

PARTE II

Protocolli diagnostici anatomo-patologici per gruppi di patologie

(G Ital Cardiol 2009; 10 (Suppl 1-9): 18S-50S)

Miocarditi

Breve descrizione della patologia

La classificazione delle CMP comprende anche le miocarditi, ovvero quelle affezioni che comportano una malattia infiammatoria del miocardio associata a disfunzione cardiaca^{45,114,115}. Esse si distinguono in tre categorie: a) quelle non infettive di origine immunitaria/allergica (miocardite a cellule giganti, reumatica ed eosinofila, miocarditi in corso di altre malattie immuno-mediate, miocarditi virus-negative con o senza autoanticorpi anti cuore circolanti), b) quelle infettive (batteriche, protozoarie e virali) e c) quelle in cui il meccanismo immunitario è stato innescato o mantenuto da una infezione. Lo spettro delle manifestazioni cliniche è alquanto variabile: da forme asintomatiche o paucisintomatiche a quadri clinici di scompenso cardiaco grave ed irreversibile o perfino a morte improvvisa. L'eterogeneità dei sintomi è verosimilmente una delle principali ragioni della mancata conoscenza o sottostima della reale incidenza della malattia. La caratterizzazione diagnostica della malattia è quindi ancora primariamente riferita a criteri unicamente morfologici atti ad identificare la presenza dell'infiltrato infiammatorio e l'esame istologico con la tradizionale colorazione con ematossilina ed eosina risulta essenziale.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico Standard diagnostici

- BEM

N.B. La scintigrafia miocardica e la RM possono contribuire a generare il sospetto diagnostico ma non sostituiscono la BEM.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

- Fornire una diagnosi di certezza dell'interessamento miocardico.
- Fornire la diagnosi eziologica (agente eziologico infettivo, eziologia immune).
- Fornire indicazioni sul grado di attività della malattia.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento¹¹⁹

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Annotazioni tecniche particolari

- Due prelievi (o uno se ha dimensioni >3 mm²) devono essere destinati alle indagini molecolari per la ricerca tissutale dei genomi virali. Sono possibili differenti modalità di invio di tali prelievi bioptici, a seconda delle consuetudini del laboratorio di patologia molecolare:
 - preservazione immediata dei frustoli bioptici in RNAlater, conservazione a 4°C ed invio tempestivo al laboratorio;
 - se non si dispone di RNAlater, congelamento dei frustoli in azoto liquido (*snap freeze*) ed invio al laboratorio in ghiaccio secco;
 - invio dei frustoli "a fresco" in microprovette prive di fissativo subito dopo il prelievo.

Una volta giunti in laboratorio, i prelievi possono essere processati subito per lo studio molecolare, oppure stoccati a -80°C o in container di azoto liquido;

- un prelievo di sangue periferico (5-10 ml) in EDTA o citrato per la ricerca con indagini molecolari degli stessi genomi virali studiati sul tessuto miocardico.

N.B. Per la diagnostica delle CMP infiammatorie sono importanti:

- il *timing* della BEM rispetto all'esordio sintomatologico della malattia,
- numero e rappresentatività dei prelievi bioptici,
- associare la ricerca degli autoanticorpi anti cardiaci nel siero^{45,84}.

Esame istologico

Nelle sezioni colorate con ematossilina ed eosina verrà identificata la presenza di: 1) infiltrato infiammatorio; 2) danno miocellulare, 3) fibrosi. Bisogna specificare:

- a) le caratteristiche dell'infiltrato infiammatorio (linfocitario, polimorfo, granulomatoso, eosinofilo) e la sua entità con valu-

tazione semiquantitativa o eventualmente quantitativa;

- b) il danno miocellulare (non solo la necrosi o la miocitolisi, ma anche altre alterazioni, quali vacuolizzazione citoplasmatica, apoptosi, atrofia);
- c) la presenza di fibrosi (interstiziale sostitutiva, perivascolare, subendocardica) e la sua entità con valutazione semiquantitativa o eventualmente quantitativa.

Colorazioni istomorfologiche

- La tricromica di Azan-Mallory consente di evidenziare e quantificare meglio la fibrosi, che risulta di colore blu brillante.
- La colorazione Weigert Van Gieson, che evidenzia le fibre elastiche in marrone/nero, consente di valutare più appropriatamente la struttura dei vasi e di caratterizzare la fibroelastosi endocardica.

Indagini immunoistochimiche

L'impiego dell'immunoistochimica rappresenta un corollario fondamentale alla tradizionale istologia, consentendo l'identificazione e caratterizzazione dell'infiltrato infiammatorio⁴⁰⁻⁴⁴.

Pannello di anticorpi da utilizzare: CD45, CD68/PGM1, CD3, CD4, CD8, CD20, HLA-ABC, HLA-DR.

Quantificazione morfometrica

È auspicabile la quantificazione dell'entità dell'infiltrato flogistico (oggi si ritiene patologico un infiltrato linfocitario >7 linfociti T/mm²) con indagini morfometriche computerizzate su sezioni di immunoistochimica colorate con l'anticorpo anti-CD3. Per quanto non strettamente neces-

sarie, indagini morfometriche computerizzate su sezioni colorate con tricromica di Azan-Mallory consentiranno una precisa misurazione dell'entità della fibrosi.

Le indagini molecolari

Le indagini molecolari ed in particolare le tecniche di amplificazione genica quali la PCR o la *nested-PCR* sono in grado, per la loro elevata sensibilità, di amplificare in modo esponenziale le molecole di DNA o RNA eventualmente presenti, consentendo l'identificazione anche di poche copie di genoma virale presenti nelle piccole quantità di tessuto miocardico della BEM. L'analisi di sequenza e l'identificazione di forme replicanti virali sono oggi sempre più utilizzate per l'esatta caratterizzazione degli agenti infettivi⁴⁶⁻⁵⁰. Il panel di virus cardiotropi da indagare in caso di sospetto clinico di miocardite comprende oggi almeno i seguenti differenti genotipi: enterovirus, adenovirus, citomegalovirus, virus di Epstein-Barr, herpes simplex, virus dell'influenza A e B, parvovirus B19 e virus dell'epatite C (Tabella 6).

La ricerca dei genomi virali sia nel tessuto miocardico che in un prelievo di sangue periferico potrà essere di aiuto, nei casi di contemporanea positività per uno dei virus in entrambi i campioni, per valutare se si tratta di contaminazione ematica o no.

Nella Figura 1 sono riportati 2 casi di miocardite linfocitaria ad eziologia virale (1A-1B da adenovirus; 1C-1D da enterovirus)^{49,120}; nella Figura 2, un esempio di miocardite linfocitaria *borderline* in base ai criteri di Dallas³⁸.

Elementi diagnostici principali ed indispensabili

- Presenza di infiltrato infiammatorio.

Tabella 6. Virus cardiotropi da indagare nei casi di sospetto clinico di miocardite.

Virus	Sequenza (5'→3')	T° di annealing	Gene target	Prodotto di amplificazione
EV/RV	AAGCACTTCTGTTTCC CATTAGGGGCCGAGGA	50°C	5' untranslated region (5'-UTR)	297
CMV (DNA)	CACCTGTACCGCTGCTATATTGC CACCACGCAGCGGCCCTTGATGTTT	52°C	Phosphorylated matrix protein (pp65 e pp71)	399
CMV (RNA)	GTGACCTTGACGGTGGCTTT CGTCATACCCCCGGAGTAA	57°C	Early gene	275
PVB19	GGTAAGAAAAATACACTGT TTGCCCGCCTAAAATGGCTTT	57°C	NS1 VP1 e VP2	218
HSV	CATCACCGACCCGAGAGGGA GGGCCAGGCGCTTGTTGGTA	60°C	DNA polimerasi	92
HCV	GGAACCTACTGTCTTACGCAGA TGCTCATGGTGCACGGTCTA GTGCAGCCTCCAGGACCC	54°C 56°C	5' untranslated region (5'-UTR)	210
EBV	GGCACTCGCAAGCACCTAT TTCGGGTGGAACTCCTTG GTCATCATCATCCGGGTCTC	64°C	Nuclear antigen 1 (EBNA 1)	268
AV	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	65°C	Exon protein	308
INF A	AAGGGCTTTACCGAAGAGG CCCATTCTCATTACTGCTTC	50°C	Non structural protein 1 and 2 (NS1 and NS2)	190
INF B	ATGGCCATCGGATCCTCAAC TGTCAGCTATTATGGAGCTG	57°C	Non structural protein 1 and 2 (NS1 and NS2)	241

AV = adenovirus; CMV = cytomegalovirus; EBV = virus di Epstein-Barr; EV/RV = enterovirus/rinovirus; HCV = virus dell'epatite C; HSV = herpes simplex virus; INF A = virus dell'influenza A; INF B = virus dell'influenza B; PVB19 = parvovirus B19.

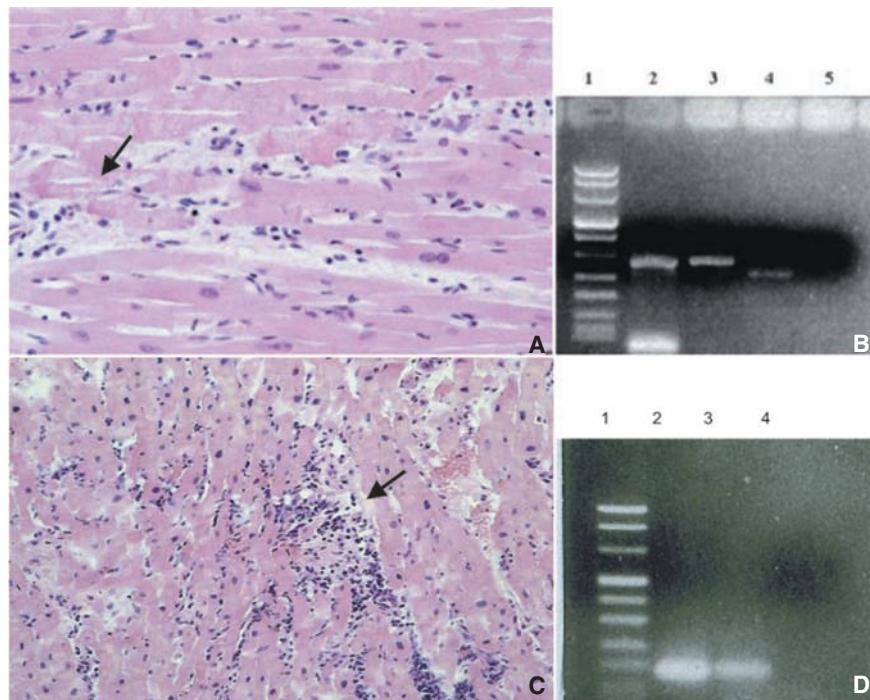


Figura 1. A-B: miocardite attiva in maschio di 37 anni. A: istologia; è visibile un modesto infiltrato infiammatorio linfo-monocitario con associati rari granulociti neutrofili, evidenti nelle aree di miocitolisi (freccia). Non sono presenti effetti citopatici virali (ematossilina-eosina, 100×). B: gel elettroforesi di reazione polimerasica a catena (PCR) per adenovirus. Linea 1: marker di DNA (fattore VIII); linea 2: controllo positivo per adenovirus (308 pb); linea 3: biopsia endomiocardica positiva per adenovirus; linea 4: amplificato di β -globina (gene house-keeping, 269 pb); linea 5: controllo negativo (reagenti senza DNA). Da Calabrese e Thiene⁴⁹, modificata. C-D: miocardite attiva in ragazzo di 15 anni. C: istologia; è visibile un discreto infiltrato linfo-monocitario con evidente focolaio di miocitolisi (freccia). Non sono presenti effetti citopatici virali (ematossilina-eosina, 50×). D: gel elettroforesi di PCR per enterovirus. Linea 1: marker di DNA (fattore VIII); linea 2: controllo positivo per enterovirus (180 pb); linea 3: biopsia endomiocardica positiva per enterovirus; linea 4: controllo negativo (reagenti senza DNA). Da Calabrese et al.¹²⁰, modificata.

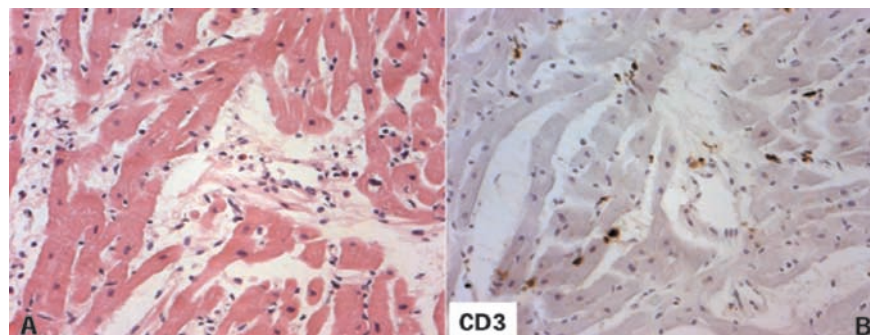


Figura 2. Miocardite borderline in maschio di 63 anni. A: istologia; è visibile un modesto infiltrato infiammatorio linfo-monocitario con edema associato, senza segni di miocitolisi (ematossilina-eosina, 100×). B: immunoistochimica; sono visibili numerosi linfociti T positivi per CD3 (100×).

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Danno miocellulare (necrosi, apoptosi, vacuolizzazione, ecc.).
- Presenza di fibrosi.

Considerazioni ed annotazioni particolari

I criteri di Dallas³⁸ attualmente in uso per la definizione istologica di una CMP infiammatoria presentano alcuni limiti che possono così sintetizzarsi:

- mancanza di definizione e quantificazione del danno miocellulare,

- mancanza di caratterizzazione e quantificazione dell'infiltrato infiammatorio,
- mancanza sia della definizione della sede che della quantificazione della fibrosi,
- mancanza di definizione eziologica.

Il referto diagnostico corredato di esame istologico e di indagini immunoistochimiche e molecolari consente di fornire informazioni accurate e complete sul quadro infiammatorio, anche nella prospettiva di verificare l'efficacia di nuovi trial terapeutici.

La Figura 3 mostra il tipico aspetto istologico della miocardite a cellule giganti¹²¹.

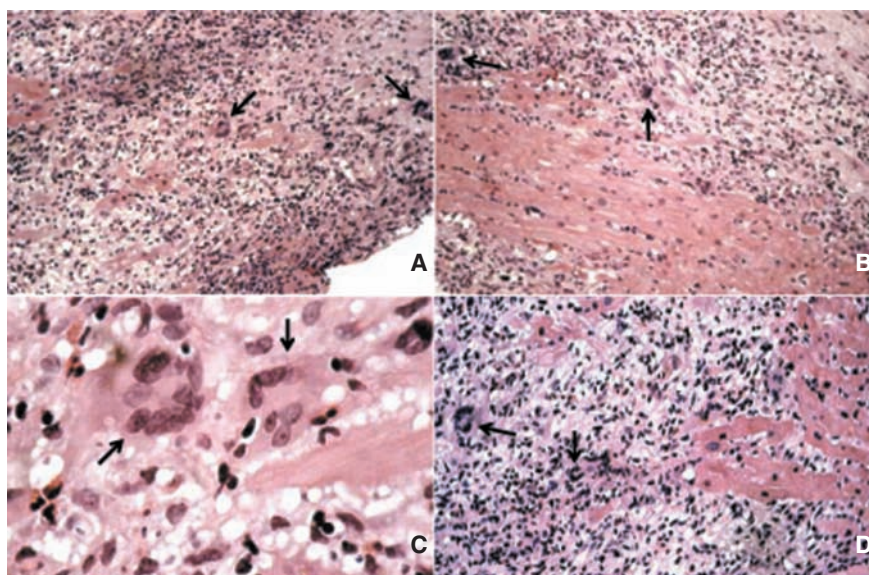


Figura 3. Miocardite a cellule giganti in donna di 43 anni. Istologia: biopsia endomiocardica che mostra un intenso infiltrato infiammatorio polimorfo [linfociti, macrofagi, granulociti eosinofili, cellule giganti plurinucleate (frecche)], associato ad esteso danno miocellulare (necrosi e degenerazioni) (ematossilina-eosina: A e B, 100×; C, 400×; D, 200×).

Da Leone et al.¹²¹, modificata.

Cardiomiopatie infiammatorie associate a malattie sistemiche immunologiche

Breve descrizione della patologia

Il coinvolgimento cardiaco è piuttosto frequente in corso di connettiviti sistemiche quali il lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide, la spondilite anchilosante, la dermatopolimiosite e la sclerodermia: i quadri clinico-patologici sono estremamente polimorfi, poiché possono essere coinvolti il pericardio, le valvole, le arterie coronarie ed il miocardio¹²². Il coinvolgimento miocardico è più frequente nel LES e nella dermatopolimiosite e comprende manifestazioni cliniche che vanno dai disturbi della conduzione (blocchi atrioventricolari, blocchi di branca), alla disfunzione cardiaca progressiva con il quadro clinico della CMP dilatativa, allo scompenso cardiaco. Il substrato istologico di questi quadri clinici è generalmente la miocardite, come dimostrato da studi autoptici^{123,124}.

L'interessamento patologico del cuore può inoltre manifestarsi in numerose altre malattie sistemiche immunologiche:

- malattia di Churg-Strauss,
- granulomatosi di Wegener,
- sarcoidosi,
- arterite di Takayasu,
- malattia idiopatica infiammatoria intestinale.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico della patologia cardiaca

Standard diagnostici

- BEM in presenza di malattia sistemica accertata e quadro clinico cardiologico congruente.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico^{125,126}

- Fornire una diagnosi probabile (quadro istologico di CMP infiammatoria e/o di vasculite) dell'interessamento cardiaco.

- Diagnosi differenziale con altre forme specifiche di CMP infiammatoria.
- Esclusione di altre patologie.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Esame istologico

Nelle sezioni colorate con ematossilina-eosina, è possibile evidenziare un quadro di CMP infiammatoria, con infiltrati flogistici interstiziali associati o meno a danno miocellulare: il quadro istologico può avere l'aspetto di una miocardite linfocitaria aspecifica o presentarsi con caratteristiche più specifiche, a seconda della malattia sistemica in causa, come ad esempio la miocardite granulomatosa non caseosa tipica della sarcoidosi (Figura 4). Nel caso del LES, si possono osservare anche ispessimenti della parete dei rami intramurali delle arterie coronarie.

Colorazioni istomorfologiche

La tricromica di Azan-Mallory o di Masson e la colorazione Weigert Van Gieson per le fibre elastiche sono utili nella valutazione delle alterazioni vascolari.

Indagini immunoistochimiche

Nei casi di sospetta miocardite, lo spettro di anticorpi è sovrapponibile a quello impiegato nel protocollo delle "Miocarditi".

In presenza di alterazioni dei rami intramurali delle coronarie, è consigliabile la ricerca di depositi di immunoglobuline nelle pareti dei piccoli vasi¹²⁶.

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Infiltrati infiammatori interstiziali ed associato danno miocellulare.
- Alterazioni vascolari.

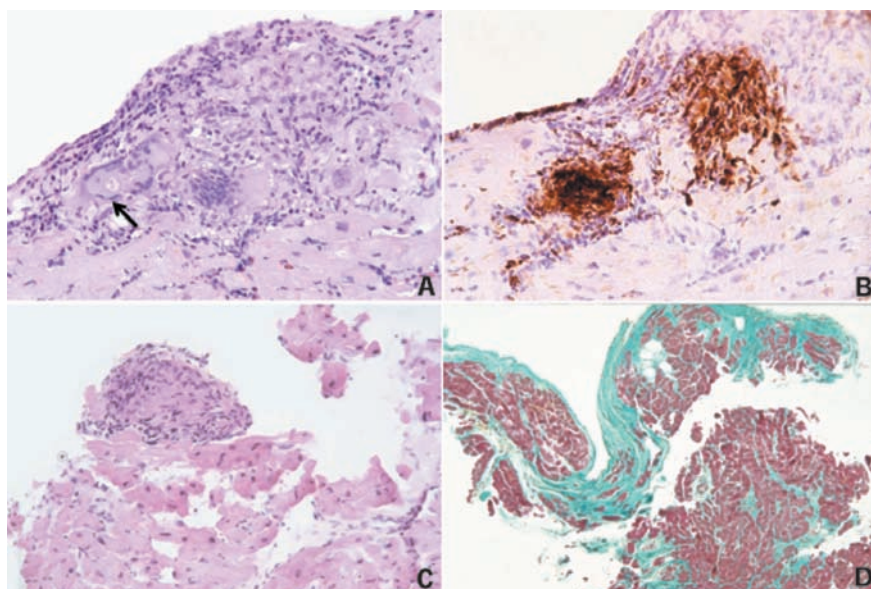


Figura 4. Sarcoidosi cardiaca in donna di 59 anni. A: istologia; è visibile un infiltrato infiammatorio granulomatoso con cellule giganti in assenza di necrosi caseosa. Nel citoplasma di una cellula gigante si nota un corpo asteroide (freccia) (ematossilina-eosina, 200×). B: immunoistochimica; i macrofagi e le cellule giganti plurinucleate sono positive con l'anticorpo CD68/PGM1 (200×). C: biopsia endomiocardica successiva di controllo che mostra la persistenza di infiltrato infiammatorio polimorfo nodulare (ematossilina-eosina, 100×). D: successiva evoluzione cronica con fibrosi interstiziale e scarso infiltrato infiammatorio (tricromica di Masson, 100×).

