sottostima l'infiltrazione amiloidotica in confronto a Tc-99m-PYP. |
| Dorbala | JACC HF 2014 | 31 pz | N-13 ammonia PET | I pz con CA presentano una elevata prevalenza di disfunzione microcircolatoria coronarica. |

pz: pazienti; Tc-99m-PYP: tecnezio 99 pirofosfato; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL; TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; 123I-SAP: 123 iodio siero amiloide P; 123-MIBG: 123 meta-iodobenzilguanidina; CA: amiloidosi cardiaca; FAP: polineuropatia amiloidotica familiare; 99mTc-DPD: tecnezio 99 dicarbossi-propano-difosfonato.

Scopo dello studio

Da quanto suddetto risulta chiaro che la CA rappresenta una malattia altamente eterogenea, e molto spesso, difficile da diagnosticare. Una corretta diagnosi ma anche e soprattutto delle sue diverse forme è pertanto indispensabile. Una diagnosi tempestiva inoltre, permette di eseguire, in tempi ancora utili, la stratificazione prognostica del paziente affetto da CA ma anche e soprattutto l'iter terapeutico più opportuno. Come sopra descritto l'approccio terapeutico dei vari sottotipi è completamente diverso. Farmaci utili nel contrastare una sottoforma di CA possono essere non solo inefficaci ma anche dannosi in un'altra sottoforma. A tal proposito le metodiche diagnostiche a nostra disposizione possono e devono essere selezionate e utilizzate correttamente per rappresentare degli strumenti idonei ed utili verso una diagnosi tanto precoce quanto accurata. Fino ad oggi in letteratura scientifica non esistono lavori che abbiano valutato in maniera sistematica la capacità combinata di CMR e scintigrafia con difosfonati e la *feasibility* delle due tecniche nella diagnosi di amiloidosi cardiaca, soprattutto per quel che riguarda la capacità di due metodiche di *imaging* diverse di evidenziare in maniera affidabile e riproducibile l'estensione e la localizzazione segmentaria dei depositi di amiloide a livello biventricolare. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare il ruolo combinato della CMR e della scintigrafia con difosfonati nella diagnosi di CA.

Finalità specifiche dello studio di questa popolazione sono state:

- a) valutare la prevalenza di CA in una popolazione di pazienti con alto sospetto clinico per tale patologia valutando inoltre le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione affetta da AL-CA e TTR-CA;
- b) valutare la *feasibility* di esecuzione di due esami di terzo livello come la scintigrafia con difosfonati e CMR nella nostra popolazione;

c) valutare la specificità, sensibilità ed accuratezza diagnostica della CMR e della scintigrafia ossea con difosfonati nella diagnosi di CA e nella diagnosi differenziale di TTR-CA;

d) studiare le caratteristiche morfo-funzionali e tissutali cardiache;

e) determinare la capacità dell'*imaging* multiplanare della SPECT, nella sottopopolazione affetta da TTR-CA, di valutare in termini qualitativi e semiquantitativi la localizzazione segmentaria ed estensione dei depositi di amiloide nel tessuto miocardico ventricolare destro e sinistro e confrontare tali risultati con i dati ottenuti tramite l'utilizzo della CMR, *gold standard* attuale in materia.

Materiali e metodi

Dal gennaio 2011 fino al marzo 2015 sono stati considerati come potenzialmente candidati per essere arruolati nel nostro studio, tutti i pazienti riferiti alla Unità Operativa di Cardiologia e Medicina Cardiovascolare della Fondazione Toscana Gabriele Monasterio che dopo una caratterizzazione cardiologica presentavano il sospetto clinico di CA e che sono stati indirizzati a una scintigrafia con HMDP e ad una CMR.

Da questa popolazione sono stati arruolati tutti i pazienti che avevano eseguito un esame di CMR senza e con mezzo di contrasto ed un esame di scintigrafia ossea con idrossimetildifosfonato (HMDP) con una distanza temporale tra i due esami inferiore ai tre mesi. Tutti i pazienti arruolati nello studio sono stati seguiti successivamente mediante visite cardiologiche di controllo e/o *follow-up* telefonico fino al concludersi del loro iter diagnostico e la formulazione di una diagnosi eziologica definitiva. Tutti i pazienti inclusi nello studio dovevano avere una diagnosi definitiva al momento dell'analisi statistica dei dati. Infine i pazienti arruolati hanno accettato di partecipare a

questo studio, dando il loro consenso informato all'utilizzo, in maniera anonimizzata, ed all'analisi dei loro dati clinici.

Caratterizzazione cardiologica

La valutazione cardiologica prevedeva oltre all'anamnesi e l'esame obiettivo, una radiografia del torace in piedi in 2 proiezioni (antero-posteriore e latero-laterale), elettrocardiogramma (ECG) di superficie a 12 derivazioni ed ecocardiogramma transtoracico basale eseguito con l'utilizzo di un ecocardiografo Doppler 2D (*Vivid 7-cardiac dedicated ultrasound*, General Electric Healthcare®, Milwaukee, Wisconsin), con il quale è stato possibile valutare la funzione biventricolare globale e regionale, la massa ventricolare sinistra, la funzione diastolica, la presenza di eventuali vizi valvolari, le dimensioni atriali oltre alla presenza di versamento pleurico, pericardico e comete polmonari.

Esami biumorali

La troponina T ultrasensibile è stata valutata per mezzo di un saggio d'immunochemiluminescenza (TnT-hs, Elecsys, Roche Diagnostics). Il frammento N-terminale del propeptide natriuretico cerebrale da un saggio automatizzato di immunochemiluminescenza (Elecsys, Roche Diagnostics, Monza, Italy).

Per la valutazione della funzione renale è stato effettuato il dosaggio della creatinemia ed è stata calcolata una stima della clearance della creatinina mediante il calcolo del filtrato glomerulare stimato utilizzando la formula di Cockcroft-Gault. In base alla stima della clearance della creatinina, i pazienti sono stati suddivisi in cinque stadi secondo la stadiazione dell'insufficienza renale cronica secondo *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* della *U.S. National Kidney Foundation*

La funzione epatica è stata valutata con il dosaggio della bilirubina totale, dell'aspartato, dall'alanina transaminasi, dagli indici di colestasi: gamma-glutamilttranspeptidasi (γ -GT) e fosfatasi alcalina (ALP).

L'analisi delle catene leggere è stata condotta con un'elettroforesi sierica con immunofissazione su gel di agarosio (SeaKem ME agarose, Cambrex Bio Science), al fine di valutare la presenza di catene leggere κ e λ totali e libere e il rapporto κ/λ . L'immunofissazione è stata realizzata con anticorpi anti-IgG, -IgA, -IgM, - κ e - λ . La concentrazione delle catene leggere libere nel siero è dosata mediante nefelometria (nefelometro Behring BN II).

Diagnosi eziologica di amiloidosi

La diagnosi eziologica di amiloidosi è stata confermata su base biotica cardiaca o extracardiaca. L'identificazione anatomopatologica delle fibrille di amiloide è stata condotta su prelievi biotici eseguiti a livello del grasso periombelicale e dell'endomiocardio. Nel primo caso è stata effettuata un'aspirazione mediante ago sottile (18 *Gauge*) sotto anestesia locale. Il tessuto fibroadiposo è stato fissato con formalina e glutaraldeide e quindi valutato mediante colorazione Rosso Congo al microscopio a luce polarizzata. È seguita la caratterizzazione immunoistochimica ultrastrutturale delle fibrille di amiloide e il test genetico per confermare il tipo preciso di amiloidosi. Per la biopsia endomiocardica si rimanda all'apposito paragrafo. La biopsia osteomidollare è stata condotta per verificare la presenza di un'espansione monoclonale nel midollo osseo; la sede utilizzata è stata la cresta iliaca anteriore o posteriore, previa disinfezione della cute e dopo aver anestetizzato localmente la pelle e la parte più esterna dell'osso prescelto per il prelievo. Spesso è stata praticata una piccola incisione sulla cute di pochi millimetri con un bisturi, per agevolare la penetrazione dello strumento nell'osso e, soprattutto, per impedire che la piccola

porzione di midollo prelevato non venga perso al momento del ritiro dell'ago. L'ago è stato inserito manualmente o mediante un supporto elettrico su cui viene montato direttamente l'ago (OnControl™ *Bone Marrow Biopsy and Aspiration System*) nella profondità dell'osso per un paio di centimetri e successivamente ritirato: il frustolo di midollo (un cilindro con 2 cm di lunghezza e 2 mm di spessore) contenuto all'interno dell'ago è stato immerso in un liquido (per conservare il preparato fino al momento dell'esame) ed inviato al laboratorio di anatomia patologica. La procedura veniva conclusa con l'applicazione di una medicazione sul sito della procedura.

Protocollo di acquisizione di risonanza magnetica cardiaca

L'esame di CMR è stato realizzato con un tomografo di 1.5 Tesla (Signa Hdx, General Electric Healthcare, Milwaukee, Wisconsin) con una bobina *phased array* cardiaca a 8 canali. La valutazione dei parametri funzionali ventricolari è stata realizzata tramite l'acquisizione di un *set* di immagini in cine in asse corto ventricolare dal piano valvolare mitralico all'apice del ventricolo sinistro, usando sequenze in precessione libera allo stato stazionario (SSFP). Protocollo di acquisizione: 30 fasi; spessore di ogni fetta pari a 8 mm senza interruzione; 8 proiezioni per segmento; Numero di Eccitazione (NEX) = 1; Campo di vista (*field of view*, FOV) = 40 cm; fase del FOV = 1; matrice = 224 x 224; matrice di ricostruzione = 256 x 256; angolo di rotazione = 45°; TR/TE pari a 3.5/1.5; ampiezza di banda = 125 kHz).

La cinetica del segnale post-iniezione di Gadolinio (Magnevist, Schering-AG, al dosaggio di 0.2 mmol/kg) è stata effettuata tramite acquisizione di un set di immagini in asse lungo orizzontale con tecnica LGE. La prima immagine è acquisita un minuto dopo l'iniezione del mezzo di contrasto, mentre le immagini successive sono separate dalle precedenti da intervalli di un minuto, per 8 minuti consecutivi. Tali immagini sono state acquisite con i seguenti parametri: un tempo di inversione (TI) fisso scelto per annullare

il segnale del miocardio normale (250 msec), FOV = 40 cm; spessore di ogni fetta pari a 8 mm senza interruzione; TR = 4.6 msec; TE = 1.4 msec; angolo di nutazione = 20°; matrice = 224x192; matrice di ricostruzione = 256x256; NEX=1.

La presenza, l'estensione e la distribuzione del miocardio patologico è stata valutata con la tecnica convenzionale del LGE. Le immagini sono state acquisite dieci minuti dopo la somministrazione di Gd-DTPA in proiezioni in asse corto dal piano valvolare mitralico all'apice del ventricolo sinistro, usando una sequenza GRE-IR, *Gradient Echo* previo impulso di 180° (*Inversion Recovery*). Protocollo di acquisizione: FOV = 40 cm; spessore di ogni fetta pari a 8 mm senza interruzione; TR = 4.6 msec; TE = 1.4 msec; TI = 250 msec; angolo di nutazione = 20°; matrice = 224x192; matrice di ricostruzione = 256x256; NEX = 1.