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Alterazioni miocitarie.
- Fibrosi.

Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro ed aritmie

Breve descrizione della patologia

Le aritmie non sono una malattia ma un sintomo/segno e come tale possono essere l'espressione di diverse cardiopatie, strutturali e non.

- **Aritmie ventricolari "sine materia" o idiopatiche:** prima di definire un'aritmia idiopatica o a cuore strutturalmente sano, potrebbe essere indicato far ricorso alla BEM, soprattutto nelle aritmie ventricolari maggiori¹²⁷, qualora dopo aver eseguito le varie indagini non invasive ed invasive previste dall'iter diagnostico non sia stato evidenziato alcun reperto specifico.
- **Aritmie ventricolari "cum materia":** possono essere conseguenza di malattia coronarica, valvolare o miocardica. Una volta escluse le altre cause cardiache, la BEM è indicata nel sospetto di CMP aritmogena, anche per escludere altre condizioni che possono simularla, quali la tachicardia idiopatica del tratto di efflusso del ventricolo destro, la miocardite, la CMP dilatativa e la sarcoidosi. Nel caso invece di CMP ipertrofica, non c'è indicazione alla BEM nell'iter diagnostico, eccetto nel caso di una diagnosi differenziale con malattie da accumulo.

La **CMP aritmogena del ventricolo destro (ARVC)** è una malattia primitiva del muscolo cardiaco a carattere familiare in oltre il 50% dei casi, conseguente a mutazioni di geni che codificano per proteine delle giunzioni intercellulari meccaniche^{22,23}. Essa è caratterizzata da anomalie

strutturali e funzionali del ventricolo destro e spesso del ventricolo sinistro, sia in termini emodinamici che di ritmo e conduzione dello stimolo elettrico (Figura 5A), conseguenti ad atrofia miocardica progressiva con sostituzione adiposa o fibro-adiposa. Clinicamente si manifesta con aritmie ventricolari anche a rischio di morte improvvisa, specialmente nei giovani e negli atleti. La diagnosi *in vivo* di malattia si ottiene grazie all'impiego di criteri maggiori e criteri minori, stabiliti da una task force internazionale¹²⁸.

La BEM rientra nell'iter diagnostico ogni qualvolta le indagini non invasive (ECG, *signal-averaged* ECG, ecocardiografia, Holter, test da sforzo) non abbiano portato ad una diagnosi di certezza^{22,23,128,129}. Inoltre, ne è consigliata l'esecuzione nei casi in cui sia prevista comunque un'indagine invasiva in sala di emodinamica (vedi angiografia, studio elettrofisiologico, mappaggio elettroanatomico). La caratterizzazione tissutale mediante BEM è infatti considerata un criterio maggiore per la diagnosi, qualora si rinvenga all'esame istologico atrofia miocardica associata a sostituzione fibrosa o fibro-adiposa.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico della patologia cardiaca

Standard diagnostici

- Applicazione dello *score system* per la diagnosi di ARVC in cui la BEM è criterio diagnostico maggiore (Tabella 7)¹²⁸.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

Riveste un ruolo importante e spesso determinante nell'iter diagnostico ("criterio diagnostico maggiore"), consentendo di:

Tabella 7. Criteri per la diagnosi di cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro¹²⁸.

1. Disfunzione globale e/o regionale e alterazioni strutturali

Maggiore

Dilatazione severa e riduzione della frazione di eiezione del ventricolo destro con assenza (o solo lieve) interessamento del ventricolo sinistro.

Aneurismi localizzati del ventricolo destro (aree acinetiche o discinetiche con bulging diastolico).

Dilatazione severa segmentale del ventricolo destro.

Minore

Dilatazione lieve globale del ventricolo destro e/o riduzione della frazione di eiezione con ventricolo sinistro normale.

Dilatazione segmentale lieve del ventricolo destro.

Ipcinesia regionale del ventricolo destro.

2. Caratterizzazione tissutale delle pareti

Maggiore

Sostituzione fibro-adiposa del miocardio alla biopsia endomiocardica.

3. ECG anomalie della ripolarizzazione

Minore

Onde T invertite nelle derivazioni precordiali destre (V_2 e V_3) in soggetti di età >12 anni e in assenza di blocco di branca destra.

4. ECG anomalie della depolarizzazione/conduzione

Maggiore

Onde epsilon o incremento localizzato della durata del QRS (>110 ms) nelle derivazioni precordiali destre.

Minore

Potenziali tardivi all'ECG ad alta risoluzione.

5. Aritmie

Minore

Tachicardia ventricolare sostenuta o non sostenuta a morfologia tipo blocco di branca sinistra documentata all'ECG, Holter o durante test da sforzo.

Extrasistoli ventricolari frequenti (>1000/24h all'Holter).

6. Storia familiare

Maggiore

Familiarità confermata all'autopsia o chirurgia.

Minore

Familiarità di morte improvvisa giovanile (<35 anni) da sospetta cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro.

Familiarità (diagnosi clinica basata sui presenti criteri).

Nota. È possibile fare diagnosi di malattia quando sono soddisfatti 2 criteri maggiori, oppure 1 criterio maggiore e 2 minori, o ancora 4 criteri minori.

- fornire una diagnosi probabile dell'interessamento miocardico, evidenziando atrofia miocardica con fibrosi o fibro-adiposi e consentendo la diagnosi differenziale con miocardite, sarcoidosi, CMP dilatativa e forme idiopatiche^{22,24,60,130,131};
- valutare l'entità della compromissione morfologica dei miociti.

La diagnosi anatomico-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Annotazioni tecniche particolari

- La biopsia non deve essere eseguita nel setto interventricolare.
- L'accuratezza diagnostica aumenta se la sede dei prelievi

vi bioptici è guidata da imaging o da mappaggio elettroanatomico²⁵ (Figura 5B).

Esame istologico

Sulle sezioni di routine colorate con ematossilina-eosina, si esegue un'iniziale valutazione della presenza di fibrosi sostitutiva e di infiltrazione adiposa (Figura 5C). Bisogna inoltre rilevare:

- le alterazioni delle miocellule: ipertrofia, atrofia, vacuolizzazione sarcoplasmatica, necrosi, apoptosi (Figura 5D),
- la presenza o meno di associati infiltrati infiammatori¹³².
Si deve invece escludere la presenza di cellule giganti, granulomi e miocardite, che possono simulare la ARVC.

Colorazioni istomorfologiche

- *Tricromica di Azan-Mallory* per evidenziare meglio la fibrosi, che risulta di colore blu brillante, e permettere quindi l'analisi morfometrica (vedi sotto).

Quantificazione morfometrica

Indagini morfometriche computerizzate su sezioni colorate con tricromica sono auspicabili per quantificare in modo preciso l'entità dell'atrofia miocardica, della fibrosi sostitutiva e dell'infiltrazione adiposa ed aumentare la sensibilità e specificità della BEM nella diagnosi di ARVC (vedi sotto).

Indagini immunoistochimiche

È possibile anche effettuare lo studio immunoistochimico per la tipizzazione degli infiltrati infiammatori e la caratterizzazione delle alterazioni dell'espressione delle proteine desmosomali e delle connesine.

Esame ultrastrutturale

Utile (ma facoltativo) per l'analisi morfologica delle giunzioni intercellulari.

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Presenza di atrofia miocardica, sostituzione fibrosa o fibro-adiposa in almeno un frammento.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Quadri di morte miocitaria (apoptosi, necrosi).
- Alterazioni miocitarie "cardiomiopatiche" (vacuolizzazione, nuclei dismetrici e dismorfici, ipertrofia, aspetti di adipogenesi).
- Reazione flogistica prevalentemente linfo-monocitaria.

Considerazioni ed annotazioni particolari

Nel sospetto diagnostico di ARVC, la BEM andrebbe eseguita tenendo presente che il processo distrofico è spesso segmentario e non diffuso e che il setto interventricolare è quasi sempre risparmiato dalla malattia in termini di sostituzione fibro-adiposa. Rispetto al protocollo base della BEM, nel sospetto di ARVC valgono le seguenti indicazioni:

- i prelievi a scopo diagnostico (almeno 3) devono essere eseguiti a livello della parete libera del ventricolo destro, nelle sedi anteriore, postero-inferiore ed infundibolare, e non nel setto interventricolare;
- i vari prelievi eseguiti in sedi diverse del ventricolo destro vanno tenuti distinti, mantenendoli in contenitori separati, ed inclusi in blocchetti diversi ai fini della valutazione istomorfometrica;

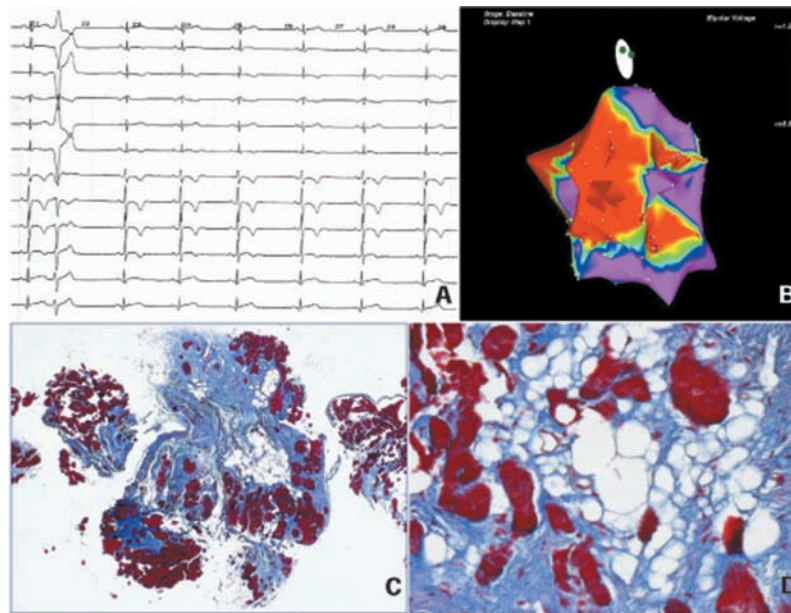


Figura 5. Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro in maschio di 19 anni. A: ECG a 12 derivazioni con onde T negative da V₁ a V₄ ed extrasistolici ventricolari a morfologia blocco di branca sinistra e asse superiore. B: mappaggio elettroanatomico in obliqua anteriore destra; si notano i bassi voltaggi (rosso indica <0.5 mV) nelle regioni antero-infundibolare, infero-basale e apicale. C: frammento di biopsia endomiocardica che evidenzia una massiva atrofia miocardica con sostituzione fibro-adiposa (tricromica di Azan-Mallory, 60×). D: particolare della precedente che mostra residui miociti immersi nel tessuto fibro-adiposo (tricromica di Azan-Mallory, 400×).
Da Corrado et al.⁶⁰, modificata.

- eventuali prelievi dal setto possono essere utili a scopo di ricerca (indagini immunoistochimiche, molecolari, ultrastrutturali, ecc.);
- il prelievo destinato alle indagini suppletive (molecolari, ultrastrutturali) va tenuto in *stand-by*, per poter essere recuperato qualora l'esame dei prelievi processati per esame istologico non abbia consentito una chiara definizione diagnostica.

Un recente lavoro¹³³, che ha simulato la BEM *in vitro* in cuori affetti da CMP dilatativa, ARVC e *adipositas cordis* (obesità), in cuori di anziani ed in cuori normali di controllo, ha evidenziato che il parametro tissutale più utile ai fini diagnostici tra atrofia miocardica, grasso e fibrosi è il primo, con un valore di miocardio <59% dell'area totale biopica in frammenti prelevati dal ventricolo destro: gli autori propongono che tale valore sia considerato come cut-off diagnostico per la ARVC, con una sensibilità dell'80% ed una specificità del 95%. Il parametro tessuto adiposo è invece risultato il meno attendibile, specialmente all'apice del ventricolo destro, non essendoci differenze statisticamente significative fra i casi di ARVC e quelli di soggetti obesi o anziani; il tessuto fibroso invece aumenta sia nella ARVC che nella CMP dilatativa. Questo studio conferma che non è utile ai fini diagnostici istologici eseguire biopsie a livello del setto e del ventricolo sinistro. La rilevanza della problematica relativa ai cut-off istomorfometrici nella diagnosi di CMP aritmogena è confermata dal dibattito presente nella letteratura più recente²⁵.

Cardiomiopatia amiloidotica

Breve descrizione della patologia

L'amiloidosi è un disordine del metabolismo proteico, ca-

ratterizzato dalla deposizione extracellulare di una sostanza con caratteristiche istologiche, tintoriali, ottiche e fisiche determinate da una particolare configurazione della sua componente principale, denominata componente maggiore o fibrillare¹³⁴, che ne rappresenta la parte preponderante. Le componenti fibrillari, indipendentemente dalla loro composizione chimica^{134,135}, sono costituite da catene polipeptidiche dotate di *cross-β pattern*, disposte in foglietti ripiegati secondo piani antiparalleli di tipo b, perpendicolari all'asse lungo delle fibrille stesse ("β-fibrillosi"), e sono state chimicamente distinte in alcune classi maggiori. A queste si associano altre componenti dette "minori", che costituiscono il 10% circa della sostanza amiloide, la più importante delle quali è la componente P o "proteina AP", comune a tutti i tipi di amiloide^{136,137}.

Attualmente, per la classificazione dell'amiloidosi, ci si attiene alle raccomandazioni formulate nel 1998 dalla Commissione Internazionale per la Nomenclatura dell'Amiloidosi¹³⁸.

Amiloidosi cardiaca

Pur essendo l'amiloidosi una condizione patologica rara, l'interessamento cardiaco in corso di varie forme sistemiche o localizzate rappresenta un'eventualità frequente ed il principale fattore predittivo di prognosi sfavorevole^{91,139,140}. Le forme di amiloidosi cardiaca sistemiche più frequenti e clinicamente rilevanti sono due:

1. *l'amiloidosi AL*, forma di amiloidosi sistemica secondaria, associata a disordini linfoproliferativi, in cui la componente fibrillare è rappresentata dalle catene leggere κ e λ delle immunoglobuline e, più raramente, da frammenti di catene pesanti. Si distinguono una "varietà associata a mieloma o a disordini linfoproliferativi B" ed una "varietà primitiva", nella quale non risulta eviden-

te una neoplasia plasmacellulare o è presente una discrasia plasmacellulare occulta;

2. *l'amiloidosi sistemica da deposizione di transtiretina* (TTR), proteina di trasporto sintetizzata in massima parte dal fegato, nelle sue varianti *wild-type* non mutata (amiloidosi sistemica senile) o mutata (ATTR):

a) la forma ereditaria (ATTR) è causata da mutazioni del gene che codifica per la molecola della TTR. La stragrande maggioranza dei casi è affetta dalla mutazione Val30Met, responsabile di un quadro clinico caratterizzato dalla neuropatia e da un'eventuale CMP ad esordio successivo; in presenza di altre mutazioni (più spesso Glu89Gln, Gly47Ala, Phe64Leu, Ile68Leu, Ser23Asn), il cuore è talvolta l'organo più precocemente o severamente coinvolto;

b) *l'amiloidosi cardiaca senile*, la cui componente fibrillare è costituita dalla TTR non mutata, può essere di tipo distrettuale-sistemico (cardiovascolare) o localizzato (amiloidosi atriale isolata).

Vanno inoltre segnalate:

1. *l'amiloidosi reattiva*, anch'essa sistemica;
2. *l'amiloidosi endocrina*, forma localizzata negli atri, in cui la componente maggiore è in genere costituita dal peptide natriuretico atriale e da quello cerebrale. Una forma particolare di amiloidosi atriale si riscontra in corso di fibrillazione atriale^{141,142}: i depositi sono costituiti prevalentemente dal peptide natriuretico atriale e possono contribuire al rimodellamento morfologico degli atri.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico

Standard diagnostici

- BEM.
- Biopsia di altro tessuto o organo coinvolto in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.
- Documentata genetica molecolare nelle forme familiari TTR-correlate in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.

N.B.

- La RM con gadolinio¹⁴³ e la scintigrafia miocardica ^{99m}TcDPD (nelle ATTR)¹⁴⁴ possono contribuire in modo significativo alla diagnosi, ma non sostituiscono la BEM.
- La probabilità di negatività istologica alla biopsia del grasso periombelico o di altri organi è elevata nella CMP amiloidotica TTR-correlata, con frequente necessità di ricorso alla BEM.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico^{52-54,89,90,145}

- Fornire una diagnosi di certezza dell'interessamento miocardico (quadro istomorfologico-istochimico specifico).
- Contribuire alla diagnosi eziologica con la caratterizzazione immunoistochimica della componente fibrillare maggiore.
- Fornire una serie di ulteriori informazioni morfologiche riguardanti la sede, l'entità ed il tipo di distribuzione dei depositi, il danno miocellulare ed eventuali reazioni infiammatorie associate.
- Escludere altre patologie.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Esame istologico

- Sulle sezioni di routine colorate con ematossilina-eosina, l'amiloido si presenta come una sostanza omogenea e lievemente eosinofila, amorfa ed astrutturata, depositata in sede interstiziale extracellulare. Il riscontro di depositi con tale aspetto morfologico impone al patologo di procedere ad eseguire ulteriori colorazioni istomorfologiche ed istochimiche¹⁴⁵.

Altri parametri da rilevare:

- la localizzazione dei depositi: interstizio miocardico, endocardio, vasi,
- la modalità di aggregazione dei depositi interstiziali: nodulare sostitutiva o perimiocitaria,
- le alterazioni delle miocellule: ipertrofia, atrofia, vacuolizzazione sarcoplasmatica, compressione, assottigliamento, frammentazione,
- la presenza o meno di fibrosi,
- la presenza o meno di associati infiltrati infiammatori.

Colorazioni istomorfologiche ed istochimiche

- **Rosso congo**: è la colorazione universalmente riconosciuta come diagnostica per evidenziare i depositi di amiloide, sia che si faccia riferimento alle metodiche originali^{146,147}, che a quelle di più recente introduzione¹⁴⁸: grazie, infatti, alle proprietà fisico-chimiche dell'amiloido (conformazione a "foglietto ripiegato di tipo β "), che conferiscono proprietà polaroscopiche alle fibrille, le molecole del colorante si legano a questa in ordine parallelo ed in modo regolare, determinando una caratteristica birifrangenza verde mela all'osservazione con luce polarizzata.
- **Altre colorazioni per evidenziare i depositi (meno utilizzate)**: cristal-violetto o metil-violetto, tioflavina S o T e Alcian blu solfato. Fra queste, quella dotata di maggiore sensibilità è l'Alcian blu solfato.
- **Tricromica di Azan Mallory**: per differenziare i depositi di amiloide di colore grigio-azzurro dalla fibrosi, che risulta di colore blu brillante.

Quantificazione morfometrica

Indagini morfometriche computerizzate possono essere utili per valutare quantitativamente i depositi di amiloide.

Indagini immunoistochimiche

La caratterizzazione immunoistochimica dell'amiloido rappresenta oggi un metodo poco costoso e di facile applicazione per fornire informazioni sulla componente fibrillare maggiore presente nei depositi⁵²⁻⁵⁴.

Pannello minimo di anticorpi da utilizzare nell'amiloidosi cardiaca

- Catene κ e λ delle immunoglobuline.
- Transtiretina.
- Proteina sierica circolante (*serum amyloid A*).
- Peptide natriuretico atriale.
- Apolipoproteina A1.

Indagini molecolari

Nei casi in cui i risultati delle indagini immunoistochimiche risultino particolarmente dubbi nella definizione della componente fibrillare maggiore dell'amiloide, è stato proposto il ricorso all'analisi in *Western blotting*⁵², a nostro avviso difficilmente realizzabile per le piccole dimensioni dei frustoli biotici.

Indagini genetiche

Ricerca delle mutazioni nelle forme genetiche.

Esame ultrastrutturale

L'amiloide si presenta sotto forma di fibrille singole lineari non ramificate, disposte in modo irregolare l'una rispetto all'altra, di 7-10 nm di diametro e di lunghezza indefinita e non costante⁵⁴. L'immunomicroscopia elettronica (reazioni immunoistochimiche effettuate mediante *immunogold* su sezioni ultrafini) può fornire un contributo, spesso dirimente, alla caratterizzazione della componente fibrillare maggiore dell'amiloide¹⁴⁹.

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Il caratteristico aspetto istologico dell'amiloide.
- La birifrangenza verde mela all'osservazione in luce polarizzata della colorazione istochimica rosso congo.
- L'entità e la localizzazione dei depositi.
- La caratterizzazione immunoistochimica.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Alterazioni miocitarie.
- Fibrosi.
- Infiltrati infiammatori reattivi.

Nella Figura 6, sono illustrate le caratteristiche istologiche, istochimiche, immunoistochimiche ed ultrastrutturali dei depositi di amiloide, in un caso di amiloidosi sistemica familiare TTR-correlata (mutazione Glu89Gln).

Considerazioni ed annotazioni particolari

L'iter diagnostico anatomico-patologico dell'amiloidosi è complesso e delicato e, proprio per alcune problematiche legate alla composizione stessa della sostanza amiloide, non può prescindere da una particolare accuratezza e rigore metodologica nell'espletamento delle colorazioni istomorfologiche, istochimiche ed immunoistochimiche.

In particolare:

- colorazioni istochimiche: a causa della notevole variabilità di intensità della birifrangenza verde con la colorazione rosso congo, è spesso necessario ripetere la colorazione su sezioni di differente spessore.
- indagini immunoistochimiche: l'attendibilità dei risultati dipende strettamente da:
 - applicazione di una metodologia rigorosa,
 - uso di anticorpi specifici e sensibili,
 - tipo di fissazione del tessuto: il tessuto fissato in for-

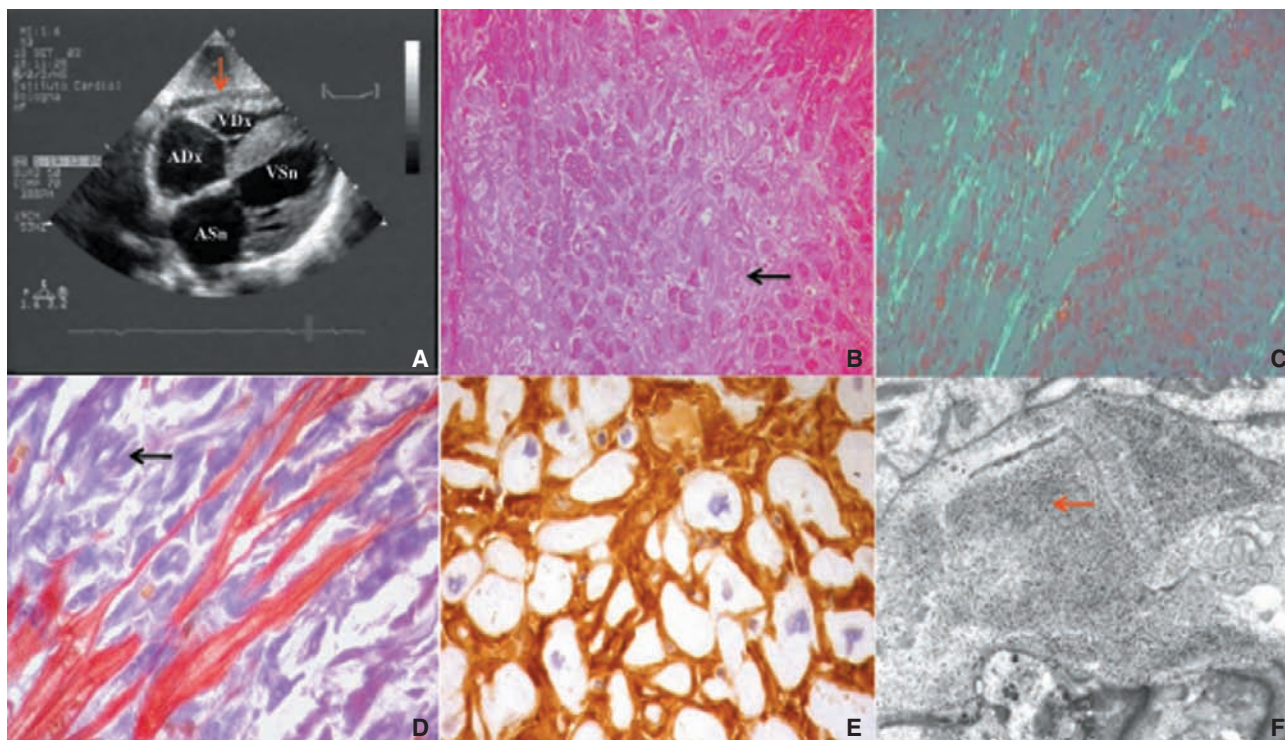


Figura 6. Amiloidosi sistemica familiare transtiretina-correlata (mutazione: Glu89Gln) in maschio di 41 anni. A: ecocardiogramma bidimensionale con approccio sottocostale; è presente un marcato aumento di spessore del setto interventricolare, della parete libera del ventricolo destro e del setto interatriale. Coesiste un lieve versamento pericardico (freccia). ADx = atrio destro; ASn = atrio sinistro; VDx = ventricolo destro; VSn = ventricolo sinistro. B: istologia; biopsia endomiocardica che mostra diffusi depositi interstiziali perimiocitari di amiloide. Sulle sezioni di routine in ematossilina-eosina (200×), l'amiloide ha l'aspetto di una sostanza omogenea ed eosinofila, amorfa ed astrukturata (freccia). C: la colorazione istochimica rosso congo (200×) evidenzia la tipica birifrangenza verde mela dei depositi all'osservazione con luce polarizzata. D: la tricromica di Azan-Mallory (400×) colora i depositi di amiloide in grigio-azzurro (freccia) e rende agevole il riconoscimento delle miocellule di colore rosso vivo, che risultano assottigliate, compresse e frammentate. E: immunoistochimica; i depositi di amiloide mostrano una positività diffusa ed intensa di colore marrone per l'anticorpo antitransiretina (400×). F: reazione immunoistochimica ultrastrutturale su sezioni ultrafini, in cui le fibrille di amiloide extracellulari sono specificamente marcate (freccia) dall'anticorpo antitransiretina (7000×).

malina ed incluso in paraffina sembra essere più adatto di quello congelato, in quanto, essendo caratterizzato da una maggiore stabilità degli epitopi antigenici, influenza favorevolmente la specificità della reazione⁵².

I risultati contraddittori riportati in letteratura sulla caratterizzazione immunoistochimica dell'amiloide ed, in particolare, sull'utilizzo di anticorpi commerciali^{54-56,150-152} hanno determinato un uso routinario limitato di tali indagini. Per interpretare in modo attendibile i risultati della caratterizzazione immunoistochimica, bisogna saper valutare criticamente 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 ed al tessuto in esame,
- l'eventuale contemporanea positività immunoistochimica di più di un anticorpo in uno stesso tipo di amiloide, fenomeno piuttosto frequente, che causa un equivoco pattern di marcatura dei depositi, con conseguenti difficoltà interpretative o un'effettiva impossibilità di definire con tali indagini la natura delle fibrille⁵².

In letteratura, i pareri sulla reale affidabilità delle indagini immunoistochimiche rimangono discordi¹⁵³⁻¹⁵⁷, per quanto gli studi che si riferiscono esclusivamente a casi di amiloidosi cardiaca siano scarsi. In uno studio recente (Leone et al., dati non pubblicati), condotto su una casistica biotipica di amiloidosi cardiache AL e TTR-relate, sono state riportate un'elevata sensibilità (90%) ed una bassa specificità (36%) delle indagini immunoistochimiche nella definizione della componente fibrillare maggiore dei depositi di amiloide. In conclusione, per quanto la diagnosi eziologica dell'amiloidosi non possa essere formulata sulla base delle sole indagini immunoistochimiche, è importante che queste vengano routinariamente incluse nel protocollo anatomo-patologico, in quanto possono apportare un contributo significativo nei casi di più complessa interpretazione.

Cardiomiopatie da accumulo

Malattie da accumulo di glicogeno

Breve descrizione della patologia

Le malattie da accumulo di glicogeno che più frequentemente coinvolgono il cuore sono il risultato di difetti genici e di enzimi coinvolti nel metabolismo del glicogeno. Le patologie più note sono la glicogenosi di tipo II (malattia di Pompe), dovuta a deficit dell' α -1,4-glucosidasi (maltasi acida), quella di tipo III (malattia di Cori), causata da deficit dell'enzima amilo-1,6-glucosidasi deramificato, e la glicogenosi di tipo IV (malattia di Andersen), in cui è implicato il deficit dell'enzima α -1,4-glucan-6-glucosil transferasi ramificato. Queste malattie hanno trasmissione autosomica recessiva e si manifestano con l'accumulo di glicogeno in vari tessuti. A livello cardiaco, si presentano con quadri prevalentemente ipertrofico-restrittivi, con possibile evoluzione terminale di tipo dilatativo-ipocinetico^{114,115,158}.

Recentemente, le mutazioni di due geni che codificano per proteine non sarcomeriche sono state individuate come causa di cardiomiopatie, che si esprimono fenotipicamente con accumulo di glicogeno e possono simulare clinicamente il quadro della CMP ipertrofica da mutazioni delle proteine sarcomeriche. Si tratta del gene che codifica per la subunità regolatoria α_2 della AMP-proteinchinasi attivata (PRKAG2) e del gene che codifica per la proteina 2 associata alla membrana lisosomiale (LAMP-2)^{115,159,160}. PRKAG2 è un enzima che modula la captazione del glucosio e la glicolisi: mutazioni di PRKAG2 inducono la formazione di vacuoli intramitocitari che contengono granuli associati a glicogeno. Le mutazioni di LAMP-2 causano tipicamente la malattia di Danon o pseudoglicogenosi di tipo II, condizione patologica multisistemica da accumulo di glicogeno, che può presentarsi anche come CMP primitiva con gradi massivi di ipertrofia del ventricolo sinistro, simulando la CMP ipertrofica¹⁶¹: questa malattia non è di fatto una vera glicogenosi, in quanto l'alterazione genica e quindi metabolica non è correlata ad un difetto di enzimi del metabolismo del glicogeno, ma piuttosto ad un difetto della membrana lisosomiale; il termine "accumulo di glicogeno" rimane, quindi, provvisorio ed è dovuto al fatto che l'epifenomeno istologico del difetto di membrana può tradursi nell'evidenza di accumulo di glicogeno.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico della patologia cardiaca

Standard diagnostici

- BEM.
- Biopsia di altri organi o tessuti (fegato, muscolo scheletrico periferico) in presenza di quadro clinico cardiologico congruente o indicativo.
- Documentata genetica molecolare in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente o indicativo.
- Alterazione enzimatica plasmatica in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente o indicativo.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

- Confermare la presenza dell'interessamento miocardico della patologia sistemica nei casi controversi.
- Confermare, in presenza di indagini genetiche positive, le alterazioni miocardiche ed indicarne l'estensione nelle forme ad esclusivo interessamento miocardico.
- Porre il sospetto diagnostico di patologia da accumulo di glicogeno nei casi di diagnosi clinica generica di CMP ipertrofica, indirizzando le successive indagini enzimatiche e molecolari.
- Escludere altre patologie.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Annotazioni tecniche particolari

- Un frammento biotipico a fresco, da fissare in alcool assoluto, per effettuare le colorazioni istochimiche per i glucidi [acido periodico di Schiff (PAS), PAS-diasiasi].
- Un frammento biotipico per l'esame ultrastrutturale.

Esame istologico

Sulle sezioni di routine colorate con ematossilina-eosina, si osserva una marcata vacuolizzazione nelle aree centrali dei miociti, dovuta ai massivi depositi di glicogeno, che dislocano le miofibrille alla periferia¹⁵⁸ (Figura 7A e 7B). Nella malattia di Danon, la vacuolizzazione sarcoplasmatica miocellulare può essere in alcuni casi molto estesa, ma in altri è limitata o addirittura assente, specie se i campioni biotici sono in numero non adeguato o di dimensioni non sufficientemente rappresentative.

Colorazioni istochimiche

Con la colorazione istochimica con PAS, effettuata su frammenti a fresco dopo fissazione in alcool assoluto per preservare il glicogeno, i depositi si colorano in rosso porpora/violetto (Figura 7C e 7D), colorazione che scompare dopo digestione diastasi (PAS-diastasi)^{94,102,162}. È sempre utile effettuare tali colorazioni anche sulle sezioni paraffinate, in quanto nelle forme avanzate della malattia, i reperti descritti possono essere evidenziati anche su tale materiale, consentendo una più adeguata valutazione complessiva.

Quantificazione morfometrica

Non è necessaria ai fini diagnostici. Può essere utile nelle glicogenosi per le quali esiste terapia enzimatica sostitutiva, per inquadrare l'estensione del coinvolgimento miocardico, soprattutto se si prevede una biopsia di controllo durante il trattamento.

Indagini genetiche

Svolgono un ruolo diagnostico, possono essere espletate su campioni di sangue periferico e consentire l'identificazione delle mutazioni causali. Spesso sono più rapide e conclusive di quelle bioenzimatiche.

Esame ultrastrutturale

L'alterazione ultrastrutturale caratteristica è costituita da accumuli intrasarcoplasmatici di glicogeno, sia sotto forma di granuli morfologicamente normali (tipi II e III), che come aggregati anomali fortemente basofili di fibrille di 5-6 nm di diametro, come nella glicogenosi di tipo IV¹⁵⁸. Nella malattia di Danon, i reperti ultrastrutturali sono variabili: sono stati descritti vacuoli sarcoplasmatici vuoti e non circondati da membrana; inclusioni non circondate da membrana contenenti materiale amorfo osmiofilo e/o materiale granulare di densità variabile; inusuali vacuoli autofagici, corrispondenti ad accumuli di lisosomi circondati da membrane contenenti proteine sarcolemali.

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Marcata vacuolizzazione sarcoplasmatica dei miociti.
- Depositati di glicogeno di colore rosso porpora/violetto con la colorazione istochimica PAS.
- Caratteristico aspetto ultrastrutturale dei granuli e aggregati di glicogeno.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Alterazioni miocitarie secondarie.
- Eventuale fibrosi.

Malattia di Anderson-Fabry

Breve descrizione della patologia

La malattia di Anderson-Fabry è una malattia con trasmissione legata al cromosoma X, causata dalla deficienza dell' α -galattosidasi A lisosomiale, cui consegue l'accumulo intracellulare di glicosfingolipidi (in particolare di ceramide triossido), soprattutto nella cute, nella cornea, nei reni e nel cuore^{158,163}. Pur essendo ritenuta una malattia *X-linked* recessiva, di fatto è espressa anche nel genere femminile, spesso con fenotipo cardiomiopatico emergente in età adulta.

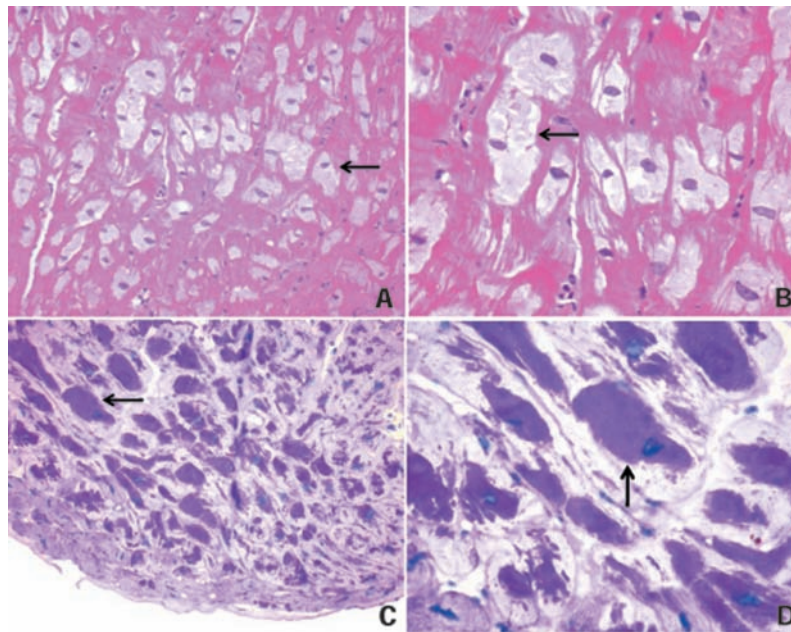


Figura 7. Glicogenosi cardiaca in maschio di 42 anni. A-B: la biopsia endomiocardica in ematossilina-eosina evidenzia una diffusa e marcata vacuolizzazione dei miociti (freccie); C-D: la colorazione PAS evidenzia i depositi intramiocitari di glicogeno in rosso porpora/violetto (freccie) (A, 200 $\times$; B, 400 $\times$; C, 200 $\times$; D, 400 $\times$).

Può essere difficile differenziare tale patologia da altre cause di ipertrofia ventricolare, la CMP ipertrofica o la cardiopatia ipertensiva¹⁶⁴; in letteratura, viene riportato che la malattia di Anderson-Fabry è stata diagnosticata mediante BEM nel 3% dei pazienti con ipertrofia cardiaca inspiegata^{164,165}.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico della patologia cardiaca Standard diagnostici

- BEM.
- Biopsia di altri organi o tessuti (rene, cute su angiocheratomi tipici), con associato studio ultrastrutturale, in presenza di quadro clinico cardiologico congruente.
- Documentata genetica molecolare in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.
- Dosaggio plasmatico dell' α -galattosidasi A (non dirimente nella femmina) in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

- Fornire una diagnosi di certezza dell'interessamento miocardico ed eventualmente indicarne l'estensione, soprattutto nei casi in cui si intenda intraprendere terapia enzimatica sostitutiva e controllarne a distanza gli effetti sugli accumuli intramiocitari.
- Far nascere, in assenza di sospetto clinico, il concreto sospetto diagnostico, indirizzando le successive indagini biochimiche e molecolari.
- Escludere altre patologie.

La diagnosi anatomico-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento
Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Annotazioni tecniche particolari

- Un frammento biotipico a fresco, da fissare in alcool assoluto, può essere utile per effettuare le colorazioni istochimiche per i glucidi (PAS, PAS-diastasi) ed i lipidi (*Oil-red* e *Sudan-black*), anche se spesso risultano di scarso aiuto.
- Un frammento biotipico per l'esame ultrastrutturale.

Esame istologico

All'esame istologico, il miocardio mostra aspetto cosiddetto "a merletto", con vacuolizzazioni perinucleari e dislocazione degli elementi contrattili alla periferia della cellula^{166,167}.

Colorazioni istochimiche

Possono essere di ausilio, in quanto i depositi di ceramide triexoside appaiono come vacuoli birifrangenti, positivi con le colorazioni per i grassi (*Sudan-black*, *Oil red*) e con quelle per i polisaccaridi (PAS).

Quantificazione morfometrica

Può essere utile solo nel caso di monitoraggi biotipici programmati per valutare gli effetti della terapia.

Indagini biochimiche

Importanti per confermare la diagnosi evidenziando un decremento dell' α -galattosidasi A sierica. Possono non essere dirimenti nelle femmine eterozigoti per la malattia.

Indagini genetiche

Hanno valenza diagnostica e possono essere espletate su campioni di sangue periferico.

Esame ultrastrutturale

Il sospetto diagnostico viene confermato già sulle sezioni semifini e l'esame ultrastrutturale evidenzia aggregati osmiofili intralisosomiali ed extralisosomiali (nel caso i lisosomi vadano incontro a rottura rilasciando il materiale accumulato libero nel sarcoplasma) di lamelle concentriche o parallele, composte di bande alterne più dense e più chiare^{158,168,169}, reperto tipico anche se non del tutto specifico della malattia.

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Aspetto istologico "a merletto" del miocardio, con vacuolizzazioni perinucleari.
- Caratteristico aspetto ultrastrutturale degli aggregati intralisosomiali come lamelle concentriche o parallele.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Alterazioni miocitarie secondarie.
- Eventuale fibrosi.