Studio dei volumi ventricolari e della funzione cardiaca

L'analisi delle immagini di CMR è stata possibile grazie ad un software dedicato (MASS Analysis®, Leiden University Medical Center, Netherlands) applicando un approccio convenzionale. Il *software* MASS Analysis ha consentito di creare rappresentazioni bi e tridimensionali delle funzionalità cardiache dei ventricoli destro e sinistro, quali la frazione di eiezione, la gittata sistolica, la cinetica parietale, lo spessore e l'ispessimento parietale. È possibile rilevare automaticamente i profili del ventricolo sinistro utilizzando il set di immagini in cine in asse corto ventricolare dal piano valvolare mitralico all'apice del ventricolo sinistro, acquisite usando sequenze in precessione libera allo stato stazionario (SSFP); tuttavia, per evitare irregolarità, i profili sono stati tracciati manualmente dopo aver identificato il *frame* telesistolico e telediastolico nello stesso *set* di immagini (i profili tracciati manualmente sono stati usati come modello per i profili da rilevare automaticamente nelle immagini vicine). I profili utilizzati sono stati: il profilo endocardico ed epicardico del ventricolo sinistro,

due profili papillari per il ventricolo sinistro, il profilo endocardico ed epicardico del ventricolo destro. Infine, tutti i profili vengono utilizzati per calcolare oltre alla massa ventricolare destra, il volume ventricolare sinistro e, sulla base di tale valore, la frazione di eiezione e la gittata sistolica.

Late Gadolinium Enhancement

Le immagini di LGE convenzionale ottenute dopo dieci minuti dall'iniezione di mezzo di contrasto sono state analizzate da quattro operatori esperti che avessero effettuato almeno 1000 esami di CMR. Sono stati definiti 3 pattern LGE di presentazione: 1) assenza di fibrosi quando non era osservabile un *hyperenhancement* del miocardio; 2) *pattern* di tipo ischemico; 3) *pattern* di tipo non ischemico. Il pattern ischemico è rappresentato dal coinvolgimento dello strato subendocardico con maggiore o minore estensione in senso trasmurale, ad aspetto confluyente, localizzato nel territorio di vascolarizzazione di un'arteria coronaria. Il *pattern* non ischemico tipicamente associato all'amiloidosi è caratterizzato dalla presenza di un interessamento più o meno diffuso del subendocardio del ventricolo sinistro, senza regionalità coronarica, con frequente coinvolgimento anche del subepicardio a livello settale e, nelle forme più avanzate, anche delle pareti atriali e del ventricolo destro. Inoltre, il pattern LGE dell'amiloidosi si associa spesso ad un precoce annullamento del segnale all'interno della cavità (*early enhancement* o *enhancement* precoce). Tale fenomeno è già stato descritto in letteratura e rappresenta una caratteristica esclusiva nella patologia amiloidotica, agevolando in tal modo la diagnosi in casi di amiloidosi iniziali o nei casi senza la presenza di LGE.

Le immagini di LGE analizzate sono state suddivise in LGE diffuso o localizzato in base all'estensione. Più di tre segmenti consecutivi e più di otto segmenti in totale definivano un coinvolgimento diffuso. Quando questi criteri prestabiliti non venivano rispettati, l'estensione di LGE veniva giudicata come localizzata. Oltre all'estensione

valutata in maniera qualitativa, è stato valutato anche il pattern di distribuzione suddiviso in cinque classi: transmurale, subendocardico, subepicardico, *patchy* e intramurale. Inoltre è stata valutata la presenza di un pattern caratteristico di distribuzione del LGE in alcune forme di amiloidosi noto come “*apical sparing*” o gradiente apice-base⁷⁰. In pratica, è stata valutata la presenza di LGE localizzato esclusivamente a livello dei segmenti basali e medi senza interessamento dei segmenti apicali. In questo caso la distribuzione veniva considerata come positiva per gradiente apice-base. La valutazione della presenza di LGE è stata fatta considerando esclusivamente la presenza o l'assenza di LGE, senza eseguire una segmentazione ventricolare destra o valutare *pattern* di distribuzione diversi. Questa decisione è stata legata allo spessore limitato del ventricolo destro, in condizioni normali, che rende la valutazione della presenza di LGE coi criteri utilizzati per il ventricolo sinistro proibitivi perché poco attendibili e poco riproducibili.

Valutazione semiquantitativa estensione LGE

Oltre ad un'analisi qualitativa della presenza ed estensione di LGE, valutazione peraltro condizionata da una variabilità intra ed inter-osservatore inversamente proporzionale all'esperienza degli operatori, è stata eseguita anche una valutazione quantitativa dell'estensione di LGE. Partendo dalle immagini di LGE in asse corto sono state selezionate tre fette di miocardio. Una per il segmento basale, una per il segmento medio ed una per il segmento distale. In seguito è stata tracciata una regione di interesse (*region of interest*, ROI) a livello del muscolo pettorale e quantificata l'intensità di segnale. Lo stesso è stato fatto per i 6 segmenti di ogni fetta basale e media, i quattro segmenti apicali e l'apice cardiaco ottenendo in questo modo 17 ROI di intensità di segnale una per ogni segmento di miocardio in accordo con la segmentazione del cuore di 17 segmenti come proposta di *American Heart Association*⁷¹. Dopo, facendo il rapporto tra ogni ROI del miocardio e la ROI del muscolo pettorale si è ottenuto un

indice di intensità di segnale per ogni segmento che abbiamo chiamato indice miocardio-muscolo (*myomuscle index*, mmi). Tale indice rappresenta un surrogato dell'estensione e quantità di amiloide in ogni segmento ed un modo semplice e veloce per quantificare tale dato.

Oltre alla valutazione del mmi, in una sottopopolazione di 10 pazienti sottoposti anche a T1 *mapping* abbiamo calcolato il T1 di ogni singolo segmento prima della somministrazione del mezzo di contrasto ottenendo così una mappa con i tempi T1 a 17 segmenti in accordo con la segmentazione proposta dall'*American Heart Association* (Cerqueira et al, 2002).

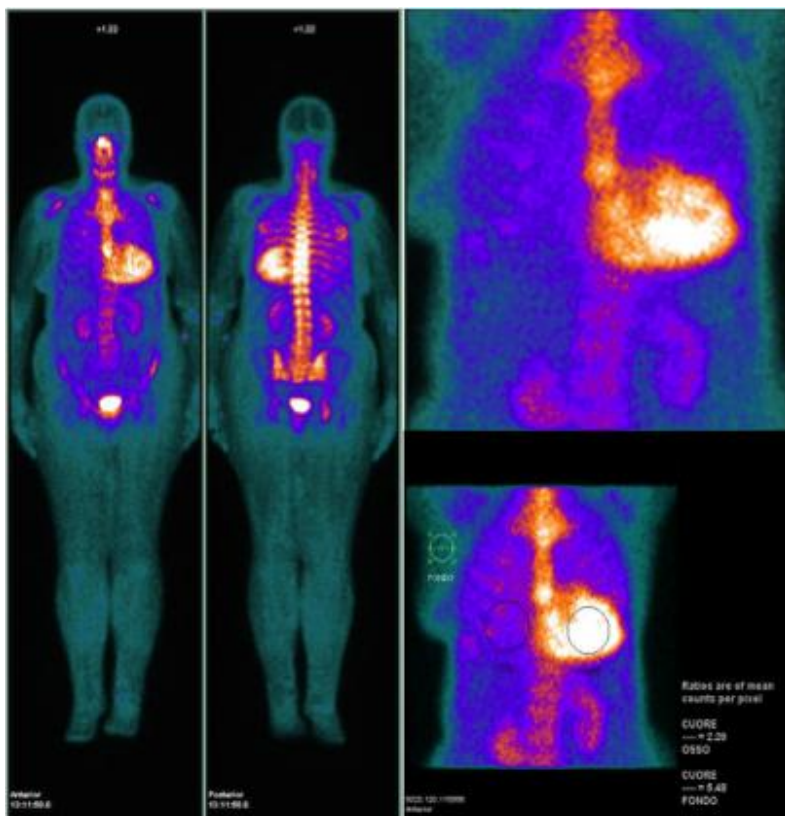
Protocollo di acquisizione di scintigrafia ossea con difosfonati

Immagini planari *whole body* (durata di acquisizione di 10 cm/min) ed immagini toraciche statiche della durata totale di 5 minuti sono state acquisite tre ore dopo l'iniezione del tracciante radioattivo (740 MBq i.v.) usando una gamma camera dedicata, dotata di collimatori a bassa energia ed alta risoluzione (*Low energy high resolution*, LEHR) (Millennium MG – GE, Haifa, Israel).

Un operatore esperto, specialista in Medicina Nucleare, ha valutato le immagini e determinato la presenza e grado di captazione del radiofarmaco. Una ROI a livello cardiaco permetteva di quantificare il numero totale di conti cardiaci espressi come conti di radioattività emessa dal radiofarmaco iniettato per pixel per secondo [cps]. Inoltre, per correggere per la presenza di artefatti e il diverso grado di attenuazione tra i vari esami il rapporto cuore/osso e cuore/fondo sono stati calcolati (**Figura 16**). Ciò veniva fatto tracciando una ROI in corrispondenza del costato controlaterale per la quantificazione dei conti a livello osseo ed un'altra ROI a livello dei tessuti molli in corrispondenza della regione ascellare. In questo modo suddividendo i cps cardiaci per i cps ossei o del fondo si otteneva il rapporto cuore/osso e cuore/fondo. Tale parametro

permetteva di ottenere un valore sul grado di captazione globale del radiofarmaco senza tuttavia poter esprimersi sulla localizzazione segmentaria della sostanza amiloide.

Figura 16. Immagini planari *total body* anteriore e posteriore di un paziente affetto da TTR-CA che presenta diffusa captazione del radiofarmaco. In basso a destra si possono osservare le ROI disegnate a livello cardiaco, osseo e a livello del fondo (vedi testo).



Successivamente, nei casi giudicati come positivi per captazione, in base al valore del rapporto cuore/osso e cuore/fondo, una acquisizione di molteplici proiezioni bidimensionali attraverso la tecnica di *imagingSPECT*, della durata di 10 minuti, è stata eseguita utilizzando una gamma camera cadmio zinco tellurio dedicata (Discovery NM 530c – GE, Haifa, Israel) dotata di un collimatore a fori paralleli multipli e 19 rivelatori stazionari cadmio-zinco-tellurio, capaci di acquisire contemporaneamente 19 immagini

cardiache in vari assi spaziali. Le immagini SPECT sono state successivamente ricostruite utilizzando la stessa postazione come per la acquisizione planare tradizionale (Xeleris II, GE Healthcare, Haifa, Israel) usando un programma di analisi delle immagini dedicato (*Myovation for Alcyon*, GE). Un filtro *Butterworth* dedicato per il post-processing è stato applicato alle fette ricostruite. Gli studi tomografici sono stati poi rielaborati in 60 proiezioni planari e le immagini ottenute sono state ricostruite senza correzione di attenuazione o *scatter*. Dopo la ricostruzione delle immagini è stata eseguita un'analisi qualitativa da parte di un operatore esperto il quale non era al corrente dei risultati della CMR. L'operatore, giudicando il grado di captazione di ogni singolo segmento, attribuiva un punteggio da 0 a 3 in base al grado di captazione del radiofarmaco a livello miocardico come in accordo con precedenti lavori in letteratura^{7,60}. Zero per nessuna captazione visibile a livello miocardico, 1 per lieve captazione meno intensa rispetto alla captazione presente a livello osseo, 2 per moderata captazione con captazione più bassa a livello osseo e 3 per severa captazione con assente o minima captazione a livello osseo.