Cardiomiopatia da accumulo di desmina

Breve descrizione della patologia

È una patologia in cui si verifica una deposizione eccessiva del filamento intermedio della desmina nel muscolo scheletrico ed in quello cardiaco, con progressivo scompenso cardiaco.

Il quadro di CMP restrittiva associata a blocco di conduzione atrioventricolare (Figura 8A e 8B) è ricorrente nei fenotipi associati ad alterazioni del gene che codifica per la desmina (DES), che causano l'accumulo intramiocitario della desmina mutata¹⁷⁰⁻¹⁷³. In letteratura vengono, inoltre, riportate mutazioni della desmina in CMP dilatative, nelle quali tuttavia non sono stati eseguiti prelievi biotipici per l'esame ultrastrutturale e per le quali non è quindi possibile affermare che il difetto genico si associ ad accumulo di desmina¹⁷⁴.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico della patologia cardiaca Standard diagnostici

- BEM.
- Biopsia muscolare scheletrica periferica in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.
- Documentata genetica molecolare per le mutazioni conosciute in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

- Fornire una diagnosi di certezza.
- Orientare l'analisi genetica.
- Escludere altre patologie.

La diagnosi anatomico-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento
Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Annotazioni tecniche particolari

- Un frammento biotipico per l'esame ultrastrutturale.

Esame istologico

Il quadro istologico è aspecifico ed è caratterizzato da fibrosi interstiziale e, talora, da lieve aumento delle dimensioni delle miocellule (Figura 8C).

Quantificazione morfometrica della fibrosi e delle dimensioni miocitarie

Indagini morfometriche computerizzate possono essere utilizzate per la valutazione quantitativa della fibrosi e delle dimensioni miocellulari.

Indagini immunoistochimiche

Le indagini immunoistochimiche con l'anticorpo antidesmina possono essere di ausilio nelle forme avanzate della malattia, in cui si possono evidenziare i depositi di desmina come masse irregolari localizzate¹⁷⁵.

Indagini genetiche

Ricerca delle mutazioni del gene *DES*.

Esame ultrastrutturale

È necessario per effettuare la diagnosi, evidenziando la presenza di depositi granulo-filamentosi intramiocitari nelle aree interfibrillari o a livello delle bande Z^{170,175} (Figura 8D). Pur non ponendo, in genere, l'aspetto ultrastrutturale di tali depositi particolari problemi interpretativi, può essere utile la conferma della natura del materiale accumulato con l'esame immunoistochimico ultrastrutturale (immunomicroscopia elettronica).

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Presenza all'esame ultrastrutturale di depositi granulo-filamentosi nelle aree interfibrillari o a livello delle bande Z, positivi con l'anticorpo anti-desmina.
- Nelle forme avanzate della malattia, ampi aggregati di desmina evidenziati con le indagini immunoistochimiche sulle sezioni istologiche.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Fibrosi interstiziale.

Emocromatosi/emosiderosi

Breve descrizione della patologia

Depositi di ferro vengono riscontrati nel miocardio in corso di emocromatosi idiopatica (familiar) e nelle emosiderosi secondarie a sovraccarico di ferro (trasfusioni multiple, assunzione con la dieta o assunzione orale farmacologica prolungata)^{93,158}, ad alterazioni della sintesi dell'emoglobina con eritropoiesi inefficace (talassemia, anemia sideroblastica) e ad epatopatia cronica¹⁷⁶.

La deposizione eccessiva di ferro si verifica, oltre che nel cuore, in diversi organi, fra cui il fegato, il pancreas e le gonadi¹⁷⁷.

Le manifestazioni cliniche sono variabili, in quanto dipendono dall'estensione del coinvolgimento miocardico: più frequentemente, il comportamento clinico è quello di una CMP dilatativa (Figura 9A); quando è associata una significa-

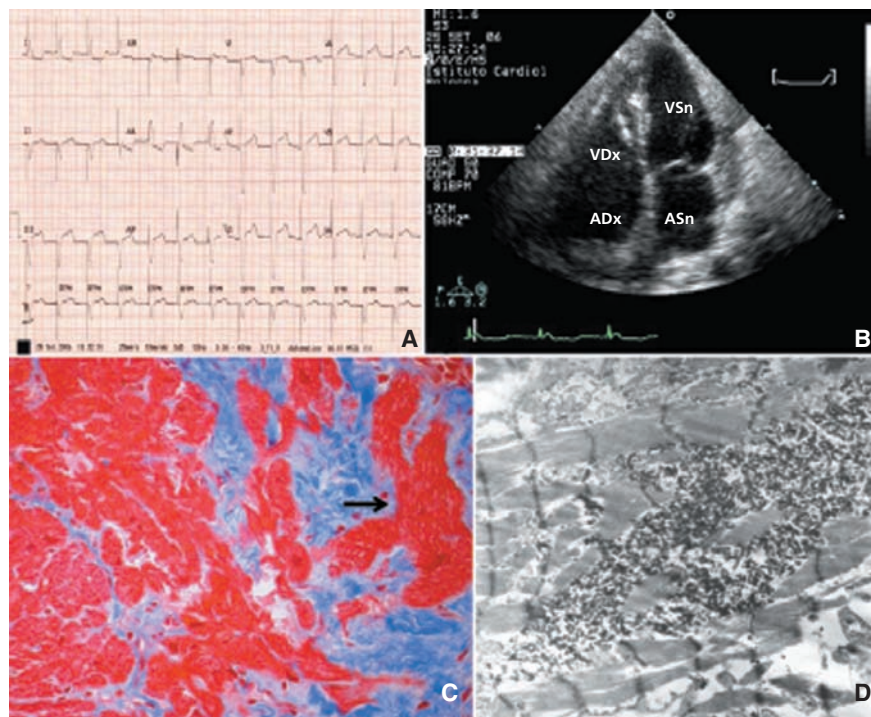


Figura 8. Donna di 50 anni affetta da cardiomiopatia da accumulo di desmina. A: ECG; è presente ritmo da pacemaker (impiantato 3 anni prima per blocco atrioventricolare completo). B: ecocardiogramma bidimensionale in sezione 4 camere; i volumi di entrambi i ventricoli appaiono normali, come pure gli spessori parietali. È presente aumento di volume biatriale, in particolare dell'atrio destro. ADx = atrio destro; ASn = atrio sinistro; VDx = ventricolo destro; VSn = ventricolo sinistro. C: biopsia endomiocardica che mostra fibrosi interstiziale (di colore blu) e focale lieve aumento delle dimensioni dei miociti (freccia) (tricromica di Azan-Mallory, 200×). D: tipico aspetto ultrastrutturale di accumulo osmiofilo granulo-filamentoso, caratteristico delle cardiomiopatie restrittive associate a difetti del gene *DES* (7000×).

tiva fibrosi, l'espressione clinico-emodinamica è di tipo restrittivo^{93,158,178}. Se la deposizione di ferro nel miocardio è massiva si manifesta solitamente lo scompenso cardiaco⁹³.

Nel miocardio, l'accumulo di emosiderina e ferritina si localizza all'interno dei miociti e, quando i depositi sono istologicamente documentabili in tale sede, sono sempre presenti anche all'interno di altri organi (fegato, milza, pancreas, midollo osseo, ecc.). Nelle fasi precoci, i depositi sono localizzati in sede perinucleare e sono costituiti prevalentemente da ferritina; negli stadi più avanzati della malattia, si estendono progressivamente all'intero sarcoplasma miocitario e sono costituiti in maggiore quantità da emosiderina. L'accumulo causa un danno cellulare e, successivamente, la formazione di fibrosi interstiziale.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico della patologia cardiaca

Standard diagnostici dell'emocromatosi

- BEM.
- Biopsia di altro organo in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.
- Documentata genetica molecolare in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.

Standard diagnostici dell'emosiderosi

- BEM.

N.B.: La RM può contribuire a generare un forte sospetto diagnostico.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico^{3,93,179}

- Fornire la diagnosi di certezza dell'interessamento miocardico.

- Formulare un *grading* del coinvolgimento cardiaco.
- Valutare l'entità della compromissione morfologica dei miociti.
- Individuare, eventualmente, l'espressione delle isoferitine H ed L.
- Escludere altre patologie.

Non è possibile discriminare, sulla base del quadro istopatologico, l'emocromatosi idiopatica dalle forme secondarie.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Esame istologico

Nelle sezioni colorate con ematossilina-eosina, i depositi granulari di emosiderina intramiocitari appaiono elettronlucidi e di colore brunoastro (Figura 9B e 9C).

Colorazioni istochimiche

La conferma diagnostica definitiva è fornita dalla colorazione istochimica blu di Prussia (*Perls*), con la quale i depositi si colorano in blu su campo rosa (Figura 9D). L'accumulo di ferro nel miocardio si esprime morfologicamente in varie forme³:

- depositi granulari scarsi e di grosse dimensioni sparsi nel sarcoplasma, cui corrispondono ampie aree positive in blu,
- depositi granulari fini e numerosi peri- o paranucleari, che formano piccoli aggregati positivi in blu,
- depositi granulari grossi e numerosi, sia paranucleari che diffusi a tutto il sarcoplasma.

La diagnosi istologica ha anche il ruolo di fornire una

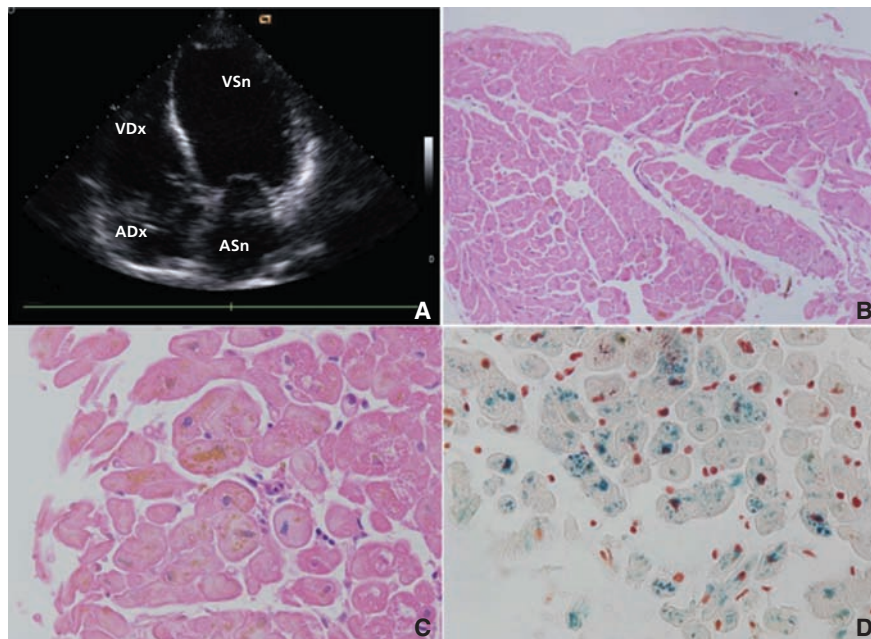


Figura 9. Emocromatosi in maschio di 60 anni con insorgenza improvvisa di scompenso cardiaco intrattabile. A: ecocardiogramma bidimensionale in sezione 4 camere. Marcata dilatazione ventricolare sinistra (con ipocinesia globale nelle immagini in movimento). ADx = atrio destro; ASn = atrio sinistro; VDx = ventricolo destro; VSn = ventricolo sinistro. B, C: la biopsia endomiocardica mostra numerosi granuli intracitoplasmatici nei cardiomiociti (ematossilina-eosina: B, 100 $\times$; C, 600 $\times$). D: la colorazione speciale per il ferro evidenzia in blu i granuli intracitoplasmatici (blu di *Perls*, 400 $\times$).

gradazione dei depositi di ferro¹⁷⁹, analoga a quella eseguita nel fegato¹⁸⁰:

- grado 0: assenza di depositi Perls positivi,
- grado 1: depositi positivi nel 25% dei miociti,
- grado 2: depositi positivi nel 25%-50% dei miociti,
- grado 3: depositi positivi nel 50%-75% dei miociti,
- grado 4: depositi positivi in più del 75% dei miociti.

Indagini immunoistochimiche

È possibile anche effettuare lo studio immunoistochimico, utilizzando anticorpi specifici diretti contro le ferritine H ed L, per riconoscere le subunità prevalentemente espresse nelle forme idiopatiche e nelle forme secondarie³.

Indagini genetiche

Ricerca delle mutazioni nelle forme genetiche.

Esame ultrastrutturale

L'accumulo marziale si evidenzia sotto forma di "granulazioni" elettrodense delimitate da una membrana che, spesso, appare discontinua.

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Presenza dei depositi granulari Perls positivi intramiocitari.
- Gradazione dei depositi di ferro.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Alterazioni miocitarie.
- Fibrosi.

Considerazioni ed annotazioni particolari

Poiché i depositi possono avere una distribuzione focale, è consigliabile effettuare sezioni istologiche multiple per minimizzare eventuali errori di campionamento^{162,181}; quando i depositi sono più diffusi, coinvolgono la maggior parte del tessuto miocardico.

La colorazione istochimica per il ferro è raccomandata in tutte le BEM di pazienti con disfunzione cardiaca idiopatica⁹²; l'attendibilità diagnostica della BEM è maggiore quando viene eseguita in pazienti con funzione sistolica ventricolare sinistra depressa.

Nei pazienti con talassemia maggiore, è stata dimostrata una correlazione significativa fra la ferritina del siero e il grado di ferro presente nella BEM¹⁸².

Cardiomiopatie associate a distrofinopatie

Breve descrizione della patologia

Le distrofinopatie sono dovute a difetti del gene che codifica per la distrofina, localizzato sul braccio corto del cromosoma Xp21.1, e comprendono le forme alleliche della distrofia muscolare (DM) di Duchenne e della DM di Becker e le CMP dilatative *X-linked*¹⁸³⁻¹⁸⁵.

La molecola della distrofina, proteina del citoscheletro di membrana associata a numerose altre proteine sarcolemmali, sembra intervenire nella stabilizzazione della membrana delle cellule muscolari durante la contrazione¹⁸⁶. Questo ipotetico ruolo di rinforzare il sarcolemma contro le forze assiali che agiscono durante la contrazione potrebbe rendere ragione della fibrosi postero-basale del

ventricolo sinistro¹⁸⁷ riscontrata nei casi di DM di Duchenne: nella parete inferiore, infatti, la disposizione longitudinale delle miocellule fa sì che queste siano direttamente sollecitate dalle forze assiali, con conseguente danno miocellulare e successiva fibrosi sostitutiva.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico della patologia cardiaca

Standard diagnostici

- Documentata genetica molecolare in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.
- Biopsia muscolare scheletrica periferica in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.
- BEM in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

- Fornire con l'ausilio delle indagini immunoistochimiche una diagnosi di certezza dell'interessamento cardiaco nella DM di Duchenne (patologia che peraltro non richiede la BEM per la diagnosi) ed una diagnosi di certezza/probabilità nella DM di Becker e nella CMP *X-linked* Xp21.2 MIM 302045. In queste ultime forme, la BEM può essere l'unico strumento diagnostico capace di far nascere il sospetto, specie se non sono clinicamente conclamati altri segni che facciano sospettare una patologia legata al gene della distrofina.
- Escludere altre patologie.
- Orientare l'analisi genetica.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Esame istologico

Sulle sezioni colorate con ematossilina-eosina, possono essere presenti aree di fibrosi interstiziale sostitutiva, associate a sostituzione adiposa e fibro-adiposa del miocardio ed alterazioni morfologiche di grado variabile delle miocellule, costituite da ipertrofia, dismetria, vacuolizzazione sarcoplasmatica, nuclei di forma irregolare e miocitolisi (Figura 10)^{188,189}.

Colorazioni istomorfologiche

Tricromica di Azan-Mallory o di Masson per la fibrosi.

Indagini immunoistochimiche

Le colorazioni immunoistochimiche sono ottimali con gli anticorpi commercialmente disponibili su sezioni criostatizzate. Gli anticorpi da utilizzare devono testare la regione C-terminale, la regione N-terminale, il *rod domain* ed il *mid rod domain*: infatti, nel caso in cui sia presente una delezione in *frame* di un singolo esone, per esempio del *rod domain*, sarà lo specifico anticorpo ad essere più informativo rispetto a quelli diretti contro i segmenti N- o C-terminale. Nel paziente affetto da DM di Duchenne, si osserva l'assenza completa dell'espressione immunoistochimica della molecola della distrofina nel sarcolemma miocitario; nella paziente portatrice di malattia di Duchenne, si rileva un caratteristico aspetto a mosaico di distribuzione della molecola, sia relativamente a miociti diversi che nello stesso miocita; nella DM di Becker, il pattern immunoistochimi-

co è più variabile, soprattutto sotto il profilo quantitativo: le alterazioni sono costituite dalla commistione di assenza completa della marcatura in alcune miocellule, di estese irregolarità e discontinuità nella distribuzione sarcolemmale e di regolare marcatura in altri gruppi di miociti. L'indagine immunoistochimica può rivelarsi utile particolarmente nei casi di DM di Becker, in quanto consente di indirizzare alle indagini genetiche pazienti in cui la malattia cardiaca si manifesta anche vari anni prima dell'evidenziarsi dei sintomi muscolari^{190,191}. L'indagine immunoistochimica è diagnostica nei casi di CMP dilatativa *X-linked* da difetti del gene della distrofina in assenza di altre manifestazioni cliniche più tipiche, come la miopatia.

Quantificazione morfometrica della fibrosi e delle dimensioni miocitarie

Indagini morfometriche computerizzate possono essere utilizzate per la valutazione quantitativa della fibrosi e delle dimensioni miocellulari.

Esame ultrastrutturale

Non è strettamente necessario per la diagnosi, ma può evidenziare le tipiche "lesioni δ ", ovvero lesioni conseguenti ad un danno di membrana e costituite da sarcomeri ipercontratti e da un'area sottostante otticamente vuota. Queste lesioni, di facile riconoscimento al microscopio elettronico nelle biopsie muscolari scheletriche, sono più difficilmente identificabili nelle BEM, per la frequente presenza di bande di contrattura da prelievo, che provocano l'ipercontrazione di gruppi di sarcomeri e l'iperdistensione for-

zata di altri gruppi, realizzando aspetti di un falso danno di membrana (Figura 11A e 11B). Per questo motivo, le lesioni δ possono fornire nel miocardio solo un contributo descrittivo alla diagnosi, ma non rappresentano un aspetto patognomonico¹⁹².

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Pattern immunoistochimico di distribuzione della molecola della distrofina nel sarcolemma miocitario.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Fibrosi ed aree di sostituzione fibro-adiposa ed adiposa del miocardio all'esame istologico.
- Alterazioni miocitarie secondarie.

Cardiomiopatie da deficit della catena respiratoria mitocondriale

Breve descrizione della patologia

Le malattie mitocondriali (CMM) sono un gruppo eterogeneo di patologie secondarie a disfunzione degli enzimi della catena respiratoria. Possono essere sporadiche o ereditarie. Le forme ereditarie possono essere trasmesse con meccanismo autosomico dominante o recessivo, o per via matrilineare. Interessano principalmente i tessuti ad alto metabolismo energetico, quali il sistema nervoso, il muscolo cardiaco ed il muscolo scheletrico¹⁹³. Le CMP sono una manifestazione frequente di queste malattie, sia nel contesto di sindromi multisistemiche sia come sintomo unico o prevalente¹⁹⁴.