Per rendere più facile il confronto con lo score qualitativo utilizzato in CMR, lo score scintigrafico sopra definito è stato modificato attribuendo il punteggio 0 nei casi di nessuna o poca captazione e 1 nei casi di moderata o severa captazione. Oltre all'analisi segmentaria qualitativa abbiamo eseguito anche l'analisi segmentaria quantitativa. La distribuzione miocardica regionale del tracciante, espressa come conti medi per voxel per minuto è stata ottenuta attraverso l'utilizzo di un programma di elaborazione dell'immagine dedicato (*Corridor 4DM-SPECT*). Sia l'analisi qualitativa che l'analisi quantitativa è stata eseguita utilizzando la mappa polare di 17 segmenti in accordo con la segmentazione miocardica dell'*American Heart Association*⁷¹.

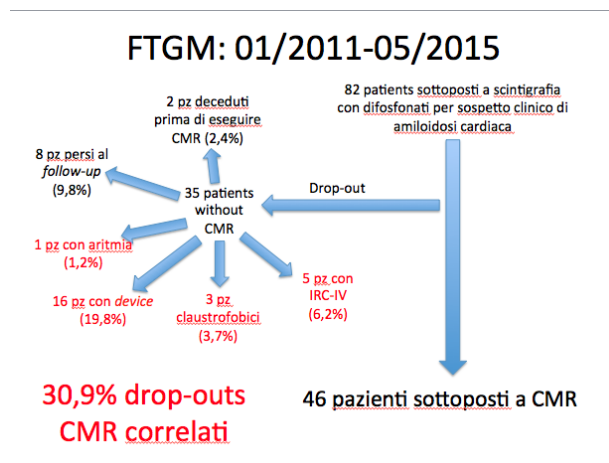
Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata attraverso il software MedCalc (versione 12.2.1 - MedCalc® Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium). Le variabili categoriche (nominali e ordinali) sono state analizzate utilizzando il test Chi-quadro o il test di Fisher quando appropriato. Il test di Kurtosis e il coefficiente di correlazione di D'Agostino-Pearson sono stati utilizzati per valutare se la distribuzione delle singoli variabili seguiva una distribuzione gaussiana. Le variabili continue sono state espresse come media e deviazioni standard per le variabili con distribuzione normale e come mediana e 25°-75° percentile nei casi di distribuzione significativamente diversa dalla distribuzione normale. I test statistici utilizzati per comparare variabili continue sono stati il t-test di Student per le variabili a distribuzione normale e il *Wilcoxon rank-sum test* in caso di variabili a distribuzioni non normali. Per la valutazione dell'efficacia diagnostica delle variabili ricavate dall'analisi dei dati di risonanza magnetica cardiaca e dei dati scintigrafici sono state utilizzate delle curve *Receiver Operating Characteristic* (ROC).

Risultati

Ottantadue pazienti sono stati sottoposti a scintigrafia *total body* con difosfonati per il sospetto clinico di CA nel periodo di arruolamento del nostro studio. Di questi 82 pazienti, 2 (2%) pazienti sono deceduti prima di eseguire la CMR, 8 pazienti (10%) sono stati persi al *follow-up* e non hanno eseguito una CMR, 1 paziente (1%) è stato ritenuto non idoneo per la CMR a causa di frequente extrasistolia, 16 pazienti (20%) erano portatori di dispositivi impiantabili non magneto-compatibili, 3 pazienti (4%) hanno interrotto l'esecuzione della CMR precocemente perché claustrofobici e 5 pazienti (6%) non hanno eseguito l'esame perché affetti da insufficienza renale cronica di grado avanzato. In totale 44% dei pazienti non ha eseguito una CMR ed il 30% non ha eseguito l'esame per controindicazioni assolute o relative all'esecuzione dell'esame di CMR(Figura 17).

Figura 17. Flowchart arruolamento e drop-outs.



L'analisi dei dati in maniera retrospettiva ha permesso pertanto di individuare 47 pazienti che al momento dello studio avevano eseguito, per il sospetto clinico di amiloidosi cardiaca, una CMR ed una scintigrafia con difosfonati con una distanza

temporale tra i due esami inferiore ai tre mesi. I rimanenti criteri di inclusione ed esclusione dallo studio, sono stati descritti in maniera dettagliata precedentemente (vedi Materiali e metodi).

Di questi 47 pazienti, un paziente con diagnosi di amiloidosi TTR *wild type* è stato escluso dallo studio per qualità delle immagini scintigrafiche non diagnostica. I dati dei restanti 46 pazienti sono stati raccolti ed analizzati come sotto riportati.

I 46 pazienti inclusi nel nostro studio sono tutti giunti ad una diagnosi di conferma o di esclusione di CA mediante l'esecuzione di un esame biptico positivo come studio conclusivo del loro iter diagnostico. Tra i pazienti con biopsia positiva 9 erano AL-CA e 19 TTR-CA. I 18 pazienti senza una diagnosi di CA era composto da un gruppo eterogeneo di pazienti formato da 6 che presentavano ipertrofia miocardica riferibile ad ipertensione arteriosa sistemica mal controllata, 3 con ipertrofia miocardica lieve sopravvalutata all'ecocardiogramma, 3 che mostravano lieve ipertrofia miocardica e bassi voltaggi all'elettrocardiogramma ed infine 4 pazienti con ipertrofia secondaria alla presenza di valvulopatia aortica. Interessante è stato notare come 2 pazienti sottoposti a scintigrafia con difosfonati sempre col sospetto di CA, alla CMR eseguita successivamente è stata posta diagnosi di cardiomiopatia ipertrofica.

La popolazione analizzata includeva 19 pazienti con diagnosi di TTR-CA (13 maschi, età media 78 ± 9 anni), 9 con diagnosi di AL-CA (4 maschi, età media 71 ± 12 anni) e 18 pazienti dove il sospetto clinico di amiloidosi cardiaca non è stato confermato (non-CA) dagli esami diagnostici eseguiti successivamente (12 maschi, età media $76 \pm$ anni).

Il confronto tra la somma dei pazienti affetti da amiloidosi (sia AL che TTR) e i non-CA ha permesso di osservare come le uniche differenze statisticamente significative tra i due gruppi riguardavano la massa ventricolare sinistra indicizzata, gli spessori parietali del setto interventricolare e della parete infero-laterale ed anche la dimensione

indicizzata dell'atrio destro. Non si sono osservate differenze significative per quanto riguarda il volume telesistolico e telediastolico sinistro e destro, la funzione globale e regionale sinistra, le dimensioni dell'atrio di sinistra o la funzione ventricolare destra (**Tabella 4**).

Tabella 4. Confronto tra pazienti con e senza amiloidosi cardiaca.

| | CA | non-AC | p |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|
| Setto Interventricolare \pm DS (mm) | 19.3 \pm 4.2 | 15,7 \pm 2.6 | < 0.001 |
| Parete Posteriore \pm DS (mm) | 14.7 \pm 3.4 | 10.6 \pm 2.4 | < 0.001 |
| WMSI \pm DS | 1.25 \pm 0.4 | 1.34 \pm 0.4 | 0.49 |
| Ai Sinistro \pm DS (cmq/mq) | 17.8 \pm 5.6 | 17.1 \pm 5 | 0.63 |
| Ai Destro \pm DS (cmq/mq) | 14.7 \pm 3.6 | 22.6 \pm 6.8 | < 0.05 |
| VTDi sinistro \pm DS (ml/mq) | 73.4 \pm 20.2 | 80.1 \pm 23.7 | 0.31 |
| VTSi sinistro \pm DS (ml/mq) | 34.2 \pm 18.3 | 39.4 \pm 20.5 | 0.37 |
| FE Sinistra \pm DS (%) | 54 \pm 13.4 | 53.2 \pm 14.5 | 0.83 |
| MVi Sinistra \pm DS (gr/mq) | 122.1 \pm 36.8 | 98.7 \pm 26.3 | < 0.05 |
| VTDi destro \pm DS (ml/mq) | 71.2 \pm 17.4 | 71.9 \pm 27.8 | 0.92 |
| VTSi destro \pm DS (ml/mq) | 35.5 \pm 18.5 | 33 \pm 20.9 | 0.67 |
| FE Destra \pm DS (%) | 51.5 \pm 15.4 | 56.8 \pm 13 | 0.22 |

CA: amiloidosi cardiaca, DS: deviazione standard, mm: millimetri; mq: metri quadri; cmq: centimetri quadri; gr: grammi; WMSI: *Wall Motion Score Index*, Ai: atrio indicizzato, VTDi: volume telediastolico ventricolare indicizzato, ESVi: volume telesistolico ventricolare indicizzato, FE: frazione di eiezione ventricolare, MVi: massa ventricolare indicizzata

L'analisi statistica tra i TTR-CA e gli AL-CA non ha evidenziato differenze statisticamente significative in termini di età, sesso, indice di massa corporea, funzione renale, capacità funzionale o valore del peptide natriuretico NT-proBNP tra il gruppo di pazienti con amiloidosi TTR e i pazienti con amiloidosi AL (**Tabella 5**).

Tabella 5. Confronto tra pazienti con amiloidosi cardiaca TTR ed AL.

| | TTR-CA | AL-CA | p |
|--|------------------|-------------------|------|
| Sesso Maschile | 12 (63%) | 4 (44%) | 0.87 |
| Età (anni) \pm DS | 78 \pm 9 | 71 \pm 12 | 0.11 |
| BMI \pm DS (kg/m ²) | 26.9 \pm 3.8 | 26.2 \pm 4.8 | 0.67 |
| Stima Filtrato glomerulare (Cockcroft-Gault) \pm DS (ml/min) | 60 \pm 23 | 50 \pm 21 | 0.32 |
| IRC (stadio IV-V) | 2 (10%) | 1 (11%) | 0.85 |
| NT-proBNP \pm DS (ng/L) (mediana con <i>range</i> interquartile) | 4844 (1288-9597) | 5087 (2483-16688) | 0.42 |
| Troponina cardiaca T ad alta sensibilità \pm DS (ng/L) | 70.3 \pm 41.6 | 63.5 \pm 29.8 | 0.32 |
| Classe funzionale | | | 0.75 |
| NYHA I-II (%) | 38.5 | 33 | |
| NYHA III-IV (%) | 61.5 | 67 | |

TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL; DS: deviazione standard; BMI: indice di massa corporea; ml: millilitri; min: minuti; IRC: insufficienza renale cronica; NT-proBNP: frammento N-terminale del pro-peptide natriuretico cerebrale; pg: picogrammi; ng: nanogrammi; L: litri; NYHA: *New York Heart Association*

Confrontando le due popolazioni per i classici fattori di rischio cardiovascolare non si sono osservate differenze statisticamente significative per quanto riguarda diabete mellito, ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa e fumo. Inoltre, il numero di pazienti affetti da fibrillazione atriale permanente o broncopneumopatia cronico ostruttiva era paragonabile nei due gruppi senza differenze statisticamente significative (**Tabella 6**).

Tabella 6. Confronto tra pazienti con amiloidosi cardiaca TTR ed AL.

| | TTR-CA | AL-CA | p |
|--------------------------------------|----------|---------|------|
| Fibrillazione atriale | 10 (53%) | 3 (33%) | 0.27 |
| Diabete mellito | 4 (21%) | 1 (14%) | 0.7 |
| Iperensione arteriosa | 12 (63%) | 7 (77%) | 0.55 |
| Ipercolesterolemia | 5 (26%) | 2 (22%) | 0.94 |
| Abitudine tabagica in atto | 1 (5%) | 1 (14%) | 0.44 |
| Broncopneumopatia cronico ostruttiva | 3 (16%) | 1 (14%) | 0.93 |

TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL

Per quanto riguarda la valutazione anatomica e funzionale nelle due sottopopolazioni, eseguita mediante CMR, non si sono osservate differenze statisticamente significative in termini di volumi, spessori, masse e funzione sistolica globale e regionale biventricolare nè tantomeno per quanto riguarda le dimensioni atriali (**Tabella 7**).

Tabella 7. Confronto tra pazienti con amiloidosi cardiaca TTR ed AL.

| | TTR-CA | AL-AC | p |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|------|
| Setto interventricolare \pm DS (mm) | 19.6 \pm 4.6 | 18.4 \pm 3.4 | 0.41 |
| Parete posteriore \pm DS (mm) | 15.3 \pm 3.8 | 13.4 \pm 2.1 | 0.19 |
| WMSI \pm DS | 1.26 \pm 0.5 | 1,22 \pm 0.4 | 0.81 |
| Ai sinistro \pm DS (cmq/mq) | 18.7 \pm 6.3 | 16 \pm 2.9 | 0.24 |
| Ai destro \pm DS (cmq/mq) | 15.4 \pm 3.1 | 13,4 \pm 4.3 | 0.16 |
| VTDi sinistro \pm DS (ml/mq) | 77.6 \pm 22.9 | 64,6 \pm 8 | 0.11 |
| VTSi sinistro \pm DS (ml/mq) | 37.8 \pm 20.8 | 26,8 \pm 8 | 0.14 |
| EF sinistra \pm DS (%) | 52.1 \pm 14.8 | 58,1 \pm 9.5 | 0.28 |
| MVi sinistra \pm DS (gr/mq) | 129.7 \pm 40.6 | 106 \pm 21.2 | 0.11 |
| VTDi destro \pm DS (ml/mq) | 75.6 \pm 17.5 | 62,1 \pm 14 | 0.54 |
| VTSi destro \pm DS (ml/mq) | 39.3 \pm 19.6 | 27,6 \pm 13.4 | 0.12 |
| EF destra \pm DS (%) | 49.2 \pm 16 | 56,2 \pm 13.7 | 0.27 |
| MVi destra \pm DS (gr/mq) | 29.7 \pm 12.2 | 25,4 \pm 8 | 0.34 |

TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL; DS: deviazione standard; mm: millimetri; mq: metri quadri; cmq: centimetri quadri; gr: grammi; WMSI: *Wall Motion Score Index*, Ai: atrio indicizzato, VTDi: volume telediastolico ventricolare indicizzato, ESVi: volume telesistolico ventricolare indicizzato, FE: frazione di eiezione ventricolare, MVi: massa ventricolare indicizzata

Quando abbiamo valutato le nostre due sottopopolazioni confrontando caratteristiche morfologiche che ci permettono di orientarci verso la diagnosi di CA come la presenza di setto interatriale, foglietti pericardici o lembi valvolari ispessiti non abbiamo osservato differenze tra i due gruppi. L'unico parametro che ha mostrato una differenza nei due gruppi è stato il versamento pericardico, più rappresentato in maniera statisticamente significativa nel gruppo dei pazienti con AL-AC (**Tabella 8**).

Tabella 8. Confronto tra pazienti con amiloidosi cardiaca TTR ed AL.

| | TTR-CA | AL-AC | p |
|--|----------|---------|-----------------|
| Ispessimento del Setto Interventricolare | 12 (63%) | 4 (44%) | 0.49 |
| Ispessimento lembi valvolari | 2 (11%) | 2 (22%) | 0.41 |
| Ispessimento foglietti pericardici | 1 (5%) | 0 (0%) | 0.48 |
| Versamento pericardico | 5 (26%) | 6 (66%) | <0.05 |
| Versamento pleurico | 11 (58%) | 6 (66%) | 0.66 |

TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL

Interessante è stato inoltre notare come anche la presenza di LGE nell'atrio di sinistra e destra e ventricolo destro è stata osservata in diversi pazienti dei due gruppi, ma senza differenze significative tra TTR-CA ed AL-CA. L'unica differenza statisticamente significativa si è osservata per la presenza di gradiente LGE base-apice, caratteristica di distribuzione di LGE presente solo nel gruppo dei pazienti con TTR-CA (**Tabella 9**).

Tabella 9: Confronto tra pazienti con amiloidosi cardiaca TTR ed AL.

| | TTR-CA | AL-CA | p |
|------------------------------|----------|---------|-----------------|
| LGE Ventricolo destro | 13 (68%) | 5 (56%) | 0.68 |
| LGE Atrio destro | 13 (68%) | 5 (56%) | 0.68 |
| LGE Atrio Sinistro | 14 (74%) | 5 (56%) | 0.41 |
| Gradiente LGE base-apice (%) | 5 (26%) | 0 (0%) | <0.05 |

TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL; LGE: late gadolinium enhancement.

Risultati dati scintigrafici

Attraverso il conteggio dei cps a livello della ROI cardiaca e della ROI a livello dell'osso e del fondo abbiamo calcolato i rapporti cuore/fondo e cuore/osso. Eseguendo un'analisi statistica abbiamo osservato che il gruppo dei pazienti con TTR-CA presentavano valori significativamente più elevati rispetto agli AL-CA ed anche rispetto

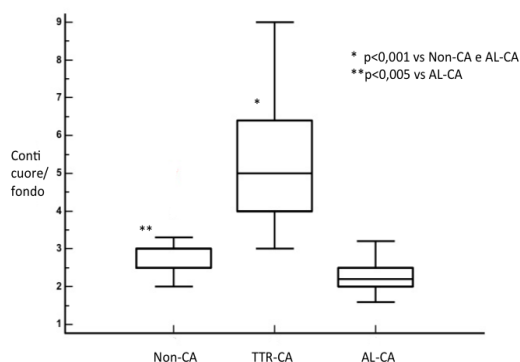
ai non-CA sia per il rapporto cuore/fondo che per il rapporto cuore/osso (entrambi $p < 0.001$). Inoltre il gruppo non-CA presentava valori significativamente più elevati rispetto agli AL-CA per quanto riguarda il rapporto cuore/fondo ($p < 0.005$) come si può anche osservare nella **tabella 10** e nella **figura 18** che rappresenta i *box-plot* cuore/fondo nei tre sottogruppi.

Tabella 10. Confronto dati scintigrafici planari tra pazienti con TTR-CA, AL-CA e non-CA.

| | TTR-CA | AL-CA | non-CA | p (TTR-CA vs AL-CA e TTR-CA vs non-CA) |
|---|---------------|---------------|---------------|--|
| Cuore/fondo \pm DS (conti per pixel per secondo) | 5.2 ± 1.7 | 2.2 ± 0.4 | 2.9 ± 0.7 | <0.001 |
| Cuore/osso \pm DS (conti per pixel per secondo) | 2.2 ± 0.9 | 1.1 ± 0.2 | 1.1 ± 0.2 | <0.001 |

TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL; non-CA: non amiloidosi cardiaca; DS: deviazione standard.

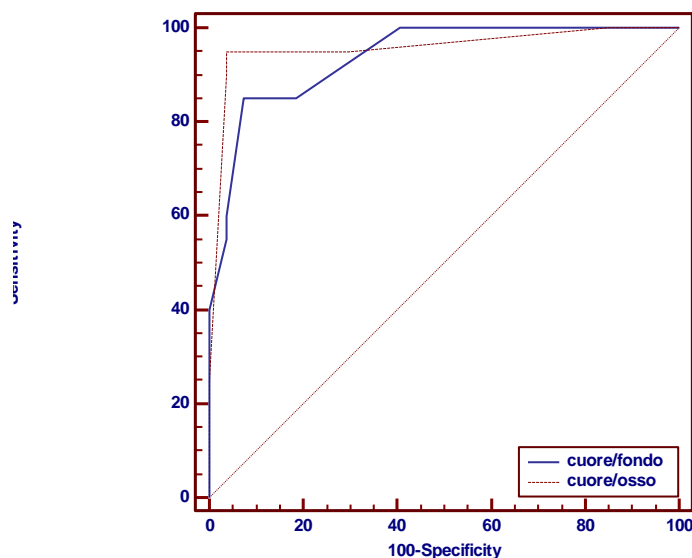
Figura 18.Box-plot conti cuore/fondo tra i tre sottogruppi in studio (vedi testo)



non-CA: non amiloidosi cardiaca; TTR-CA: amiloidosi cardiaca TTR; AL-CA: amiloidosi cardiaca AL.

Sulla base dei valori appena descritti abbiamo costruite delle curve ROC per valutare il potere diagnostico dei due parametri (cuore/fondo e cuore/osso) cercando di determinare quale dei due oppure entrambi messi insieme e con quale valore di *cut-off* potrebbero diagnosticare con la più elevata sensibilità e specificità la presenza di TTR-AL (**Figura 19**). Questa analisi statistica ci ha permesso di osservare come entrambi i parametri hanno mostrato un eccellente potere diagnostico verso una corretta diagnosi di TTR-AC. Per quanto riguarda il parametro cuore/fondo e considerando un valore di *cut-off* di 3,3 abbiamo osservato una sensibilità del 85% con una specificità del 92,6% con una AUC di 0,94. Dall'altra parte il parametro cuore/osso ha mostrato dei risultati ancora migliori. Un valore di *cut-off* di 1,6 ha mostrato una sensibilità del 95% con specificità del 96,3% ed una AUC di 0,96. Facendo la differenza tra le due curve ROC il parametro cuore/osso si è dimostrato più forte nel diagnosticare correttamente i pazienti con TTR-AC ($p < 0.0001$).

Figura 19. Curve ROC del rapporto cuore/fondo e cuore/osso nella diagnosi di TTR-CA.



Considerando entrambi i parametri insieme nella stessa popolazione un valore di cuore/fondo >3.3 con un valore cuore/osso >1.6 ha permesso di diagnosticare correttamente 16 dei 19 pazienti con TTR-CA, ossia l'85% dei casi, due pazienti presentavano solo valori elevati cuore/osso ed un paziente presentava elevati valori di cuore/osso e cuore/fondo ma sotto i *cut-off* stabiliti dalle curve ROC, rappresentando pertanto un caso di falso negativo.

Interessante notare come tutti e nove i pazienti con AL-CA avevano entrambi i valori di cuore/osso e cuore/fondo sotto i *cut-off* diagnostici e solo 3 dei 18 pazienti (17%) appartenenti al gruppo non-CA presentava 1 dei due rapporti aumentati.