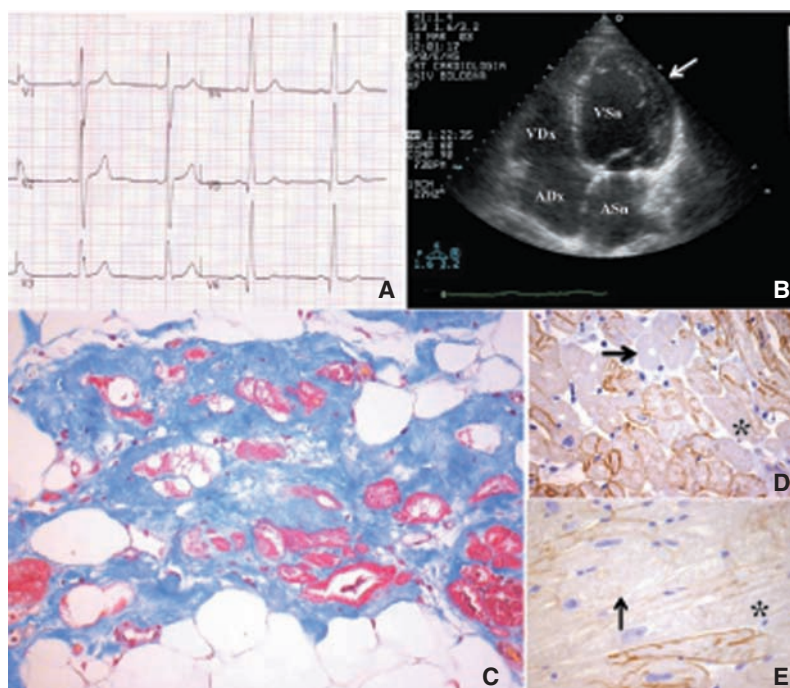


Figura 10. Maschio di 32 anni affetto da distrofia muscolare di Becker. A: ECG (sono riportate le derivazioni precordiali); è presente un aspetto a tipo pregressa necrosi infero-laterale. B: ecocardiogramma bidimensionale in sezione 4 camere; è evidente un aspetto di "non compattazione miocardica" a livello apico-laterale (freccia), nel contesto di un ventricolo sinistro dilatato (e ipocinetico nelle immagini in movimento). ADx = atrio destro; ASn = atrio sinistro; VDx = ventricolo destro; VSn = ventricolo sinistro. C: all'esame istologico, si osservano fibrosi e fibroadiposi sostitutive ed alterazioni miocitarie (atrofia e vacuolizzazione sarcoplasmatica) (tricomica di Azan-Mallory, 200 $\times$). D-E: le indagini immunoistochimiche per la molecola della distrofina evidenziano l'assenza completa della marcatura in gruppi di cardiomiociti (freccie), aspetti di discontinuità ed irregolarità nella distribuzione sarcolemmale della molecola in altri (asterischi) in associazione con una regolare marcatura in altre miocellule. D, 200 $\times$; E, 400 $\times$. Da Rapezzi et al.¹⁸⁹, modificata.

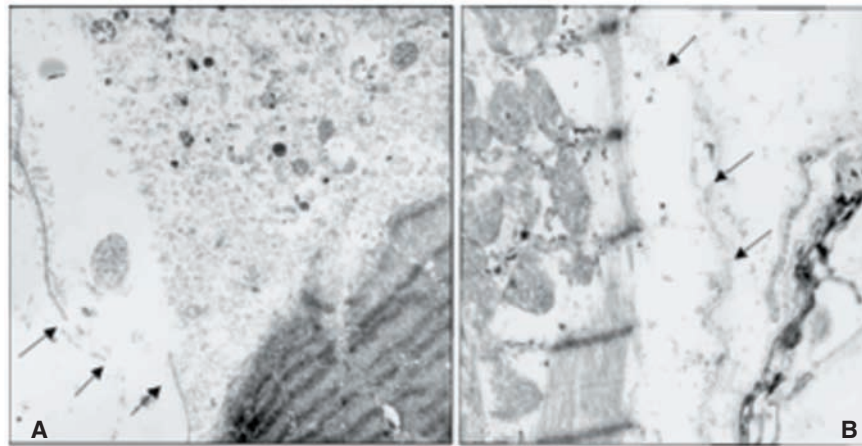


Figura 11. Esame ultrastrutturale dello stesso caso di distrofinopatia della Figura 10. A: tipico aspetto di danno della membrana sarcolemmatica con ipercontrazione dei sarcomeri in una biopsia muscolare di paziente con difetto delezionale (D45-48) del gene della distrofina (7000 $\times$). B: a livello miocardico, ove lo stato di ipercontrazione dei sarcomeri può essere associato alla procedura, le alterazioni di membrana devono essere valutate in aree in cui non vi siano bande di contrattura correlate al prelievo biotico (7000 $\times$) (in entrambe le immagini, le frecce indicano le sedi di danno di membrana più evidenti).

Sindromi multisistemiche

Tra le sindromi mitocondriali associate a CMP ricordiamo quelle secondarie a mutazioni in geni nucleari che codificano per proteine mitocondriali quali, ad esempio, le sindromi associate a deficit isolato di citocromo C ossidasi (COX)¹⁹⁵. L'interessamento cardiaco si manifesta sotto forma di CMP a fenotipo ipertrofico, con insorgenza infantile o neonatale. In particolare, in età pediatrica, un ritardo di crescita associato alla presenza di acidosi lattica e cardiomegalia deve sempre indurre il sospetto clinico di CMM¹⁹⁶. Anche le sindromi secondarie a mutazioni puntiformi o delezioni del DNA mitocondriale (mtDNA) possono associarsi ad una CMP, dilatativa o ipertrofica. Tra queste ricordiamo la MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*), la MERRF (*myoclonus epilepsy with ragged-red fibers*) e la sindrome di Kearns-Sayre¹⁹⁴.

Malattie mitocondriali isolate

Le forme isolate di CMM sono ereditate prevalentemente per via matrilineare e sono associate a mutazioni in geni per i tRNA mitocondriali (mt-tRNAs)¹⁹⁷ o in geni che codificano per subunità della catena respiratoria, quali il citocromo b (Cyt b)¹⁹⁸. Dal punto di vista clinico mostrano prevalentemente un fenotipo ipertrofico (Figura 12A) con evoluzione precoce verso la dilatazione biventricolare e lo scompenso cardiaco, anche in giovane età. Nonostante il decorso rapidamente progressivo, il riscontro di aritmie ventricolari e morte improvvisa è infrequente.

Morfologicamente, le CMM si manifestano con un'ipertrofia biventricolare simmetrica o asimmetrica non ostruttiva¹⁹⁷.

Microscopicamente, l'aumento di diametro delle miocellule si accompagna, invariabilmente, ad un aspetto vacuolizzato del citoplasma, che risulta otticamente vuoto o finemente granulare. All'ultrastruttura si osserva una marcata proliferazione di mitocondri, talora giganti, con presenza di abbondante glicogeno e gocce lipidiche, associate a perdita di miofibrille contrattili¹⁹⁹.

Biopsia muscolare scheletrica

Nel sospetto di CMM, e soprattutto nei casi associati ad un quadro miopatico, la biopsia muscolare precede quella endomiocardica nell'iter diagnostico. Il prelievo va effettuato, se possibile, da un muscolo affetto; in alternativa, vengono generalmente sottoposti a biopsia i muscoli deltoidei, quadricipite femorale o gastrocnemio, in aree lontane dall'inserzione tendinea.

Il frammento biotico va congelato in isopentano raffreddato in azoto liquido, orientandolo in modo che le fibre muscolari vengano tagliate in maniera trasversale.

La biopsia muscolare riveste un ruolo fondamentale, spesso determinante nella diagnostica delle malattie mitocondriali, permettendo di:

- formulare una diagnosi di certezza di CMM. Elementi diagnostici all'esame istologico sono le *ragged red fibers* (RRF) e la presenza di miocellule COX-negative;
- evidenziare un coinvolgimento muscolare subclinico;
- valutare l'attività dei complessi della catena respiratoria al fine di orientare l'analisi genetica;
- effettuare indagini genetiche sul DNA estratto dall'omogenato tissutale (in particolare, valutare eventuali delezioni e/o deplezione dell'mtDNA che possono sfuggire analizzando DNA estratto da sangue, valutare la percentuale di eteroplasmia);
- coltivare mioblasti e fibroblasti per analisi biochimiche e molecolari.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico

Standard diagnostici

- BEM.
- Biopsia muscolare scheletrica periferica in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.
- Documentata genetica molecolare in presenza di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

Nei casi di CMM isolata con fenotipo cardiaco ipertrofico,

sporadica od ereditaria (specie nei casi in cui non sia possibile distinguere con certezza tra un pattern di ereditarietà di tipo matrilineare ed uno autosomico), la BEM consente di:

- fornire una diagnosi probabile ed escludere altre CMP a fenotipo ipertrofico (CMP ipertrofica secondaria a mutazioni sarcomeriche, altre CMP metaboliche),
- orientare l'analisi genetica,
- effettuare indagini genetiche sull'omogenato tissutale, come riportato nel paragrafo sulla biopsia muscolare scheletrica.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Esame istologico

Sulle sezioni di routine colorate con ematossilina-eosina si osserva aumento di diametro delle miocellule associata ad aspetto vacuolato del citoplasma, che risulta otticamente vuoto o finemente granulare (Figura 12B). Non si osserva *disarray* delle miocellule. Si associa fibrosi interstiziale.

Colorazioni istomorfologiche ed istochimiche

- PAS/PAS-diasiasi: può mettere in evidenza la presenza di accumuli di glicogeno sotto forma di granuli PAS-positivi.
- Sudan nero: può evidenziare accumulo di lipidi all'interno del sarcoplasma.
- Tricromica di Azan-Mallory: utile per valutare la fibrosi, che risulta di colore blu brillante.

Colorazioni istoenzimatiche

La conferma diagnostica definitiva è fornita dalle colorazioni istoenzimatiche per la succinato deidrogenasi (SDH) e la COX.

- La colorazione per SDH risulta particolarmente intensa a livello delle miocellule che appaiono di colore blu scuro, segno, questo, di proliferazione mitocondriale.
- La colorazione per la COX può dar luogo a tre diversi pattern:
 1. Mosaico di cellule COX+ e COX-. È il quadro più frequente. Orienta per una CMM secondaria a mutazioni nel genoma mitocondriale (mt-tRNA, delezioni e/o deplezione dell'mtDNA). Le cellule COX- possono essere la maggioranza.
 2. Tutte le miocellule risultano COX- (pallide rispetto al controllo). Orienta per una CMM secondaria a mutazioni nel genoma nucleare (sindromi associate a deficit isolato di COX).
 3. Tutte le miocellule risultano COX+ (si colorano in marrone scuro come il controllo). Si riscontra in caso di CMM secondaria a mutazioni nel Cyt b o nel contesto di sindromi secondarie a disfunzione del complesso I.

È possibile eseguire una reazione istoenzimatica combinata per COX/SDH che metterà in evidenza in marrone le cellule COX+, in blu le cellule COX- (Figura 12C). La gradazione del blu è in funzione dell'entità della proliferazione mitocondriale.

Indagini immunoistochimiche

L'utilizzo di anticorpi antimitocondrio può evidenziare una proliferazione di questi organelli che si manifesta con una maggiore intensità della colorazione rispetto al normale.

Esame ultrastrutturale

All'ultrastruttura si osserva una marcata proliferazione di mitocondri, talora giganti, con presenza di abbondante glicogeno e gocce lipidiche, associate a perdita di miofibrille contrattili e disorganizzazione dei sarcomeri (Figura 12D).

Indagini genetiche

Ricerca di mutazioni, delezioni o deplezione dell'mtDNA sull'omogenato tissutale, ricerca di mutazioni di geni codificanti per componenti strutturali e funzionali dei mitocondri su omogenato tissutale o su sangue periferico.

Elementi diagnostici principali ed indispensabili

- Aspetto vacuolato delle miocellule, proliferazione mitocondriale massiva, presenza di miocellule COX-.
- In assenza di miocellule COX- la diagnosi di CMM deve essere confermata sulla base della storia clinica e delle indagini biochimiche e genetiche.

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Aumento di volume delle miocellule.
- Fibrosi interstiziale.

Considerazioni ed annotazioni particolari

Le colorazioni istoenzimatiche per COX ed SDH, Sudan nero e PAS sono raccomandate in tutti i casi di CMP con quadro istologico di diffusa vacuolizzazione miocellulare, per verificare la presenza di patologie da accumulo.

Patologia miocardica da farmaci e da sostanze chimiche/tossiche

Breve descrizione della patologia

Numerosi farmaci e l'abuso di alcune sostanze (etanolo, cocaina, eroina, steroidi anabolizzanti) possono indurre l'insorgenza di CMP che, più frequentemente, si presentano con i caratteri clinici e patologici macroscopici di una generica CMP dilatativa. L'interessamento cardiaco può manifestarsi sotto forma di disfunzione ventricolare acuta, fino allo scompenso cardiaco ed allo shock cardiogeno, o con anomalie elettrocardiografiche ed aritmie; rara la morte improvvisa aritmica. Può svilupparsi anche infarto miocardico, con un meccanismo di tipo vaso-occlusivo.

Tali sostanze agiscono sui miociti con un meccanismo di tossicità diretta, da cui la denominazione di CMP "tossiche", provocando in genere un danno cumulativo dose-dipendente^{200,201}.

In uno studio retrospettivo del 1994, il 6.5% di casi di CMP dilatativa sono stati attribuiti agli effetti tossici dei farmaci²⁰².

Nella fase del danno acuto, i quadri istopatologici sono principalmente di tre tipi:

- miocardite cosiddetta "tossica",
- miocardite da ipersensibilità,
- lesioni esclusivamente necrotiche o ischemiche.

Più raramente, il quadro infiammatorio è istologicamente indistinguibile da quello di una miocardite interstiziale linfocitaria.

Nella fase cronica, anche le alterazioni istologiche sono

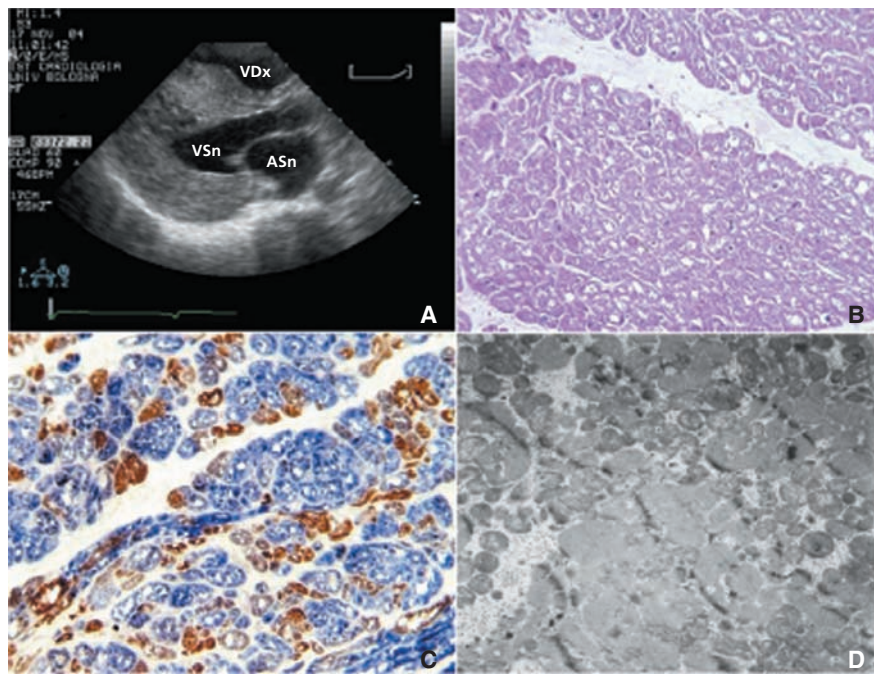


Figura 12. Donna di 38 anni affetta da cardiomiopatia secondaria a mutazione nel gene mitocondriale per il tRNA dell'isoleucina (tRNA^{Ile}). A: ecocardiogramma bidimensionale in sezione longitudinale; è presente una marcata ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro con riduzione del volume diastolico della cavità ventricolare sinistra. ASn = atrio sinistro; VDx = ventricolo destro; VSn = ventricolo sinistro. B: immagine istologica che mostra un aumento di dimensione delle miocelle ed un'estesa vacuolizzazione citoplasmatica (ematossilina-eosina, 100x). C: colorazione istoenzimatica combinata per la succinato deidrogenasi (SDH, blu) e la citocromo-ossidasi (COX, marrone). Si osserva un mosaico di fibre COX-positive (marroni) e COX-negative (blu): queste ultime risultano di un colore blu intenso poiché mantengono l'attività dell'SDH (un enzima mitocondriale codificato dal nucleo) e sono sede di marcata proliferazione mitocondriale (COX/SDH, 200x). D: immagine ultrastrutturale in cui le miofibrille appaiono dissociate per la presenza di numerosi mitocondri. Acetato di uranile e citrato di piombo (3180x).

aspecifiche e costituite da fibrosi interstiziale e alterazioni miocitarie.

Per quanto molte di queste sostanze possano causare quadri istopatologici misti, è possibile suddividerle in tre gruppi:

- farmaci e sostanze che provocano in prevalenza una miocardite cosiddetta "tossica": antracicline, 5-fluorouracile, ciclofosfamide, amfetamine, antipertensivi, catecolamine ad alte dosi esogene ed endogene (feocromocitoma) ed altri farmaci ad effetto inotropo positivo, barbiturici, istaminici, litio, fenotiazine, clozapina, teofilina, interleuchina-2, arsenico, cobalto^{203,210}.

In particolare, i farmaci del gruppo delle antracicline e la doxorubicina devono essere sottoposti ad un accurato monitoraggio a causa del loro elevato potere cardiotossico: l'effetto cardiotossico è dose-dipendente e, se viene superato il dosaggio di 550 mg/m² di superficie corporea, il 30% dei pazienti sviluppa insufficienza cardiaca. Anche dosi minori deprimono la contrattilità ventricolare e lo scompenso cardiaco può svilupparsi anche dopo 10 anni. In passato, veniva effettuato un monitoraggio biptico cardiaco^{203,204}, oggi non più necessario per la possibilità di utilizzare efficacemente un monitoraggio non invasivo (vedi Parte I).

Oltre alla miocardite tossica^{209,210}, l'interleuchina-2 può causare anche una miocardite eosinofila secondaria ad una reazione da ipersensibilità²¹¹ o l'infarto miocardico²¹²;

- farmaci che causano una miocardite da ipersensibilità:

dobutamina, sulfamidici, isoniazide, penicillina, tetraciclina, fenilbutazone, diuretici tiazidici, metildopa, cocaina, streptomina, clozapina^{213,214};

- farmaci e sostanze che provocano alterazioni di tipo ischemico: 5-fluorouracile, interleuchina-2, cisplatino, bleomicina e alcaloidi della vinca^{215,216}.

Annotazioni particolari

- Alcuni farmaci psicotropi (imipramina, amitriptilina, tiotridazina, fenotiazine, litio) possono causare esclusivamente anomalie elettrocardiografiche, aritmie o morte improvvisa²¹⁷ e, nel caso del litio, miocarditi interstiziali aspecifiche²¹⁸.
- È stato descritto un unico caso di miocardite a cellule giganti dopo assunzione di farmaci antinfiammatori non steroidei²¹⁹.
- Nei pazienti alcolisti, il rischio di sviluppare una CMP alcolica è correlato sia alla durata dell'abuso che alla suscettibilità individuale agli effetti tossici dell'alcool. Oltre a quadri di CMP dilatativa aspecifica, sono state riportate miocarditi linfocitarie o miocarditi con infiltrato misto linfocitario e granulocitario nel 30% dei casi^{220,221}.
- Nell'abuso da cocaina, Virmani et al.²²² hanno riportato un'incidenza di miocarditi del 20% all'esame *post-mortem*, con i caratteri della miocardite tossica e da ipersensibilità. La CMP dilatativa indotta dalla cocaina non è così frequente come l'ischemia miocardica²²³.

Sono state descritte lesioni analoghe anche nell'overdose da eroina²²⁴.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico

Standard diagnostici

- BEM nel contesto di quadro clinico-laboratoristico cardiologico congruente o indicativo e documentata assunzione del farmaco o della sostanza chimica.

Ruolo della biopsia endomiocardica nell'iter diagnostico

- Fornire una diagnosi probabile nelle forme di miocardite "tossica" o da ipersensibilità o una diagnosi possibile nelle forme con lesioni ischemico-necrotiche.
- Diagnosi differenziale con altre forme specifiche di cardiomiopatie infiammatorie.
- Esclusione di altre patologie.

Non consente di discriminare il tipo di sostanza causa del quadro patologico.

La diagnosi anatomico-patologica

Prelievi da effettuare e protocollo di allestimento

Vedi paragrafo dedicato nella Parte I.

Esame istologico

Nelle sezioni colorate con ematossilina-eosina, i quadri istologici possono essere di tre tipi:

- cosiddetta "miocardite tossica", caratterizzata da focolai multipli con necrosi franche o necrosi a banda dei miociti, numerose bande di contrazione e lisi miofibrillare, circondati da un infiltrato infiammatorio misto costituito da macrofagi, leucociti polimorfonucleati neutrofili e scarsi linfociti. A differenza della miocardite linfocitaria virale, l'infiltrato flogistico è tipicamente scarso e disproporzionato rispetto al danno miocellulare. In grado variabile, possono inoltre essere presenti edema e stravasi emorragici interstiziali e deposizione di fibrina. Lo stroma circostante è vitale²²⁵;
- miocardite da ipersensibilità, caratterizzata da un infiltrato infiammatorio composto da linfociti, plasmacellule, macrofagi e da una ricca componente di granulociti eosinofili, localizzato prevalentemente in sede perivascolare.

Possono essere presenti anche granulomi macrofagici. La caratteristica tipica è l'assenza di necrosi miocardica significativa e di fibrosi (Figura 13). Il processo è autolimitato con scarso danno miocardico residuo^{12,226};

- lesioni necrotico-ischemiche in assenza di infiltrato infiammatorio, che possono variare dalla necrosi coagulativa classica, alla miocitolisi, alla necrosi a banda e alle bande di contrazione, fino alla semplice presenza di edema interstiziale e stravasi emorragici²²⁷.

Nella fase cronica, le alterazioni istologiche sono aspecifiche e costituite da fibrosi interstiziale e alterazioni miocitarie (aumento di dimensioni, dismetria, vacuolizzazione e lisi miofibrillare).

Colorazioni istomorfologiche ed istoenzimatiche

- Tricromica di Azan-Mallory o di Masson per la fibrosi e la necrosi.
- COX mitocondriale, che risulta positiva nel danno da alcool²²⁸.

Quantificazione morfometrica

Indagini morfometriche computerizzate per la quantificazione della fibrosi.

Indagini immunoistochimiche

Tipizzazione dell'infiltrato infiammatorio (vedi protocollo sulle "Miocarditi"). Quando la miocardite ha i caratteri della flogosi prevalentemente linfocitaria interstiziale, ponendo il problema della diagnosi differenziale con una miocardite virale, si rendono necessarie le indagini molecolari per la ricerca dei genomi virali (vedi protocollo "Miocarditi").

Esame ultrastrutturale

Per quanto non strettamente necessario per la diagnosi, può essere utile ai fini dello studio delle alterazioni tossiche degli organelli citoplasmatici (ad es. presenza di megamitocondri).

Elementi diagnostici principali e indispensabili

- Quadri istologici di miocardite tossica e da ipersensibilità.

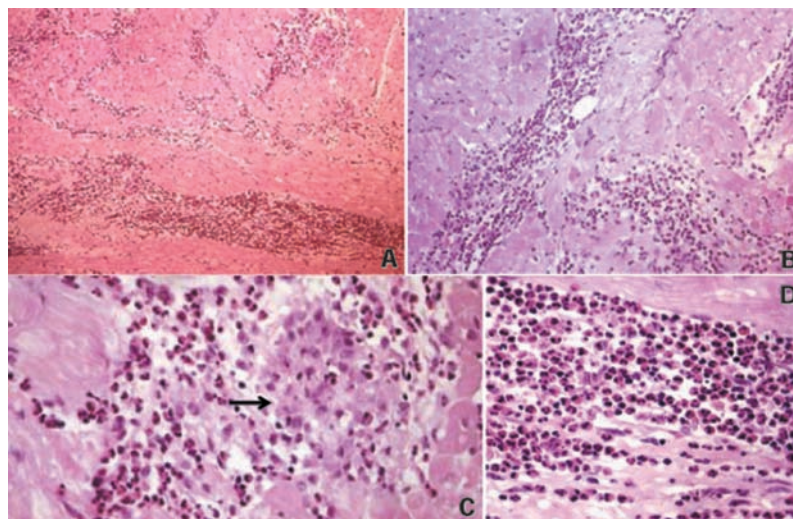


Figura 13. Miocardite da ipersensibilità in maschio di 47 anni. A-D: istologia; marcato infiltrato infiammatorio interstiziale particolarmente ricco in granulociti eosinofili e povero in linfociti. In C è evidente un granuloma macrofagico (freccia); da notare lo scarso danno miocitario associato (ematossilina-eosina: A, 100×; B, 200×; C-D, 400×).

- Lesioni necrotico-ischemiche (necrosi e miocitolisi coagulativa, necrosi a banda, bande di contrazione, edema e stravasi emorragici).

Elementi diagnostici secondari o accessori

- Alterazioni miocitarie secondarie.
- Fibrosi.

Neoplasie cardiache

Breve descrizione della patologia

Il 90% dei tumori resecati chirurgicamente sono benigni. La prevalenza autoptica delle neoplasie primitive cardiache è di circa 1 su 1000 e quella dei tumori secondari di 1 su 100 autopsie, con un rapporto tra forme secondarie e primitive di circa 10:1. I tumori primitivi cardiaci sono quindi rari, mentre le metastasi cardiache sono di gran lunga più frequenti²²⁹: il 5% circa dei pazienti deceduti per neoplasia sviluppa, infatti, localizzazione metastatica cardiaca, che è più frequentemente causata da un carcinoma polmonare, mammario, renale o da un melanoma cutaneo.

Il cuore è un organo di derivazione mesodermica e pertanto l'istogenesi dei tumori cardiaci primitivi è paragonabile, ma solo in parte, a quella dei tessuti molli. È singolare tuttavia il fatto che la maggior parte dei tumori benigni cardiaci non trovi un esatto corrispettivo istologico in sede viscerale extracardiaca; solo nel cuore è infatti possibile osservare il mixoma cardiaco, l'ipertrofia lipomatosa del setto interatriale, il fibroma cardiaco, il rabdomioma, il fibroelastoma papillare ed il tumore cistico del nodo atrio-ventricolare e ciò, ad eccezione del mixoma cardiaco, viene attribuito al fatto che alcune non sono vere e proprie entità neoplastiche²³⁰.

La maggior parte delle neoplasie cardiache primitive maligne è costituita dai sarcomi, che vengono classificati analogamente ai sarcomi dei tessuti molli²³¹. Il cuore può inoltre essere sede di linfomi primitivi^{32,97} e, ancora più raramente, di paragangliomi.

La classificazione più recente dei tumori cardiaci primitivi è quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2004²³², che riporta fondamentalmente tre gruppi: 1) tumori benigni e lesioni simil-tumorali; 2) neoplasie maligne; 3) tumori del pericardio (Tabella 8). Nell'intento di semplificare la nosografia dei sarcomi, la suddetta classificazione non menziona però istotipi importanti come lo schwannoma maligno. Per questo motivo, riteniamo quindi utile rife-

rirsi ancora alla meno recente classificazione dell'Armed Forces Institute of Pathology pubblicata nel 1996²³⁰.

Esami diagnostici e ruolo della biopsia endomiocardica nell'algoritmo diagnostico

La diagnosi di neoplasia cardiaca si basa fondamentalmente sulle tecniche di imaging, con le quali possono essere evidenziate anomalie intramurali o endocavitarie della "silhouette" cardiaca. Una volta individuata, una neoplasia può essere sottoposta ad ulteriori indagini diagnostiche di immagine, allo scopo di studiarne la precisa estensione, i rapporti con le strutture cardiache (valvole, arterie coronarie) o extracardiache, la presenza e il grado di alterazione funzionale e/o emodinamica.

Esami diagnostici

- Radiografia del torace.
- Ecocardiografia.
- Risonanza magnetica.
- Tomografia computerizzata.
- Cateterismo cardiaco.

La BEM può essere inserita in questa seconda fase diagnostica, indirizzata anche al successivo programma terapeutico²³³.

Il sempre più frequente ricorso alla BEM a partire dai primi anni '80 ha modificato in modo significativo il ruolo dell'esame anatomo-patologico nella diagnosi *in vivo* delle neoplasie primitive e secondarie del cuore, che in precedenza era limitato allo studio post-chirurgico dei prelievi escissionali. I suoi principali impieghi riguardano oggi, come in tutti gli altri campi della chirurgia oncologica, la diagnosi istologica preoperatoria e la tipizzazione delle neoplasie primitive maligne, l'individuazione e/o conferma di lesioni metastatiche di tumori solidi o di infiltrazione leucemica o linfomatosa, con la possibilità di ricorrere ad altre opzioni terapeutiche quali la chemio- e/o la radioterapia^{6,29,30,33-35,37,97-101,234}.

La diagnosi anatomo-patologica

Prelievi da effettuare

- Il maggior numero possibile di frammenti (almeno 5) della neoplasia, ciascuno delle dimensioni di 2-3 mm², che vanno immediatamente fissati in formalina tampognata al 10% per esame istologico, immunoistochimico e, più raramente, istochimico.
- Uno o due frammenti bioptici da congelare in azoto liquido (*snap freeze*) e conservare in ultrafreezer a -80°C o in container di azoto liquido per eventuali indagini molecolari.

Tabella 8. Classificazione istologica dei tumori del cuore secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (2004)²³².

Tumori benigni e lesioni simil-tumorali	Tumori maligni	Tumori pericardici
Rabdomioma	Angiosarcoma	Tumore fibroso solitario
Cardiomiopatia istiocitoide	Emangioendotelioma epitelioido	Mesotelioma maligno
Amartoma dei cardiomiociti maturi	Istiocitoma fibroso maligno pleomorfo (sarcoma pleomorfo maligno indifferenziato)	Tumore a cellule germinali
Rabdomioma cellulato dell'adulto	Rabdomiosarcoma	Tumori metastatici
Mixoma cardiaco	Leiomiomasarcoma	
Fibroelastoma papillare	Sarcoma sinoviale	
Emangioma	Liposarcoma	
Fibroma cardiaco	Linfoma primitivo cardiaco	
Tumore infiammatorio miofibroblastico	Tumori metastatici	
Lipoma		
Tumore cistico del nodo atrioventricolare		

- Un frammento fissato in glutaraldeide per eventuale esame ultrastrutturale.

Protocollo di allestimento

- Sezioni seriate delle biopsie incluse in paraffina, fino ad almeno 4-5 vetrini colorati con ematossilina-eosina.
- Sezioni bianche silanate (o su vetrini con polilisina e con carica elettrostatica), da richiedere dopo l'esame delle sezioni colorate con ematossilina-eosina, per la tipizzazione immunoistochimica.

In campo oncologico, a differenza di altri settori diagnostici, ove l'analisi di sezioni seriate della BEM è necessaria per minimizzare il *sampling error*, il materiale a disposizione va utilizzato gradualmente a seconda delle necessità dell'algoritmo diagnostico.

Esame istologico

Non è possibile entrare nei dettagli della complessa diagnostica morfologica dei vari istotipi neoplastici benigni e maligni. I criteri morfologici ed i sistemi di *grading* possono comunque essere desunti dalla classificazione OMS dei tumori dei tessuti molli e dell'osso²³¹ e dai testi di anatomia patologica dedicati all'argomento^{230,233}.

Colorazioni istomorfologiche ed istochimiche

La colorazione per il reticolo offre un concreto ausilio nella diagnosi dei tumori vascolari e del sarcoma sinoviale. L'ematossilina fosfotungstica è di discreto aiuto nella tipizzazione del rhabdomyosarcoma. Il PAS e le colorazioni usuali per le mucine possono fornire un contributo diagnostico nel sarcoma sinoviale e nei tumori mixoidi in genere.

Indagini immunoistochimiche

Numerosi sono i marcatori immunoistochimici da utilizzare nella diagnosi dei tumori maligni: i marcatori tissutali endoteliali, quali il fattore VIII, il CD34 e il CD31 nell'angiosarcoma e nell'emangioendelioma; l'actina muscolo-liscio-specifica e la desmina nel leiomyosarcoma; la proteina S-100 negli schwannomi maligni ed in alcuni casi di liposarcoma^{235,236}. La positività per l'antigene epiteliale di membrana è molto indicativa per la diagnosi del sarcoma sinoviale. Per altri istotipi come il sarcoma pleomorfo o il fibrosarcoma, non si conoscono marcatori specifici. Nel caso di sospetto linfoma primitivo cardiaco, si procede dapprima alla ricerca dell'antigene leucocitario comune (CD45) e successivamente allo studio con il CD20 per i linfomi B e con il CD3 per i linfomi T²³⁷.

Anticorpi da utilizzare

Vimentina, Fattore VIII, CD31, CD34, antigene epiteliale di membrana, citocheratine ad ampio spettro, proteina S100, actina muscolo-liscio, desmina, miogenina, CD45, CD20, CD3 ed HMB45. In futuro, potranno essere utilizzati anche alcuni fattori di trascrizione come il WT-1 e l'LFI-1²³⁶. In alcune neoplasie benigne, nelle quali il quadro istologico è di per sé diagnostico, le indagini immunoistochimiche vengono effettuate a scopi di sola ricerca.

Indagini genetiche

Sono oramai note numerose alterazioni cromosomiche non casuali, in special modo traslocazioni, che si associano ad alcuni tumori dei tessuti molli: ad esempio, la trasloca-

zione X:18 per il sarcoma sinoviale o la mutazione dell'esone 1 del K-ras per il rhabdomyosarcoma. La rarità dei tumori cardiaci non consente tuttavia di disporre di un numero sufficiente di dati.

Esame ultrastrutturale

Può essere utile nelle neoplasie più indifferenziate per la diagnosi di istotipo.

Nella Figura 14 è riportato un caso di angiosarcoma primitivo cardiaco²⁹ e nella Figura 15 un caso di linfoma cardiaco metastatico³¹.

Considerazioni ed annotazioni particolari

Nelle lesioni neoplastiche endocavitari del cuore, la BEM rappresenta un'opzione valida quanto altre procedure interventistiche. Infatti:

- la diagnosi di "massa cardiaca" effettuata con le metodiche non invasive viene caratterizzata con certezza come neoplastica e tipizzata nel suo istotipo grazie alla BEM;
- la diagnosi anatomo-patologica è spesso importante per le successive opzioni terapeutiche (ad es. di tipo medico o chirurgico).

I limiti della BEM in campo diagnostico oncologico consistono fondamentalmente nel fatto che l'indagine può essere utilizzata con relativo successo solo nelle neoplasie endocavitari e, routinariamente, nelle neoplasie delle sezioni destre del cuore.

Trapianto cardiaco

Ruolo della biopsia endomiocardica nel monitoraggio del paziente trapiantato

La BEM rimane il metodo più affidabile per identificare la presenza, il tipo ed il grado di rigetto, monitorando i risultati della terapia immunosoppressiva e contribuendo alla differenziazione del rigetto da altre patologie post-trapianto, che richiedono trattamenti specifici diversificati, come nel caso delle infezioni, dei processi linfoproliferativi e della vasculopatia del graft. Va ricordato che la biopsia di monitoraggio post-trapianto va eseguita ad intervalli regolari, secondo uno schema standardizzato, perché il riscontro istologico di rigetto precede usualmente i segni ed i sintomi clinici.

Il protocollo di monitoraggio biopsico routinario maggiormente seguito nel primo anno post-trapianto, è il seguente:

- 1 BEM alla settimana nel primo mese,
- 1 BEM ogni 2 settimane nel secondo e terzo mese,
- 1 BEM al mese dal quarto mese fino al sesto/nono,
- 1 BEM ogni 2 mesi dal sesto/nono al dodicesimo.

Dopo il primo anno, lo schema di sorveglianza biopsica è soggetto ad una maggiore variabilità nei diversi Centri di trapianto.

In aggiunta ai controlli programmati, la BEM viene eseguita ogni volta che si evidenziano segni e sintomi suggestivi di rigetto acuto o di altre patologie, prevalentemente di tipo infettivo.

Al momento attuale, nessun altro test di laboratorio o di imaging si è dimostrato in grado di fornire indicazioni così attendibili ed utili come quelle della BEM nel trattamento del paziente trapiantato di cuore.

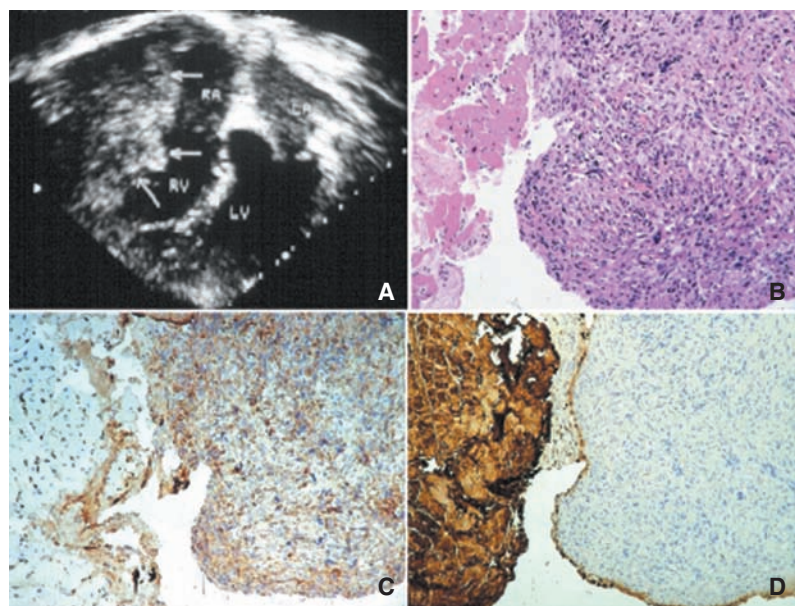


Figura 14. Donna di 36 anni affetta da angiosarcoma primitivo del cuore. A: ecocardiogramma transtoracico (sezione 4 camere); si nota la presenza di una massa endocavitaria a profili irregolari (freccie) sia a livello dell'atrio destro che del ventricolo destro. LA = atrio sinistro; LV = ventricolo sinistro; RA = atrio destro; RV = ventricolo destro. B: frammento di biopsia endomiocardica, in cui è evidente una diffusa proliferazione neoplastica di cellule fusate (a destra) con nuclei ipercromatici ed irregolari e tendenza a formare strutture vascolari al confine con il miocardio normale (a sinistra) (ematossilina-eosina, 40×). C: la tipizzazione immunohistochimica con il fattore VIII di von Willebrand (vWF) dimostra una diffusa positività nel tessuto neoplastico (vWF, 40×). D: la tipizzazione immunohistochimica con mioglobina dimostra una diffusa positività del miocardio, mentre il tessuto neoplastico è negativo (mioglobina, 40×).

Da Poletti et al.²⁹, modificata.

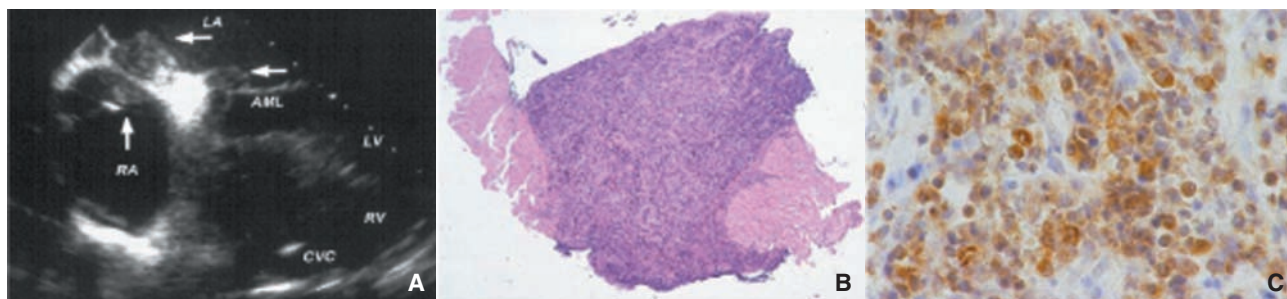


Figura 15. Linfoma cardiaco secondario in donna di 36 anni. A: ecocardiogramma transesofageo bidimensionale in sezione 4 camere. Si nota una masserella ecodensa (freccie) su entrambi i versanti del setto interatriale e sul versante atriale del lembo anteriore della mitrale (AML). È presente dilatazione atriale destra e ventricolare destra. CVC = catetere venoso centrale; LA = atrio sinistro; LV = ventricolo sinistro; RA = atrio destro; RV = ventricolo destro. B: frammento di biopsia endomiocardica. È evidente una diffusa infiltrazione neoplastica del miocardio (ematossilina-eosina, 45×). C: la tipizzazione immunohistochimica dimostra trattarsi di un linfoma a cellule T (CD3, 480×).

Da Testolin et al.³¹, modificata.

Va sottolineato che oggi, oltre alla valutazione istologica, vengono impiegate frequentemente anche indagini molecolari su tessuto per individuare la presenza di genomi virali, utili nella diagnostica differenziale con le miocarditi infettive o per determinare l'oligo- o monoclonalità delle popolazioni linfocitarie nei casi di processi linfoproliferativi.