Basandoci sui dati appena descritti abbiamo calcolato l'accuratezza della scintigrafia con difosfonati. Per quanto riguarda la diagnosi di CA in generale, la scintigrafia ha mostrato una specificità del 100% con una sensibilità del 65% (valore positivo predittivo 100 con valore predittivo negativo 64). Quando invece la scintigrafia è stata utilizzata per la diagnosi specifica di TTR-CA, abbiamo osservato una accuratezza diagnostica altissima con specificità del 100% e sensibilità del 95% (valore positivo predittivo 100 e valore predittivo negativo 96). Dall'altro lato la CMR ha mostrato un'accuratezza diagnostica eccellente nella diagnosi di CA con sensibilità e specificità del 100% (valore predittivo positivo e negativo del 100%) con risultati meno brillanti nella diagnosi specifica di TTR-CA con sensibilità del 100% ma specificità del 67% (valore predittivo positivo e negativo del 32% e 100% rispettivamente).

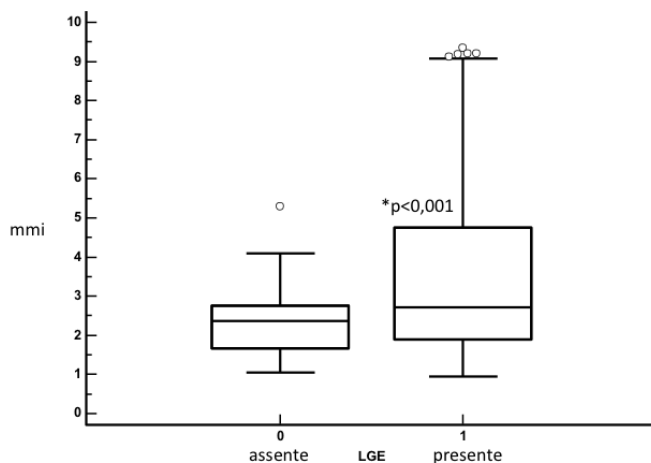
Confronto tra CMR e scintigrafia nella valutazione della distribuzione ed estensione dei depositi di amiloide

Confronto parametri qualitativi e semi quantitativi intra-metodica

CMR

L'analisi qualitativa è stata fatta mediante la valutazione della presenza di LGE in ognuno dei 17 segmenti. I risultati ottenuti sono stati confrontati con i dati semi quantitativi ottenuti attraverso il mmi. L'analisi statistica ha permesso di osservare come i segmenti LGE positivi presentavano un valore mmi medio di 2.99, mentre i segmenti negativi di LGE un valore mmi medio di 2.26. Con una p statisticamente significativa ($p < 0.001$) nel confronto tra i due gruppi (**Figura 20**).

Figura 20. Box-plot di confronto tra *myomuscle index* e presenza di LGE valutata in maniera qualitativa.

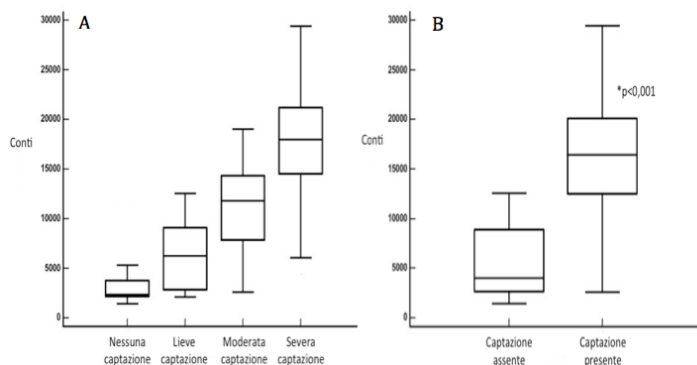


mmi: *myomuscle index*; LGE: *late gadolinium enhancement*.

Scintigrafia ossea con HMDP

I pazienti che presentavano una captazione del radiofarmaco alle immagini planari con un aumentato rapporto cuore/osso e cuore/fondo, sono stati sottoposti durante la stessa seduta scintigrafica a SPECT ottenendo delle immagini multiplanari e la ricostruzione tridimensionale del cuore, permettendo in tal modo di creare delle mappe polari di captazione del radiofarmaco a 17 segmenti. L'analisi statistica ha mostrato come i pazienti con uno score di captazione 0 (nessuna captazione) presentavano valori medi di conti per voxel per minuto (cvm) di 3567 con una deviazione standard di 2908. I pazienti con score 1 (lieve captazione) valori medi di cvm di 6312 con una deviazione standard di 3272, mentre i pazienti con uno score di 2 e 3, valori medi di 11258 e 17702 con una deviazione standard di 3942 e 4918 rispettivamente, mostrando all'analisi statistica una associazione tra il parametro qualitativo e semi quantitativo statisticamente significativo ($p < 0.001$) (**Figura 21A**). Per semplificare l'analisi successiva abbiamo unito i gruppi di nessuna e lieve captazione, definendoli come captazione assente ed i gruppi di moderata e severa captazione definendoli come captazione presente. Il confronto tra cvm e presenza o assenza di captazione, statisticamente significativo viene raffigurato nella **Figura 21B**.

Figura 21. (A) numero di conti per voxel per minuto (valutazione semiquantitativa) rapportato al grado di captazione assente, lieve, moderata o severa (valutazione qualitativa); (B) numero di conti per voxel per minuto (valutazione semiquantitativa) rapportato al grado di captazione assente o presente (valutazione qualitativa).



Dai dati di questi due nuovi gruppi abbiamo inoltre ottenuto delle curve ROC che hanno evidenziato come un valore di $cvm > 9851$ permette di individuare i segmenti con amiloide con una specificità e sensibilità del 87% e con una AUC di 0.95.

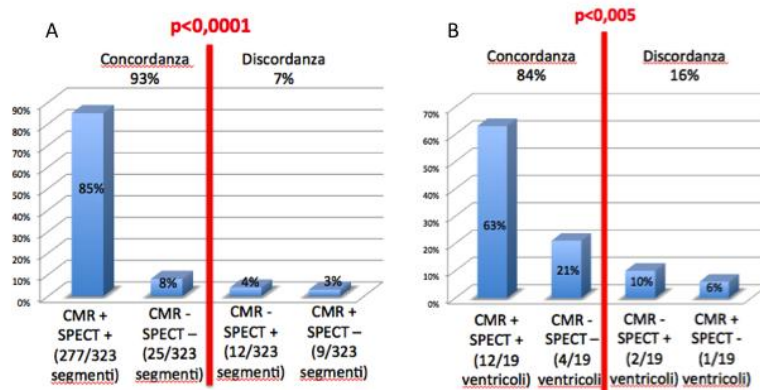
Confronto parametri qualitativi e semi quantitativi CMR verso scintigrafia con difosfonati.

Successivamente e dopo aver dimostrato una concordanza tra i dati qualitativi e semi quantitativi sia per CMR che per scintigrafia con difosfonati, abbiamo confrontato il grado di captazione del radiofarmaco per tutti i segmenti del ventricolo sinistro contro l'attuale *gold standard* per la valutazione della presenza ed estensione di amiloide, rappresentato dalla CMR. Il confronto dei dati qualitativi per segmento ha evidenziato una concordanza tra scintigrafia e risonanza magnetica cardiaca del 93% con un chi quadro altamente significativo ($p < 0.0001$). In particolare 276 su 323 segmenti analizzati (85%) venivano considerati positivi per amiloide sia in risonanza magnetica cardiaca che in scintigrafia con difosfonati e 25 su 323 segmenti (8%) venivano considerati negativi con entrambe le metodiche. Ventidue su 323 segmenti (7%) mostravano una discordanza tra risonanza magnetica cardiaca e scintigrafia miocardica (**Figura 22A**). Interessante notare come dei 22 segmenti discordanti 12 interessavano segmenti distali, 7 segmenti medi e solo 3 segmenti basali con una differenza statisticamente significativa tra i segmenti distali e basali ($p < 0.005$) ma no tra i segmenti distali e medi ($p = 0.12$) o medi e basali ($p = 0.35$).

Risultato analogo è stato osservato anche quando la stessa analisi è stata eseguita per il ventricolo destro. La presenza o assenza di LGE un corrispondenza del ventricolo destro è stata messa a confronto con la presenza o assenza di captazione del radiofarmaco in scintigrafia osservando un grado di concordanza del 84% con una

differenza statisticamente significativa ($p < 0.005$) tra i segmenti concordanti e i segmenti discordanti (**Figura 22B**).

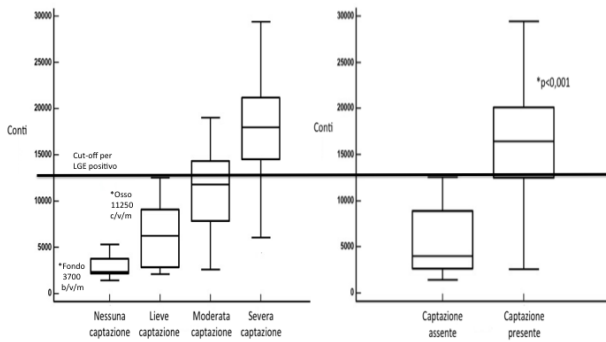
Figura 22.(A) Confronto valutazione qualitativa segmentaria tra CMR e SPECT del ventricolo sinistro e (B) del ventricolo destro.



CMR: risonanza magnetica cardiaca; SPECT: tomografia ad emissione di fotone singolo.

Successivamente abbiamo confrontato i dati semi quantitativi scintigrafici di cvm considerando la presenza o assenza di LGE per segmento osservando come la presenza di LGE era associata ad un numero significativamente maggiore di cvm ($p < 0.001$) come illustrato alla **Figura 23**.

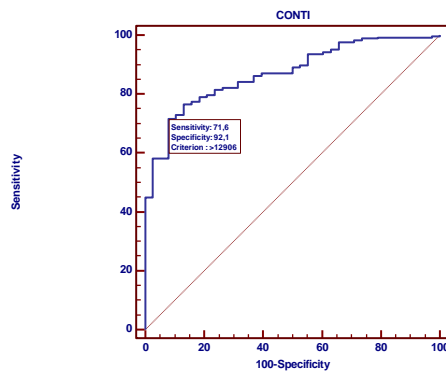
Figura 23. Confronto per segmenti tra colpi per voxel per secondo e presenza di LGE.



LGE: *late gadolinium enhancement*.

L'analisi con le curve ROC ha dimostrato come un valore di *cvm* superiore a 12906 individua i segmenti descritti come LGE positivi con una specificità del 92.1% ed una sensibilità del 71.6% con una AUC di 0.87 (**Figura 24**).

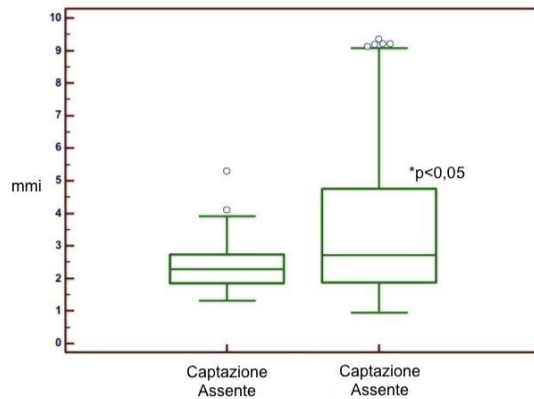
Figura 24. Curva ROC di valore colpi per voxel per minuto e presenza di LGE.



Infine il confronto tra parametri di valutazione qualitativa scintigrafica e parametri semi quantitativi di CMR ci ha permesso di osservare come utilizzando la *cut-off* di 2.99, ricavato dalle curve ROC tra mmi e LGE abbiamo osservato una differenza

statisticamente significativa tra i valori di mmi e la presenza di captazione scintigrafica valutata in maniera qualitativa ($p < 0.05$) come illustrato ai *box-plot* della **Figura 25**.

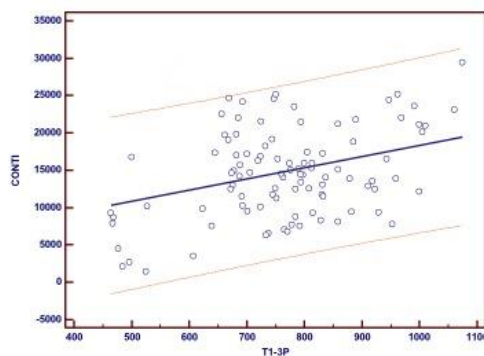
Figura 25. *Box-plot* tra mmi e presenza di captazione scintigrafica valutata qualitativamente (vedi testo).



mmi: myomuscle index

L'ultimo confronto tra CMR semiquantitativa e captazione alla scintigrafia con difosfonati valutata qualitativamente per ogni singolo segmento è stata effettuata utilizzando la tecnica di T1 *mapping* precontrasto. Tale confronto ci ha permesso di osservare una correlazione lieve-moderata tra le due tecniche utilizzate ($p < 0.0001$, $r = 0.32$) come rappresentato graficamente alla **Figura 26**.

Figura 26. Regressione lineare tra numero di conti per voxel per minuto per segmento e T1 *mapping* pre-contrasto per segmento.



Discussione:

L'analisi di questo studio retrospettivo sottolinea l'importanza dell'*imaging* multimodale nella diagnosi di CA. I risultati principali dello studio possono essere così sintetizzati:

- un elevato numero di pazienti nel nostro studio (31%) che avrebbe beneficiato da una CMR, non ha potuto sostenere l'esame per controindicazioni legate alla metodica.
- l'accuratezza diagnostica della CMR è stata eccezionale con 100% di sensibilità e specificità nella diagnosi di CA mentre la scintigrafia con HMDP ha mostrato risultati altrettanto positivi nella diagnosi specifica di TTR-CA con specificità del 100% e sensibilità del 95%.
- non abbiamo osservato differenze significative in termini di volumi e funzione globale e regionale biventricolare (tra i pazienti con TTR-CA ed AL-CA) e nemmeno in termini di presenza, estensione e localizzazione di LGE.
- la concordanza tra le zone di captazione del radiofarmaco alle immagini multiplanari della SPECT e la valutazione LGE in CMR attraverso una analisi qualitativa è stata del 93%. I segmenti distali sono stati quelli meno concordanti verosimilmente a causa della presenza di artefatti da captazione ossea del costato in prossimità della punta cardiaca.
- la valutazione qualitativa e semiquantitativa intra ed intermetodica hanno mostrato un elevato grado di concordanza nei pazienti affetti da TTR-CA.

Il primo dato interessante del nostro studio ed in accordo con altri studi in letteratura⁷², è stato quello del numero elevato di pazienti che seppur con indicazione chiara, non hanno potuto eseguire una CMR per la presenza di controindicazioni assolute o relative. Circa un terzo dei pazienti non ha eseguito una CMR per la presenza

di controindicazioni; le due principali cause sono state la presenza di *device* non magneto-compatibili e l'insufficienza renale cronica di grado avanzato. Considerando che sia l'utilizzo di *device* che la presenza di nefropatia avanzata sono particolarmente frequenti nei pazienti con CA è facile capire quanto sia importante avere a disposizione un'ulteriore tecnica di *imaging* avanzato alternativa alla CMR.

Un altro dato importante riguarda il fatto che oltre alla diagnosi di CA, la CMR ha permesso di formulare diagnosi eziologiche alternative come la diagnosi di cardiomiopatia ipertrofica in due pazienti. Questa osservazione sottolinea il ruolo importante della CMR non solo nella diagnosi di CA ma anche nella sua capacità di garantire una diagnosi differenziale. Tale prerogativa della metodologia è già stata sottolineata nel registro europeo di CMR, nel quale sono stati analizzati i dati di oltre 27000 pazienti arruolati in maniera consecutiva in 57 centri CMR europei. Tale studio ha evidenziato come il risultato della CMR ha permesso di formulare una diagnosi diversa da quella sospettata nel 9% dei casi⁷³. In questo modo la CMR, in una percentuale di pazienti, attraverso la formulazione di una diagnosi inattesa permette di modificare non solo il successivo iter diagnostico terapeutico, ma come nel caso dei nostri due pazienti affetti da una patologia geneticamente trasmessa, anche dei loro familiari.

La natura retrospettiva di questo lavoro attraverso la possibilità di ottenere una diagnosi di certezza in tutti i pazienti arruolati ci ha permesso di valutare l'accuratezza diagnostica ed il potere predittivo positivo e negativo di CMR e scintigrafia con difosfonati nella diagnosi di CA. Più del 60% dei pazienti arruolati nel nostro studio col sospetto di CA, hanno avuto la conferma diagnostica, dato che sottolinea l'importanza di uno *screening* corretto prima della esecuzione di indagini di terzo livello e di eventuale biopsia miocardica. Numerosi studi in letteratura hanno descritto la capacità diagnostica dell'elettrocardiografia e dell'ecocardiografia¹⁷ che insieme ad una accurata anamnesi ed esame obiettivo permettono al clinico di selezionare nella maniera più accurata i

pazienti da sottoporre ad indagini costose e spesso con disponibilità limitata e lunghi tempi di attesa. Un altro dato interessante è stato quello relativo alla capacità della CMR di identificare correttamente il 100% dei pazienti affetti da CA (sensibilità e specificità, valore predittivo positivo e negativo = 100% nel nostro studio). Questo dato, seppure sorprendentemente positivo per la metodica, è in parziale disaccordo con i dati in letteratura⁴⁵ che riportano una accuratezza diagnostica lievemente inferiore, con una sensibilità del 88% specificità del 90% con valore predittivo positivo e negativo del 88 e 90% rispettivamente. Una possibile spiegazione per tale dato può essere la casistica limitata di numero che includeva prevalentemente pazienti con stadi avanzati della patologia amiloidotica.

Interessante è stato notare come la CMR non è stata in grado di riconoscere i casi di TTR-CA dai casi con AL-CA mostrando una eccellente sensibilità e valore predittivo negativo (entrambi del 100%) ma con specificità del 67% (valore predittivo positivo del 32%). Anche questo dato è in disaccordo con un lavoro pubblicato recentemente: Dungu ha descritto come una valutazione morfo-funzionale mediante CMR permetterebbe di eseguire una diagnosi differenziale tra TTR-CA e AL-CA⁷⁰. Anche se gli autori hanno descritto specificità e sensibilità elevate nella diagnosi specifica di TTR-CA (sensibilità del 87% e specificità del 96%), nella nostra popolazione non abbiamo osservato differenze statisticamente significative in termini di volume, masse e spessori parietali biventricolari tra i due gruppi di pazienti con CA. In particolare, seppure i pazienti con TTR-CA hanno mostrato una chiara tendenza verso spessori parietali maggiori, atri più dilatati, volumi e masse ventricolari destre e sinistre maggiori con funzione globale destra e sinistra maggiormente compromesse tali parametri non hanno raggiunto una significatività statistica che ci permettano di ipotizzare una capacità della metodica nella differenziazione tra TTR-CA ed AL-CA. Anche in termini di presenza ed estensione di LGE, nonostante abbiamo osservato una percentuale maggiore di pazienti con LGE transmurale ed un interessamento ventricolare destro più

frequente nel gruppo dei TTR-CA, tali dati non hanno raggiunto la significatività statistica.

L'unico dato significativo, in termini di LGE, riguardava la sua presenza localizzata ai segmenti basali e medi con segmenti apicali risparmiati (gradiente base-apice). Tale *pattern* di distribuzione particolare interessava il 26% di pazienti con TTR-CA contro nessun paziente con AL-CA ($p < 0.005$). Tale distribuzione è già stata descritta prevalentemente nel gruppo di pazienti con TTR-CA, ma al momento non esiste una spiegazione fisiopatologica per tale fenomeno⁷⁰.

Utilizzando la scintigrafia con difosfonati mediante l'uso delle immagini planari per la diagnosi di CA, abbiamo osservato una specificità del 100% ma con una sensibilità subottimale (66%) nella diagnosi di CA, con valore positivo predittivo e negativo di 100 e 64, rispettivamente. Quando invece la scintigrafia è stata utilizzata per la diagnosi differenziale tra TTR-CA ed AL-CA nella sottopopolazione di pazienti con CA, abbiamo ottenuto dei risultati estremamente positivi. Considerando come *cut-off* un valore cuore/fondo > 3.3 ed un valore cuore/osso > 1.6 abbiamo correttamente identificato 16 dei 19 pazienti con TTR-CA, ossia l'85% dei casi, mentre due pazienti presentavano solo valori elevati cuore/osso ed un paziente presentava elevati valori sia di cuore/osso che di cuore/fondo ma sotto i *cut-off* prestabiliti dalle curve ROC. In tale maniera l'accuratezza diagnostica nella diagnosi di TTR-CA e di conseguenza nella diagnosi differenziale tra TTR-CA ed AL-CA è stata altissima, con specificità del 100% e sensibilità del 95% (valore positivo predittivo 100 e valore predittivo negativo 96). Tali risultati ci permettono di osservare come la scintigrafia eseguita in maniera isolata seppur specifica non è abbastanza sensibile per la diagnosi di CA. Dall'altro lato la CMR permette con altissima accuratezza diagnostica di identificare i pazienti con CA ma senza poter distinguere tra le diverse forme. L'uso combinato di entrambe le metodiche, quando non limitato dalla presenza di controindicazioni permetterebbe di

sfruttare l'elevata capacità di CMR nella diagnosi di CA e successivamente l'altissima capacità della scintigrafia nell'identificare le forme TTR.