Le entità patologiche che devono essere valutate sulla BEM sono:

- il rigetto cellulare acuto,
- il rigetto anticorpo-mediato,
- le infezioni del graft,
- i processi linfoproliferativi post-trapianto,
- la microvasculopatia del graft.

Protocollo diagnostico anatomico-patologico

Nel corso degli anni, sono stati proposti numerosi sistemi per classificare il rigetto acuto²³⁸. Nel 1990, l'International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT), oltre a proporre una classificazione istologica del rigetto acuto, si è occupata anche degli aspetti relativi alle problematiche tecniche di gestione della BEM nel paziente trapiantato²³⁹, con l'obiettivo di standardizzare le procedure, consentire la comparazione dei risultati di Centri diversi e favorire lo sviluppo di studi multicentrici.

Nel 2004, una Task Force dell'ISHLT ha aggiornato la precedente classificazione del 1990, alla luce delle esperienze maturate a livello internazionale dopo tanti anni dalla sua applicazione¹¹⁰.

Adeguatezza della biopsia endomiocardica e considerazioni tecniche

È fondamentale che la quantità di tessuto da esaminare sia adeguata: l'errore di campionamento, infatti, può essere causa di falsi negativi e determinare errori nella valutazione del *grading* del rigetto, che deve basarsi sull'individuazione nei frammenti delle alterazioni istologiche più severe e sulla distribuzione focale o diffusa dei reperti. Alcuni lavori scientifici, che hanno valutato la percentuale di falsi negativi in relazione al variare del numero dei campioni analizzati, hanno evidenziato che con una superficie di circa 6-10 mm², corrispondente a 3-5 frammenti, si registrava un rischio di falsi negativi del 5% con 3 frammenti e del 2% con 4²⁴⁰; su tale base, l'ISHLT ha individuato in 3 il numero minimo di frammenti biotipici rappresentativi¹¹⁰. Oltre al numero dei frustoli, vanno valutate le loro dimensioni che rappresentano un indicatore più attendibile della superficie media da esaminare²⁴¹: in circa il 20% delle biopsie con numero adeguato di frammenti (fra 3 e 5), la superficie complessiva del miocardio era <5.5 mm² e, quindi, non adeguata.

La diagnosi anatomico-patologica

Il rigetto miocardico acuto cellulo-mediato

I punti di maggiore criticità della classificazione del 1990, che sono stati discussi e modificati nella nuova nomenclatura del 2004, sono stati: inconsistenza (o difformità) nell'applicazione del *grading* nei vari Centri trapiantologici; il rigetto di grado 2 ed il suo significato clinico, con la nota misinterpretazione dell'effetto Quilty come rigetto di grado 2 con un solo infiltrato nodulare di linfo-monociti; le modificazioni nel tempo degli schemi di trattamento farmacologico, con l'uso di più efficaci trattamenti immunosoppressivi, che hanno portato alla riduzione del numero dei rigetti e al cambiamento della loro espressione morfologica²⁴²⁻²⁴⁵; l'individuazione di criteri diagnostici più standardizzati per il rigetto umorale anticorpo-mediato e la possibilità della sua diagnosi su materiale fissato.

Classificazione. I cardini sui quali ruota la classificazione sono il riconoscimento dell'infiltrato flogistico e la presenza di danno miocellulare. La valutazione dell'intensità dell'in-

filtrato infiammatorio si basa sulla determinazione dell'area del frammento coinvolto, sulla densità dell'infiltrato e sulla sua tendenza ad estendersi in differenti livelli di sezione. Il danno miocellulare può manifestarsi sotto forma di vacuolizzazioni citoplasmatiche e/o di sarcolisi, di aggressione delle miocellule da parte dell'infiltrato flogistico, che le circonda quasi a manicotto, fino all'apparente sostituzione dei miociti da parte della flogosi.

Il rigetto severo di grado 3R, caratterizzato dalle alterazioni più severe in termini di necrosi miocellulare e di infiltrato flogistico, dalla presenza di granulociti eosinofili e neutrofili, da edema marcato ed emorragie e da quadri di vasculite, è attualmente molto raro grazie ai moderni regimi terapeutici e richiede sempre un trattamento immunosoppressivo aggiuntivo.

Nella Tabella 9 sono riportate entrambe le classificazioni ISHLT del 1990 e del 2004 e nella Figura 16 esempi dei vari gradi di rigetto secondo le due classificazioni.

Numerose sono le lesioni istologiche che entrano in diagnosi differenziale con il rigetto cellulo-mediato:

- le infezioni opportunistiche, che di solito si associano ad un infiltrato di tipo polimorfo e non presentano un pattern di danno miocellulare molto esteso;
- le lesioni secondarie all'ischemia perioperatoria, che si associano ad un infiltrato più polimorfo e sono in genere presenti nelle primissime biopsie postoperatorie;
- i quadri istologici prodotti da precedenti siti biotipici, caratterizzati da esteso infiltrato infiammatorio, tessuto di granulazione e trombi bianchi adesi alla superficie endocardica;
- la necrosi coagulativa ischemica conseguente alla vasculopatia cronica del graft (cosiddetto rigetto cronico) che si manifesta più tardivamente, spesso a distanza di anni dal trapianto.

Nel referto va quindi sempre segnalato, oltre ai reperti imputabili al rigetto cellulo-mediato, l'eventuale presenza di danno ischemico perioperatorio, di danno ischemico tardivo²⁴⁶, di effetto Quilty²⁴⁷, di disordini linfoproliferativi post-trapianto^{248,249}, per quanto molto rari, di infezioni del graft che rendono la biopsia non classificabile⁴⁹ e la presenza di rigetto umorale^{250,251}.

Tabella 9. Classificazione del rigetto acuto cellulo-mediato dell'International Society for Heart and Lung Transplantation: comparazione fra la classificazione del 2004 e quella del 1990.

2004		1990	
Grado 0R	Assenza di rigetto	Grado 0	Assenza di rigetto
Grado 1R: Lieve	Infiltrato infiammatorio interstiziale e/o perivascolare con al massimo un focolaio di necrosi miocellulare	Grado 1: Lieve	Infiltrato infiammatorio interstiziale e/o perivascolare focale senza danno miocellulare
		1A: Focale	
		1B: Diffuso	
Grado 2R: Moderato	Due o più focolai di infiltrato infiammatorio con danno miocellulare	Grado 2: Moderato focale	Unico focolaio infiammatorio con danno miocellulare
		Grado 3A: Moderato multifocale	Infiltrato infiammatorio plurifocale con danno miocellulare
Grado 3R: Severo	Infiltrato infiammatorio diffuso con focolai multipli di danno miocellulare, edema, emorragie, vasculiti	Grado 3B: Diffuso, severo borderline	Infiltrato infiammatorio diffuso con focolai multipli di danno miocellulare, edema, emorragie e vasculiti (reperti più severi nel grado 4)
		Grado 4: Severo	

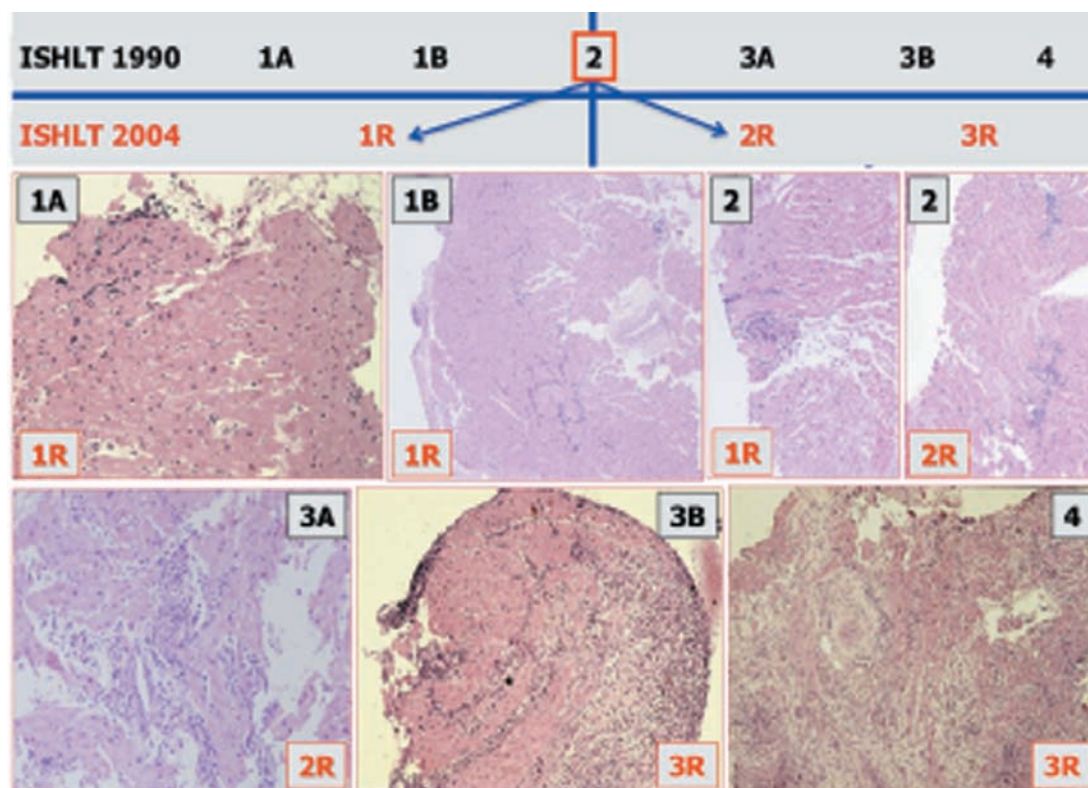


Figura 16. Rigetto acuto cellulo-mediato. La banda in alto esemplifica in linea generale le corrispondenze e le diversità fra le classificazioni dell'International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) del 1990 e del 2004. All'interno di ciascuna immagine, vengono riportati in alto il grado di rigetto secondo la classificazione ISHLT del 1990 ed in basso il grado secondo quella del 2004.

Un'utile informazione aggiuntiva riguarda la segnalazione sull'evoluitività del rigetto rispetto al precedente controllo biptico, se cioè il rigetto è persistente, regredito o peggiorato.

Effetto Quilty. Una precisazione a parte merita la lesione nota come "effetto Quilty", dal nome del primo paziente nel quale fu evidenziata, caratterizzata da un infiltrato subendocardico pleomorfo, comprendente accanto a linfo-monociti ed eosinofili anche numerose plasmacellule e talora piccoli vasi neoformati. Il significato di tale lesione è ancora controverso, anche se c'è accordo sulla sua benignità e sul fatto che non richieda un trattamento immunosoppressivo specifico²⁴⁷. Nella nuova classificazione, la differenziazione tra effetto Quilty superficiale (di tipo A) ed effetto Quilty di tipo B, quando si approfonda nel miocardio sottostante, è stata eliminata.

Disordini linfo-proliferativi post-trapianto. L'infiltrato può raramente essere dovuto a disordini linfoproliferativi: in tal caso, l'aspetto di tipo blastico delle cellule che lo compongono e la scarsità del danno miocellulare associato dovrebbero far sospettare questo tipo di patologia. In questi casi, si può ricorrere ad ulteriori accertamenti, quali: a) indagini immunoistochimiche per la caratterizzazione dell'infiltrato, che consentono di definire la prevalenza di linfociti B o T; b) ibridazione *in situ* per il virus di Epstein-Barr, virus spesso rilevato in questo tipo di patologia; c) indagini molecolari per la determinazione di sequenze genomiche del virus di Epstein-Barr e per la definizione della oli-

go- o monoclonalità dell'infiltrato^{248,249}. La diagnosi di disordine linfoproliferativo post-trapianto richiede la riduzione dell'immunosoppressione.

Infezioni. Va ricordato che, anche se con minor frequenza rispetto ad altri tipi di trapianto, si può porre il problema della diagnosi differenziale tra un rigetto cellulare acuto e processi infiammatori di natura infettiva. L'esame istologico può evidenziare protozoi, come il *Toxoplasma gondii*, e virus, come il *citomegalovirus*, con i caratteristici effetti citopatici nucleari. In caso di sospetto di infezione virale, è importante eseguire indagini molecolari per studiare la presenza di sequenze genomiche virali nel miocardio⁴⁹. In altri tipi di infezione, possono essere di ausilio le colorazioni Grocott-Gomori, Gram e Giemsa, rispettivamente per evidenziare miceti, batteri e protozoi, agenti eziologici che vanno sempre presi in considerazione nelle sospette patologie infettive²⁴¹.

Rigetto anticorpo-mediato

È un'entità clinica ormai riconosciuta da tempo, ma non ancora ben caratterizzata: occorre più frequentemente nel corso del primo mese e del primo anno ed in pazienti allosensibilizzati (trasfusioni, gravidanza, assistenza ventricolare, precedenti trapianti). In letteratura, vengono riportati un'incidenza altamente variabile (3-52%) e un'associazione con il rigetto cellulare del 23%¹¹⁰.

Il rigetto anticorpo-mediato condiziona una prognosi peggiore, un più frequente e precoce sviluppo di vasculopatia del graft ed una maggiore ricorrenza di rigetti cellulari.

La diagnosi è complessa e richiede:

- l'evidenza clinica di disfunzione acuta del graft,
- l'evidenza istologica di danno capillare acuto,
- l'evidenza immunopatologica di danno mediato da anticorpi (reperti immunoistochimici),
- l'evidenza sierologica di anticorpi circolanti antidonatore specifici, HLA e non HLA.

I reperti istologici sono costituiti da: rigonfiamento delle cellule endoteliali dei capillari (Figura 17A); presenza di aggregati di macrofagi nel lume dei capillari e, nelle forme più severe, di aggregati di neutrofili; necrosi miocitarie senza infiltrato cellulare; edema ed emorragia interstiziali; veri trombi intravascolari.

Accanto alle tradizionali tecniche di immunofluorescenza su sezioni congelate, sono oggi disponibili anche tecniche immunoistochimiche su sezioni in paraffina. Queste ultime prevedono l'utilizzo di anticorpi:

- anti-C4d per rilevare la deposizione del fattore 4d del complemento nelle cellule endoteliali dei capillari, che rappresenta il reperto più significativo in questo tipo di diagnostica. Non deve essere considerata indicativa di rigetto umorale la presenza di depositi di C4d nelle cellule endoteliali delle piccole arterie ed arteriole (Figura 17B),
- anti-CD68-PGM1 per identificare i macrofagi nel lume dei capillari (Figura 17C),
- anti-CD31 o CD34 per le cellule endoteliali (Figura 17D).

Con le tecniche di immunofluorescenza su sezioni congelate si ricerca la deposizione nei capillari di immunoglobuline (IgG, IgM e/o IgA) e di fattori del complemento (C3d, C4d e/o C1q)^{250,251}.

In base alle raccomandazioni ISHLT 2004, ogni BEM va valutata anche per la presenza dei reperti istologici di rigetto anticorpo-mediato: in caso di positività, vanno effet-

tuate le suddette indagini con tecniche immunoistochimiche o di immunofluorescenza.

I pazienti che sviluppano numerosi episodi documentati di rigetto umorale devono essere monitorati su tutte le BEM con tecniche immunoistochimiche o di immunofluorescenza e con la ricerca nel sangue degli anticorpi circolanti.

Nella Tabella 10 è riportata la classificazione ISHLT 2004 del rigetto anticorpo-mediato.

Rigetto cronico o vasculopatia del graft e microangiopatia

La vasculopatia del cuore trapiantato, inizialmente denominata "rigetto cronico", rappresenta la causa più frequente di disfunzione del graft a distanza dal trapianto e consiste in una malattia obliterante dei vasi coronarici, in genere di calibro superiore a quello dei piccoli vasi che possono essere esaminati in una BEM²⁵².

Le caratteristiche istologiche delle lesioni della vasculopatia del graft, nota anche come "aterosclerosi accelerata", permettono di differenziarle da quelle dell'aterosclerosi nativa: abitualmente infatti le alterazioni coinvolgono l'in-

Tabella 10. Classificazione del rigetto anticorpo-mediato (AMR) dell'International Society for Heart and Lung Transplantation 2004.

AMR 0: AMR assente	Assenza di evidenze istologiche o immunopatologiche di AMR
AMR 1: AMR presente	Presenza delle caratteristiche istologiche per AMR Positività dei reperti immunopatologici (IF o IHC)

IF = immunofluorescenza; IHC = immunoistochimica.

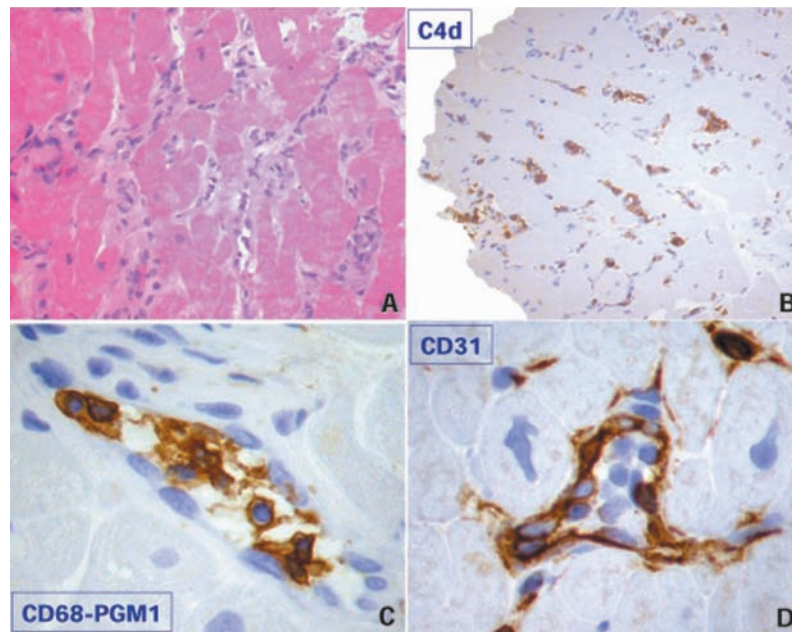


Figura 17. Rigetto anticorpo-mediato. A: biopsia endomiocardica che mostra la presenza di un diffuso rigonfiamento delle cellule endoteliali vascolari (ematossilina-eosina, 200×). B: colorazione immunoistochimica diffusa e di forte intensità per il fattore C4d del complemento nelle cellule endoteliali dei capillari (100×). C e D: le reazioni immunoistochimiche per le molecole CD68-PGM1 (C, 400×) e CD31 (D, 400×) evidenziano la presenza di aggregati di macrofagi nel lume dei capillari e la prominenza delle cellule endoteliali.

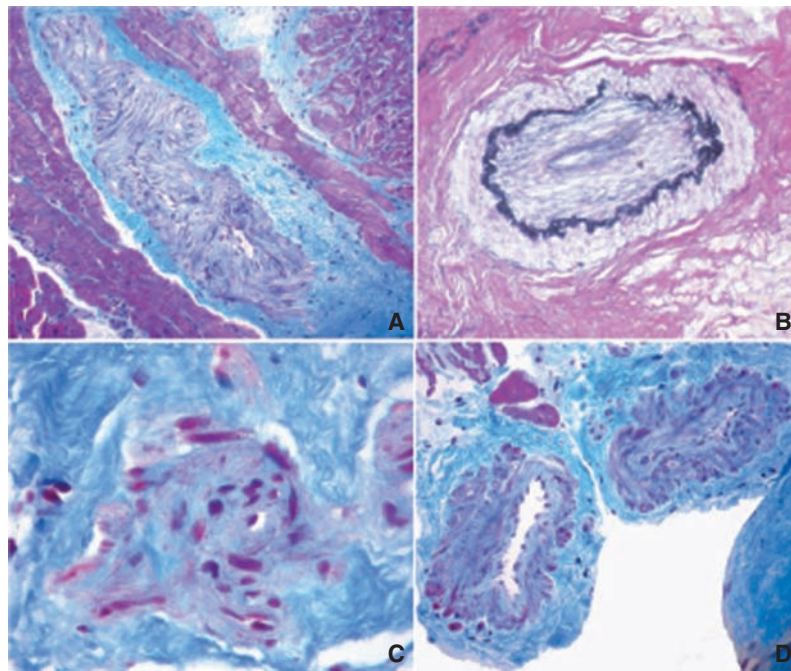


Figura 18. Microvasculopatia del graft. Biopsie endomiocardiche che mostrano gradi differenti di vasculopatia del graft, stenotante ed obliterativa, in alcuni piccoli vasi intramurali. A: tricromica di Mallory, 400×; B: Weigert van Gieson, 400×; C: tricromica di Mallory, 400×; D: tricromica di Mallory, 400×.

tera lunghezza del vaso, estendendosi anche nelle diramazioni distali di calibro minore, hanno distribuzione concentrica, risparmiano la membrana elastica interna, non sviluppano il classico ateroma con core lipidico-necrotico, mostrano raramente calcificazioni e sono frequentemente costituite da un'iperplasia intimale fibrocellulare. La vasculopatia si associa spesso ad un infiltrato flogistico linfo-monocitario (vasculite)²⁵³ o ad inspessimento fibro-ialino della parete vasale, come esito a distanza del processo flogistico.