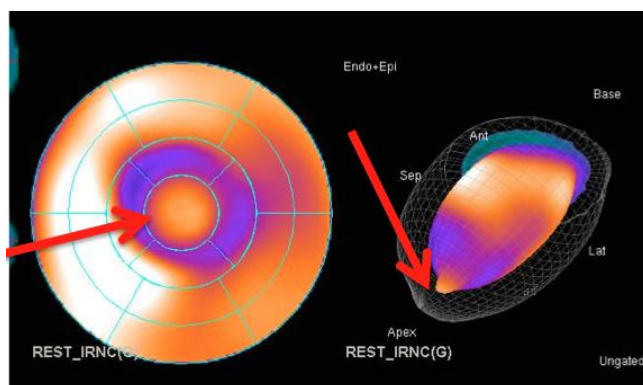
I nostri risultati confermano quelli di altri studi monocentrici ed aggiungono il rilievo di una elevata concordanza all'analisi segmentale dell'estensione e distribuzione di amiloide tramite SPECT e CMR. Il limite più grande nell'utilizzo delle immagini planari scintigrafiche, utilizzate in letteratura, riguarda il fatto che trattandosi di immagini bidimensionali permettono di eseguire una valutazione grossolana in termini di captazione; in tal modo l'informazione diagnostica è limitata e priva di informazioni relative al grado di estensione della patologia amiloidotica a livello cardiaco. Tale limite potrebbe non permettere di riconoscere casi iniziali di CA, né tantomeno di quantificare la progressione di malattia o l'efficacia di terapie farmacologiche. Utilizzando invece la SPECT si possono ottenere immagini multiplanari che permettono la costruzione di mappe polari di radiocaptazione ottenendo un grado di captazione (assente, lieve, moderato o severo) quando confrontato con il livello di captazione osseo. Questa valutazione qualitativa nel nostro studio, ha mostrato un'ottima correlazione con un parametro di valutazione quantitativa come il numero di conti di radioattività per voxel per minuto per segmento. Un valore di *cut-off* di 9500 cvm per segmento permettere di individuare in maniera oggettiva e riproducibile i segmenti positivi verosimilmente per presenza di amiloide. Lo stesso principio è stato applicato anche per gli esami di CMR dove i segmenti positivi per la presenza di LGE correlavano moderatamente con i valori segmentali di T1 *mapping* pre-contrasto.

Quando abbiamo confrontato i 17 segmenti del ventricolo sinistro, utilizzando la valutazione qualitativa delle due metodiche, il grado di concordanza tra CMR e SPECT è stato del 93%. Ventuno segmenti sono stati valutati in maniera differente tra CMR e scintigrafia e 12 di questi 21 riguardavano i segmenti apicali.

Nonostante l'ottima concordanza dimostrata tra le due metodiche, una possibile spiegazione per i segmenti discordanti apicali potrebbe essere legata alla presenza di

artefatti dovuti alla captazione del radiofarmaco a livello costale in corrispondenza dell'apice ventricolare sinistro come illustrato alla **Figura 27**. La captazione ossea a tale livello può creare delle difficoltà interpretative nell'analisi delle immagini se non si è al corrente della possibilità di tali artefatti.

Figura 27. Mappa polare costruita da immagini multi planari SPECT con evidenza di diffusa captazione a livello di tutti i segmenti basali e medi ed artefatto apicale da captazione a livello costale.



Oltre al confronto tra SPECT e CMR del ventricolo sinistro, un'analisi simile è stata eseguita anche per il ventricolo destro ottenendo dei risultati paragonabili, anche se in questo caso non è stata eseguita un'analisi segmentale bensì è stata valutata la presenza o meno di interessamento ventricolare destro con le due metodiche. La concordanza è stata anche in questo caso molto elevata (85%). I casi discordanti sono verosimilmente dovuti al fatto che le mappe polari ricavate dalle immagini SPECT sono al momento costruite per lo studio del ventricolo sinistro e non permettono una analisi ottimale nella totalità dei casi.

Dopo il confronto qualitativo tra le due metodiche, abbiamo eseguito anche un confronto tra le due metodiche utilizzando parametri semiquantitativi. L'impiego di parametri di misura semiquantitativi permette di eseguire una valutazione oggettiva e

riproducibile ottenendo una quantificazione regionale e globale, informazione utile per valutare oltre che l'estensione della malattia anche la sua progressione e la potenziale risposta a terapie specifiche. Il confronto tra il numero dei colpi per segmento ha mostrato un'ottima concordanza con la presenza di LGE, dimostrando peraltro come un valore di colpi per voxel per secondo per segmento superiore a 12906 individua i segmenti descritti come LGE positivi con una specificità del 92% ed una sensibilità del 72% con una AUC di 0.87. Un risultato analogo è stato ottenuto quando la valutazione semiquantitativa di CMR mediante l'uso della tecnica di T1 *mapping* pre-contrasto è stata messa a confronto con il grado di captazione scintigrafica valutata qualitativamente per ogni singolo segmento. Tale confronto ci ha permesso di osservare una associazione significativa tra le due tecniche utilizzate dimostrando come anche le tecniche di valutazione quantitativa CMR possono giocare un ruolo importante in questa tipologia di pazienti, come già dimostrato in letteratura scientifica. Fontana et al, hanno dimostrato recentemente come il T1 *mapping* pre-contrasto permette di identificare i pazienti con TTR-CA con accuratezza diagnostica simile rispetto ai pazienti con AL-CA⁶⁰. Tale dato, se confermato da altri studi e casistiche più numerose, permetterebbe di ipotizzare la possibilità di ottenere una diagnosi definitiva di CA senza la necessità di utilizzo di mezzo di contrasto che frequentemente limita l'esecuzione di CMR in casi senza presenza di insufficienza renale cronica di grado avanzato.

Limiti dello studio

Il primo limite del nostro studio è rappresentato dalle dimensioni del campione studiato ancora minore per i pazienti sottoposti a T1 *mapping*. I risultati relativi pertanto sono da considerarsi preliminari e in fase di rivalutazione prospettica.

L'ultima relativa limitazione riguarda il tracciante scintigrafico utilizzato. Come descritto precedentemente, gli studi in letteratura sono tutti stati fatti utilizzando il PYP

e il DPD. Nel nostro centro il tracciante scintigrafico disponibile è l'HMDP che trattandosi di un tracciante utilizzato largamente nelle scintigrafie ossee non è stato ancora validato in letteratura scientifica come tracciante per la scintigrafia mirata alla diagnosi di CA. In realtà i nostri risultati promuovono questo tracciante come valida alternativa al DPD.

Conclusioni

I risultati del nostro studio hanno permesso di evidenziare il ruolo di CMR e scintigrafia con HMDP nella diagnosi di CA. La CMR presenta come punti di forza l'elevata accuratezza diagnostica nella diagnosi generica di CA e la capacità di fornire diagnosi differenziali spesso inattese. La scintigrafia con HMDP dall'altro canto, non presenta controindicazioni all'esecuzione e presenta un potere diagnostico eccellente nella diagnosi specifica di TTR-CA. L'*imaging* multimodale è pertanto necessario per la diagnosi di CA. Inoltre, vista l'elevata specificità della scintigrafia con HMDP nella diagnosi di TTR-CA, tale metodica è da considerare sempre quando si ha il sospetto di una forma di CA da TTR.

Il confronto tra SPECT e CMR nella valutazione segmentaria biventricolare eseguito mediante tecniche qualitative e semi quantitative ha dimostrato un ottimo grado di concordanza intra ed inter metodica. Considerando le limitate informazioni ottenute con le immagini planari scintigrafiche, i nostri dati sottolineano il valore aggiunto della SPECT, che con la sua capacità di fornire immagini multiplanari permette di documentare la presenza ed estensione della distribuzione di amiloide oltre che quantificare tale dato in una maniera oggettiva e riproducibile; si potrebbe così porre le basi per la valutazione di progressione di malattia ma anche e soprattutto nella valutazione dell'efficacia di nuove terapie farmacologiche specifiche.

In definitiva, i risultati del nostro studio configurano il ruolo combinato di CMR e scintigrafia con HMDP come due strumenti diagnostici versatili e complementari , permettendo di giungere ad una conferma diagnostica in tutti i casi con sospetto di coinvolgimento cardiaco, consentendo inoltre il *depistage* di pazienti con apparente ipertrofia ventricolare sinistra ed aiutando il clinico nella stratificazione della severità dell'interessamento cardiaco, nella valutazione dell'efficacia dell'intervento terapeutico e nella guida al *decision-making* terapeutico.

Bibliografia

1. Merlini, G. & Bellotti, V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N. Engl. J. Med.***349**, 583–96 (2003).
2. Sipe, J. D. *et al.* Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid***17**, 101–4 (2010).
3. Pinney, J. H. *et al.* Senile systemic amyloidosis: clinical features at presentation and outcome. *J. Am. Heart Assoc.***2**, e000098 (2013).
4. Brenner, D. A. *et al.* Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress. *Circ. Res.***94**, 1008–10 (2004).
5. Shi, J. *et al.* Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***107**, 4188–93 (2010).
6. Sanchorawala, V. Light-chain (AL) amyloidosis: diagnosis and treatment. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.***1**, 1331–41 (2006).
7. Merlini, G. & Palladini, G. Amyloidosis: is a cure possible? *Ann. Oncol.***19 Suppl 4**, iv63–6 (2008).
8. Dinarello, C. A., Simon, A. & van der Meer, J. W. M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.***11**, 633–52 (2012).
9. Stojanov, S. *et al.* Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) is a disorder of innate immunity and Th1 activation responsive to IL-1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***108**, 7148–53 (2011).

10. Ruberg, F. L. *et al.* Prospective evaluation of the morbidity and mortality of wild-type and V122I mutant transthyretin amyloid cardiomyopathy: the Transthyretin Amyloidosis Cardiac Study (TRACS). *Am. Heart J.***164**, 222–228.e1 (2012).
11. Pucci, A. *et al.* Atrial amyloid deposits in the failing human heart display both atrial and brain natriuretic peptide-like immunoreactivity. *J. Pathol.***165**, 235–41 (1991).
12. Vanden Driesen, R. I., Slaughter, R. E. & Strugnell, W. E. MR findings in cardiac amyloidosis. *AJR. Am. J. Roentgenol.***186**, 1682–5 (2006).
13. Robin, J. *et al.* Multiple myeloma presenting with high-output heart failure and improving with anti-angiogenesis therapy: two case reports and a review of the literature. *J. Med. Case Rep.***2**, 229 (2008).
14. Falk, R. H., Quarta, C. C. & Dorbala, S. How to image cardiac amyloidosis. *Circ. Cardiovasc. Imaging***7**, 552–62 (2014).
15. Kwong, R. Y. & Falk, R. H. Cardiovascular magnetic resonance in cardiac amyloidosis. *Circulation***111**, 122–4 (2005).
16. Maceira, A. M. *et al.* Cardiovascular magnetic resonance in cardiac amyloidosis. *Circulation***111**, 186–93 (2005).
17. Selvanayagam, J. B., Hawkins, P. N., Paul, B., Myerson, S. G. & Neubauer, S. Evaluation and management of the cardiac amyloidosis. *J. Am. Coll. Cardiol.***50**, 2101–10 (2007).
18. Giannitsis, E. & Katus H. A. Cardiac troponin level elevations not related to acute coronary syndromes. *Nat. Rev. Cardiol.***10**, 623–34 (2013).
19. Perfetto, F., Bergesio, F., Emdin, M. & Cappelli, F. Troponins in cardiac amyloidosis: multipurpose markers. *Nat. Rev. Cardiol.***11**, 179 (2014).

20. Dispenzieri, A. *et al.* Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J. Clin. Oncol.***22**, 3751–7 (2004).
21. Palladini, G. *et al.* Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis. *Circulation***107**, 2440–5 (2003).
22. Nakahashi, T. *et al.* Impact of clinical and echocardiographic characteristics on occurrence of cardiac events in cardiac amyloidosis as proven by endomyocardial biopsy. *Int. J. Cardiol.***176**, 753–9 (2014).
23. Falk, R. H. & Dubrey, S. W. Amyloid heart disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.***52**, 347–61 (2010).
24. Marcu, C. B. *et al.* Cardiac involvement with amyloidosis: mechanisms of disease, diagnosis and management. *Conn. Med.***75**, 581–90 (2011).
25. Comenzo, R. L. & Gertz, M. A. Autologous stem cell transplantation for primary systemic amyloidosis. *Blood***99**, 4276–82 (2002).
26. Palladini, G. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood***107**, 3854–3858 (2006).
27. Palladini, G. *et al.* Treatment of patients with advanced cardiac AL amyloidosis with oral melphalan, dexamethasone, and thalidomide. *Ann. Hematol.***88**, 347–50 (2009).
28. Ng, B., Connors, L. H., Davidoff, R., Skinner, M. & Falk, R. H. Senile systemic amyloidosis presenting with heart failure: a comparison with light chain-associated amyloidosis. *Arch. Intern. Med.***165**, 1425–9 (2005).

29. Fadia, A. *et al.* Incidence and outcome of acute renal failure complicating autologous stem cell transplantation for AL amyloidosis. *Kidney Int.***63**, 1868–73 (2003).
30. Palladini, G. *et al.* Association of melphalan and high-dose dexamethasone is effective and well tolerated in patients with AL (primary) amyloidosis who are ineligible for stem cell transplantation. *Blood***103**, 2936–8 (2004).
31. Palladini, G. *et al.* The combination of thalidomide and intermediate-dose dexamethasone is an effective but toxic treatment for patients with primary amyloidosis (AL). *Blood***105**, 2949–51 (2005).
32. Gertz, M. A. *et al.* A multicenter phase II trial of 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin (IDOX) in primary amyloidosis (AL). *Amyloid***9**, 24–30 (2002).
33. Pepys, M. B. *et al.* Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature***417**, 254–9 (2002).
34. Hrnčić, R. *et al.* Antibody-mediated resolution of light chain-associated amyloid deposits. *Am. J. Pathol.***157**, 1239–46 (2000).
35. Lachmann, H. J. *et al.* Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br. J. Haematol.***122**, 78–84 (2003).
36. Dember, L. M. *et al.* Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *N. Engl. J. Med.***356**, 2349–60 (2007).
37. Rumjon, A., Coats, T. & Javaid, M. M. Review of eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.***5**, 37–43 (2012).

38. Delahaye, N. *et al.* Impact of liver transplantation on cardiac autonomic denervation in familial amyloid polyneuropathy. *Medicine (Baltimore)*.**85**, 229–38 (2006).
39. Alhamadsheh, M. M. *et al.* Potent kinetic stabilizers that prevent transthyretin-mediated cardiomyocyte proteotoxicity. *Sci. Transl. Med.***3**, 97ra81 (2011).
40. McMurray, J. J. V *et al.* ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur. J. Heart Fail.***14**, 803–69 (2012).
41. Sack, F.-U. *et al.* Treatment options for severe cardiac amyloidosis: heart transplantation combined with chemotherapy and stem cell transplantation for patients with AL-amyloidosis and heart and liver transplantation for patients with ATTR-amyloidosis. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.***33**, 257–62 (2008).
42. Muzzarelli, S., Ordovas, K. & Higgins, C. B. Cardiovascular MRI for the assessment of heart failure: focus on clinical management and prognosis. *J. Magn. Reson. Imaging***33**, 275–86 (2011).
43. Vogelsberg, H. *et al.* Cardiovascular magnetic resonance in clinically suspected cardiac amyloidosis: noninvasive imaging compared to endomyocardial biopsy. *J. Am. Coll. Cardiol.***51**, 1022–30 (2008).
44. Ruberg, F. L. *et al.* Diagnostic and prognostic utility of cardiovascular magnetic resonance imaging in light-chain cardiac amyloidosis. *Am. J. Cardiol.***103**, 544–9 (2009).
45. Austin, B. A. *et al.* Delayed hyper-enhancement magnetic resonance imaging provides incremental diagnostic and prognostic utility in suspected cardiac amyloidosis. *JACC. Cardiovasc. Imaging***2**, 1369–77 (2009).

46. Syed, I. S. *et al.* Role of cardiac magnetic resonance imaging in the detection of cardiac amyloidosis. *JACC. Cardiovasc. Imaging***3**, 155–64 (2010).
47. Wesbey, G. E. *et al.* Effect of gadolinium-DTPA on the magnetic relaxation times of normal and infarcted myocardium. *Radiology***153**, 165–9 (1984).
48. Kim, R. J., Chen, E. L., Lima, J. A. & Judd, R. M. Myocardial Gd-DTPA kinetics determine MRI contrast enhancement and reflect the extent and severity of myocardial injury after acute reperfused infarction. *Circulation***94**, 3318–26 (1996).
49. Kwon, D. H. *et al.* Cardiac magnetic resonance detection of myocardial scarring in hypertrophic cardiomyopathy: correlation with histopathology and prevalence of ventricular tachycardia. *J. Am. Coll. Cardiol.***54**, 242–9 (2009).
50. Kim, R. J. *et al.* Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. *Circulation***100**, 1992–2002 (1999).
51. Perugini, E. *et al.* Non-invasive evaluation of the myocardial substrate of cardiac amyloidosis by gadolinium cardiac magnetic resonance. *Heart***92**, 343–9 (2006).
52. Hosch, W. *et al.* Late enhancement in cardiac amyloidosis: correlation of MRI enhancement pattern with histopathological findings. *Amyloid***15**, 196–204 (2008).
53. Migrino, R. Q. *et al.* Prognostic implication of late gadolinium enhancement on cardiac MRI in light chain (AL) amyloidosis on long term follow up. *BMC Med. Phys.***9**, 5 (2009).
54. Maceira, A. M., Prasad, S. K., Hawkins, P. N., Roughton, M. & Pennell, D. J. Cardiovascular magnetic resonance and prognosis in cardiac amyloidosis. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.***10**, 54 (2008).

55. Germain, P. *et al.* Native T1 mapping of the heart - a pictorial review. *Clin. Med. Insights. Cardiol.***8**, 1–11 (2014).
56. Puntmann, V. O. *et al.* Native T1 mapping in differentiation of normal myocardium from diffuse disease in hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *JACC. Cardiovasc. Imaging***6**, 475–84 (2013).
57. Karamitsos, T. D. *et al.* Noncontrast T1 mapping for the diagnosis of cardiac amyloidosis. *JACC. Cardiovasc. Imaging***6**, 488–97 (2013).
58. Feng, Y. *et al.* In vivo comparison of myocardial T1 with T2 and T2* in thalassaemia major. *J. Magn. Reson. Imaging***38**, 588–93 (2013).
59. Sado, D. M. *et al.* Identification and assessment of Anderson-Fabry disease by cardiovascular magnetic resonance noncontrast myocardial T1 mapping. *Circ. Cardiovasc. Imaging***6**, 392–8 (2013).
60. Fontana, M. *et al.* Native T1 mapping in transthyretin amyloidosis. *JACC. Cardiovasc. Imaging***7**, 157–65 (2014).
61. Banyersad, S. M. *et al.* Quantification of myocardial extracellular volume fraction in systemic AL amyloidosis: an equilibrium contrast cardiovascular magnetic resonance study. *Circ. Cardiovasc. Imaging***6**, 34–9 (2013).
62. Barison, A. *et al.* Measurement of myocardial amyloid deposition in systemic amyloidosis: insights from cardiovascular magnetic resonance imaging. *J. Intern. Med.***277**, 605–14 (2015).
63. Banyersad, S. M. *et al.* T1 mapping and survival in systemic light-chain amyloidosis. *Eur. Heart J.***36**, 244–51 (2015).
64. Shellock, F. G., Tkach, J. A., Ruggieri, P. M. & Masaryk, T. J. Cardiac pacemakers, ICDs, and loop recorder: evaluation of translational attraction using

- conventional ('long-bore') and 'short-bore' 1.5- and 3.0-Tesla MR systems. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.***5**, 387–97 (2003).
65. Amara, W. [Pacemaker or ICD and MRI: is MRI safety the new standard?]. *Ann. Cardiol. Angiol. (Paris)***60**, 279–81 (2011).
 66. Glaudemans, A. W. J. M. *et al.* Nuclear imaging in cardiac amyloidosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***36**, 702–14 (2009).
 67. Rapezzi, C. *et al.* Role of (99m)Tc-DPD scintigraphy in diagnosis and prognosis of hereditary transthyretin-related cardiac amyloidosis. *JACC. Cardiovasc. Imaging***4**, 659–70 (2011).
 68. Tanaka, M. *et al.* Iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphic assessment of myocardial sympathetic innervation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *J. Am. Coll. Cardiol.***29**, 168–74 (1997).
 69. Delahaye, N. *et al.* Cardiac sympathetic denervation in familial amyloid polyneuropathy assessed by iodine-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy and heart rate variability. *Eur. J. Nucl. Med.***26**, 416–24 (1999).
 70. Dzung, J. N. *et al.* CMR-based differentiation of AL and ATTR cardiac amyloidosis. *JACC. Cardiovasc. Imaging***7**, 133–42 (2014).
 71. Cerqueira, M. D. *et al.* Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation***105**, 539–42 (2002).
 72. Dill, T. Contraindications to magnetic resonance imaging: non-invasive imaging. *Heart***94**, 943–8 (2008).

73. Bruder, O. *et al.* European Cardiovascular Magnetic Resonance (EuroCMR) registry--multi national results from 57 centers in 15 countries. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **15**, 9 (2013).

Ringraziamenti

Il primo ringraziamento va al Professor Alberto Balbarini, la persona che mi ha accolto a Pisa, insegnandomi tanto ed aiutandomi a crescere quando ancora non ero sicuro delle mie capacità.

Lui ha creduto in me e per questo gli sarò per sempre grato.

Ringraziando i direttori delle UO degli ospedali dove ho lavorato, ringrazio tutto il personale medico, infermieristico ed amministrativo con il quale ho interagito in questi anni. Grazie al Prof. Mario Marzilli, Prof. Petros Nihoyannopoulos, Prof. Eike Nagel e Prof. Michele Emdin.

Un ringraziamento per l'accoglienza riservatami negli ultimi mesi e per l'indispensabile aiuto nella stesura di questa tesi va a tutto il personale medico della Fondazione Toscana Gabriele Monasterio a Pisa e a Massa ed in particolare al Prof. Michele Emdin, Prof. Claudio Passino, Dr.ssa Roberta Poletti, Dr.ssa Chiara Mammini, Dr. Umberto Startari, Dr. Giuseppe Vergaro, Dr.ssa Sara Chiappino, Dr. Paolo Marzullo, Dr. Dario Genovesi, Dr. Dante Chiappino, Dr. Angelo Monteleone e Dr. Francesco Avogliero.

Grazie di cuore a tutto il gruppo Risonanza della FTGM per la loro disponibilità incondizionata, la loro voglia di insegnarmi cose nuove ma soprattutto per avermi fatto capire cosa vorrei fare nei prossimi anni della mia vita professionale. Grazie al Dr. Giovanni Donato Aquaro, Dr.ssa Alessia Pepe, Dr. Andrea Barison e Dr. Giancarlo Todiere.

Un pensiero a parte va alla mia famiglia, sempre presente seppur lontana, perché ogni gioia con loro condivisa è una gioia raddoppiata ed ogni problema condiviso un problema dimezzato.

Infine grazie alla persona che ha condiviso con me questo percorso fin dal primo giorno, facendo tanti sacrifici, supportandomi e sopportandomi, alla mia migliore amica, compagna e complice.

Στη Βασω