Le colorazioni per il collagene e per le fibre elastiche sono utili per studiare la presenza dei processi iperplastici e proliferativi intimali, che possano coinvolgere le arteriole intramurali (Figura 18).

Nei frammenti biotici, si possono talora osservare le lesioni ischemiche causate dalla coronaropatia, sotto forma di miocitolisi colliquativa o eccezionalmente di necrosi coagulativa, quando il processo ha dato luogo ad infarto miocardico²⁵⁴.

Bibliografia

1. Fowles RE. Cardiac biopsy. New York, NY: Futura Publishing Company, 1992.
2. Billingham ME, Tazelaar HD. Cardiac biopsy. In: Parmley WW, Chatterjee K, eds. Cardiology. Vol 1. Philadelphia, PA: JB Lippincott, 1987: 1-17.
3. Baroldi G, Thiene G. Biopsia endomiocardica. Padova: Piccin Nuova Libreria, 1996.
4. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to update the 2001 guidelines for the evaluation and management of heart failure): devel-

oped in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation, endorsed by the Heart Rhythm Society. Circulation 2005; 112: e154-e235.

5. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Circulation 2007; 116: 2216-33.
6. Heart Failure Society of America. Executive summary: HFSA 2006 comprehensive heart failure practice guideline. J Card Fail 2006; 12: 10-38.
7. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005). The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 2005; 26: 1115-40.
8. Fast JH, Kubat K, Van Haelst UJ, Schuurmans Stekhoven JH. The usefulness of an endomyocardial biopsy in heart disease of unknown etiology. Int J Cardiol 1986; 11: 317-28.
9. Fowles RE, Mason JW. Role of cardiac biopsy in the diagnosis and management of cardiac disease. Prog Cardiovasc Dis 1984; 27: 153-72.
10. Baandrup U, Florio RA, Rehahn M, Richardson PJ, Olsen EG. Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy. II: Comparison of histology and clinical/haemodynamic information. Br Heart J 1981; 45: 487-93.
11. Camerini F, Salvi A, Sinagra G. Endomyocardial biopsy in dilated cardiomyopathy and myocarditis: which role? Int J Cardiol 1991; 31: 1-8.
12. Mason JW, O'Connell JB. Clinical merit of endomyocardial biopsy. Circulation 1989; 79: 971-9.
13. Ferrans VJ, Roberts WC. Myocardial biopsy: a useful diagnostic procedure or only a research tool? Am J Cardiol 1978; 41: 965-7.
14. Ardehali H, Qasim A, Cappola T, et al. Endomyocardial biopsy

- plays a role in diagnosing patients with unexplained cardiomyopathy. *Am Heart J* 2004; 147: 919-23.
15. Ardehali H, Kasper EK, Baughman KL. Diagnostic approach to the patient with cardiomyopathy: whom to biopsy. *Am Heart J* 2005; 149: 7-12.
16. Felker GM, Hu W, Hare JM, Hruban RH, Baughman KL, Kasper EK. The spectrum of dilated cardiomyopathy. The Johns Hopkins experience with 1278 patients. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78: 270-83.
17. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1077-84.
18. Perkan A, Di Lenarda A, Sinagra G. Cardiomiopatia dilatativa: quando è indicata e cosa chiedere alla biopsia endomiocardica. *Ital Heart J Suppl* 2002; 3: 419-25.
19. Pawlak A, Walczak E, Gil RJ, Wagner T, Rzezak J, Seweryniak P. Is diagnostic myocardial biopsy useful in the XXI century? *Kardiologia Pol* 2005; 62: 360-71.
20. Mills RM, Lauer MS. Endomyocardial biopsy: a procedure in search of an indication. *Am Heart J* 2004; 147: 759-60.
21. Kuhn H, Lawrenz T, Beer G. Indication for myocardial biopsy in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Med Klin (Munich)* 2005; 100: 553-61.
22. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet* 2009; 373: 1289-300.
23. Thiene G, Corrado D, Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 45.
24. Corrado D, Basso C, Leoni L, et al. Three-dimensional electroanatomical voltage mapping and histologic evaluation of myocardial substrate in right ventricular outflow tract tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 731-9.
25. Avella A, d'Amati G, Pappalardo A, et al. Diagnostic value of endomyocardial biopsy guided by electroanatomic voltage mapping in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008; 19: 1127-34.
26. Hasegawa A, Sekiguchi M, Hasumi M, et al. High incidence of significant pathology in endomyocardial biopsy and familial occurrence in cases with arrhythmia and/or conduction disturbance. *Heart Vessels Suppl* 1990; 5: 28-30.
27. Sekiguchi M, Hasegawa A, Hiroe M, Morimoto S, Nishikawa T. Inclusion of electric disturbance type cardiomyopathy in the classification of cardiomyopathy: a current review. *J Cardiol* 2008; 51: 81-8.
28. Uusimaa P, Ylitalo K, Anttonen O, et al. Ventricular tachyarrhythmia as a primary presentation of sarcoidosis. *Europace* 2008; 10: 760-6.
29. Poletti A, Cocco P, Valente M, Fasoli G, Chioin R, Thiene G. In vivo diagnosis of cardiac angiosarcoma by endomyocardial biopsy. *Cardiovasc Pathol* 1993; 2: 89-91.
30. Basso C, Stefani A, Calabrese F, Fasoli G, Valente M. Primary right atrial fibrosarcoma diagnosed by endocardial biopsy. *Am Heart J* 1996; 131: 399-402.
31. Testolin L, Basso C, Pittarello D, Casarotto D, Valente M. Cardiogenic shock due to metastatic cardiac lymphoma: still a diagnostic and therapeutic challenge. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19: 365-8.
32. Piccaluga PP, Vigna E, Placci A, et al. Primary cardiac non-Hodgkin lymphoma presenting with atrial flutter and pericardial effusion. *Br J Haematol* 2006; 134: 356.
33. Adachi K, Tanaka H, Tochima H, Morimatsu M. Right atrial angiosarcoma diagnosed by cardiac biopsy. *Am Heart J* 1988; 115: 482-5.
34. Hanley PC, Shub C, Seward JB, Wold LE. Intracavitary cardiac melanoma diagnosed by endomyocardial left ventricular biopsy. *Chest* 1983; 84: 195-8.
35. Hausheer FH, Josephson RA, Grochow LB, Weissman D, Brinker JA, Weisman HF. Intracardiac sarcoma diagnosed by left ventricular endomyocardial biopsy. *Chest* 1987; 92: 177-9.
36. Johnston ID, Popple AW. Right ventricular outflow tract obstruction secondary to small intestinal lymphoma. *Br Heart J* 1980; 43: 593-6.
37. Flipse TR, Tazelaar HD, Holmes DR Jr. Diagnosis of malignant cardiac disease by endomyocardial biopsy. *Mayo Clin Proc* 1990; 65: 1415-22.
38. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis: a histopathological definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1: 3-14.
39. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schannwell M, Welp LB, Schultheiss HP. Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 1994; 1: 13-25.
40. Steenbergen C, Kolbeck PC, Wolfe JA, Anthony RM, Sanfilippo FP, Jennings RB. Detection of lymphocytes in endomyocardium using immunohistochemical techniques. Relevance to evaluation of endomyocardial biopsies in suspected cases of lymphocytic myocarditis. *J Appl Cardiol* 1986; 1: 63-73.
41. Milei J, Bortman G, Fernandez-Alonso G, Grancelli H, Beigelman R. Immunohistochemical staining of lymphocytes for the reliable diagnosis of myocarditis in endomyocardial biopsies. *Cardiology* 1990; 77: 77-85.
42. Kühl U, Noutsias M, Schultheiss HP. Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O): 100-6.
43. Kühl U, Seeberg B, Schultheiss HP, Strauer BE. Immunohistological characterization of infiltrating lymphocytes in biopsies of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1994; 15 (Suppl C): 62-7.
44. Angelini A, Crosato M, Boffa GM, et al. Active versus borderline myocarditis: clinicopathological correlates and prognostic implications. *Heart* 2002; 87: 210-5.
45. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J* 2007; 28: 1326-33.
46. Severini GM, Mestroni L, Falaschi A, Camerini F, Giacca M. Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1345-9.
47. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, et al. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1999; 99: 1348-54.
48. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; 111: 887-93.
49. Calabrese F, Thiene G. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 11-25.
50. Martin AB, Webber S, Fricker FJ, et al. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation* 1994; 90: 330-9.
51. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction: evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 466-72.
52. Kebbel A, Röcken C. Immunohistochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 673-83.
53. Linke RP, Oos R, Wiegel NM, Nathrath WB. Classification of amyloidosis: misdiagnosing by way of incomplete immunohistochemistry and how to prevent it. *Acta Histochem* 2006; 108: 197-208.
54. Röcken C, Schwotzer E, Linke RP, Saeger W. The classification of amyloid deposits in clinicopathological practice. *Histopathology* 1996; 29: 325-35.

55. Linke RP, Nathrath WB, Eulitz M. Classification of amyloid syndromes from tissue sections using antibodies against various amyloid fibril proteins: report of 142 cases. In: Glenner GG, Osserman EF, Beneditt EP, et al, eds. *Amyloidoses*. New York, NY: Plenum Publishing Corporation, 1986: 599-605.
56. Chastonay P, Hurlimann J. Characterization of different amyloids with immunological techniques. *Pathol Res Pract* 1986; 181: 657-63.
57. Baim DS. Endomyocardial biopsy. In: Baim DS, Grossman W, eds. *Cardiac catheterization, angiography, and intervention*. Baltimore, FL: Williams & Wilkins, 1996: 407-20.
58. Sinagra G, Klugmann S. Quando si deve effettuare la biopsia endomiocardica in pazienti con cardiomiopatia? *Giornale Italiano di Emodinamica* 1995; 4: 16-8.
59. Mason JW. Techniques for right and left ventricular endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol* 1978; 41: 887-92.
60. Corrado D, Basso C, Leoni L, et al. Three-dimensional electroanatomic voltage mapping increases accuracy of diagnosing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circulation* 2005; 111: 3042-50.
61. Miller LW, Labovitz AJ, McBride LA, Pennington DG, Kanter K. Echocardiography-guided endomyocardial biopsy. A 5-year experience. *Circulation* 1988; 78: III99-III102.
62. Blomström-Lundqvist C, Noor AM, Eskilsson J, Persson S. Safety of transvenous right ventricular endomyocardial biopsy guided by two-dimensional echocardiography. *Clin Cardiol* 1993; 16: 487-92.
63. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, et al. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology. *Circulation* 2004; 109: 1250-8.
64. Sekiguchi M, Take M. World survey of catheter biopsy of the heart. In: Sekiguchi M, Olsen EG, eds. *Cardiomyopathy: clinical, pathological and theoretical aspects*. Baltimore, MD: University Park Press, 1980: 217-25.
65. Deckers JW, Hare JM, Baughman KL. Complications of transvenous right ventricular endomyocardial biopsy in adult patients with cardiomyopathy: a seven-year survey of 546 consecutive diagnostic procedures in a tertiary referral center. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 43-7.
66. Holzmann M, Nicko A, Kühl U, et al. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral approach: a retrospective and prospective study analyzing 3048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation* 2008; 118: 1722-8.
67. Anastasiou-Nana MI, O'Connell JB, Nanas JN, Sorensen SG, Anderson JL. Relative efficiency and risk of endomyocardial biopsy: comparisons in heart transplant and nontransplant patients. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1989; 18: 7-11.
68. Baraldi-Junkins C, Levin HR, Kasper EK, Rayburn BK, Herskowitz A, Baughman KL. Complications of endomyocardial biopsy in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12: 63-7.
69. Knottnerus JA, van Weel C, Muris JW. Evaluation of diagnostic procedures. *BMJ* 2002; 324: 477-80.
70. Sugihara N, Genda A, Shimizu M, et al. Quantitation of myocardial fibrosis and its relation to function in essential hypertension and hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 1988; 11: 771-8.
71. Parrillo JE, Aretz HT, Palacios I, Fallon JT, Block PC. The results of transvenous endomyocardial biopsy can frequently be used to diagnose myocardial diseases in patients with idiopathic heart failure. Endomyocardial biopsies in 100 consecutive patients revealed a substantial incidence of myocarditis. *Circulation* 1984; 69: 93-101.
72. Leatherbury L, Chandra RS, Shapiro SR, Perry LW. Value of endomyocardial biopsy in infants, children and adolescents with dilated or hypertrophic cardiomyopathy and myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 1547-54.
73. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003; 107: 857-63.
74. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003; 107: 2793-8.
75. Daliento L, Calabrese F, Tona F, et al. Successful treatment of enterovirus-induced myocarditis with interferon-alpha. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22: 214-7.
76. Kühl U, Pauschinger M, Seeborg B, et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005; 112: 1965-70.
77. Calabrese F, Rigo E, Milanese O, et al. Molecular diagnosis of myocarditis and dilated cardiomyopathy in children: clinicopathologic features and prognostic implications. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11: 212-21.
78. Dec GW Jr, Palacios IF, Fallon JT, et al. Active myocarditis in the spectrum of acute dilated cardiomyopathies: clinical features, histologic correlates, and clinical outcome. *N Engl J Med* 1985; 312: 885-90.
79. Popma JJ, Cigarroa RG, Buja LM, Hillis LD. Diagnostic and prognostic utility of right-sided catheterization and endomyocardial biopsy in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1989; 63: 955-8.
80. Becker AE, Heijmans CD, Essed CE. Chronic non-ischaemic congestive heart disease and endomyocardial biopsies. Worth the extra? *Eur Heart J* 1991; 12: 218-23.
81. Sekiguchi M, Numao Y, Imai M, Furuie T, Mikami R. Clinical and histopathological profile of sarcoidosis of the heart and acute idiopathic myocarditis. Concepts through a study employing endomyocardial biopsy, II: Myocarditis. *Jpn Circ J* 1980; 44: 264-73.
82. Cooper LT Jr, Berry GJ, Shabetai R. Idiopathic giant-cell myocarditis - natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis Study Group Investigators. *N Engl J Med* 1997; 336: 1860-6.
83. Shields RC, Tazelaar HD, Berry GJ, Cooper LT Jr. The role of right ventricular endomyocardial biopsy for idiopathic giant cell myocarditis. *J Card Fail* 2002; 8: 74-8.
84. Caforio AL, Tona F, Bottaro S, et al. Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 2008; 41: 35-45.
85. Sekiguchi M, Yazaki Y, Isobe M, Hiroe M. Cardiac sarcoidosis: diagnostic, prognostic, and therapeutic considerations. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996; 10: 495-510.
86. Uemura A, Morimoto S, Hiramitsu S, Kato Y, Ito T, Hishida H. Histologic diagnostic rate of cardiac sarcoidosis: evaluation of endomyocardial biopsies. *Am Heart J* 1999; 138: 299-302.
87. Sekiguchi M, Numao Y, Imai M, Furuie T, Mikami R. Clinical and histopathological profile of sarcoidosis of the heart and acute idiopathic myocarditis. Concepts through a study employing endomyocardial biopsy, I: Sarcoidosis. *Jpn Circ J* 1980; 44: 249-63.
88. Ardehali H, Howard DL, Hariri A, et al. A positive endomyocardial biopsy result for sarcoid is associated with poor prognosis in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *Am Heart J* 2005; 150: 459-63.
89. Pellikka PA, Holmes DR Jr, Edwards WD, Nishimura RA, Tajik AJ, Kyle RA. Endomyocardial biopsy in 30 patients with primary amyloidosis and suspected cardiac involvement. *Arch Intern Med* 1988; 148: 662-6.
90. Smith TJ, Kyle RA, Lie JT. Clinical significance of histopathologic patterns of cardiac amyloidosis. *Mayo Clin Proc* 1984; 59: 547-55.
91. Lie JT. Pathology of amyloidosis and amyloid heart disease. *Appl Pathol* 1984; 2: 341-56.

92. Olson LJ, Edwards WD, Holmes DR Jr, Miller FA Jr, Nordstrom LA, Baldus WP. Endomyocardial biopsy in hemochromatosis: clinicopathologic correlates in six cases. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 116-20.
93. Buja LM, Roberts WC. Iron in the heart. Etiology and clinical significance. *Am J Med* 1971; 51: 209-21.
94. Olson LJ, Reeder GS, Noller KL, Edwards WD, Howell RR, Michels VV. Cardiac involvement in glycogen storage disease III: morphologic and biochemical characterization with endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol* 1984; 53: 980-1.
95. Angelini A, Basso C, Nava A, Thiene G. Endomyocardial biopsy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am Heart J* 1996; 132: 203-6.
96. Veinot JP. Diagnostic endomyocardial biopsy pathology: secondary myocardial diseases and other clinical indications - a review. *Can J Cardiol* 2002; 18: 287-96.
97. Alter P, Grimm W, Tontsch D, Maisch B. Diagnosis of primary cardiac lymphoma by endomyocardial biopsy. *Am J Med* 2001; 110: 593-4.
98. Malouf JF, Thompson RC, Maples WJ, Wolfe JT. Diagnosis of right atrial metastatic melanoma by transesophageal echocardiographic-guided transvenous biopsy. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 1167-70.
99. Scott PJ, Ettles DF, Rees MR, Williams GJ. The use of combined transesophageal echocardiography and fluoroscopy in the biopsy of a right atrial mass. *Br J Radiol* 1990; 63: 222-4.
100. Savoia MT, Liguori C, Nahar T, et al. Transesophageal echocardiography-guided transvenous biopsy of a cardiac sarcoma. *J Am Soc Echocardiogr* 1997; 10: 752-5.
101. Hammoudeh AJ, Chaaban F, Watson RM, Millman A. Transesophageal echocardiography-guided transvenous endomyocardial biopsy used to diagnose primary cardiac angiosarcoma. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1996; 37: 347-9.
102. Baandrup U, Mortensen SA, Hoyer S. Pathologic aspects of specific heart muscle disease with restrictive and/or electric disorders. In: Olsen EG, ed. *Restrictive cardiomyopathy and arrhythmias*. Tokyo: University of Tokyo Press, 1990: 329-45.
103. Billingham ME. Acute myocarditis: is sampling error a contraindication for diagnostic biopsies? *J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 921-2.
104. Baandrup U, Florio RA, Olsen EG. Do endomyocardial biopsies represent the morphology of the rest of the myocardium? A quantitative light microscopic study of single versus multiple biopsies with the King's biptome. *Eur Heart J* 1982; 3: 171-8.
105. Keogh AM, Billingham ME, Schroeder JS. Rapid histological changes in endomyocardial biopsy specimens after myocarditis. *Br Heart J* 1990; 64: 406-8.
106. Sinagra G, Maras P, D'Ambrosio A, et al. Polimorfismo clinico di presentazione e storia naturale della miocardite attiva: esperienza su 60 casi. *G Ital Cardiol* 1997; 27: 758-74.
107. Arbustini E, Gavazzi A, Dal Bello B, et al. Ten-year experience with endomyocardial biopsy in myocarditis presenting with congestive heart failure: frequency, pathologic characteristics, treatment and follow-up. *G Ital Cardiol* 1997; 27: 209-23.
108. Mason JW. Endomyocardial biopsy and the causes of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 591-2.
109. Salvi A, Silvestri F, Gori D, Klugmann S, Tanganelli P, Camerini F. La biopsia endomiocardica: un'esperienza clinica relativa a 156 pazienti. *G Ital Cardiol* 1985; 15: 251-9.
110. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1710-20.
111. Edwards WD. Current problems in establishing quantitative histopathologic criteria for the diagnosis of lymphocytic myocarditis by endomyocardial biopsy. *Heart Vessels Suppl* 1985; 1: 138-42.
112. Fenoglio JJ Jr, Ursell PC, Kellogg CF, Drusin RE, Weiss MB. Diagnosis and classification of myocarditis by endomyocardial biopsy. *N Engl J Med* 1983; 308: 12-8.
113. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987; 75: 401-5.
114. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2008; 29: 270-6.
115. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; 113: 1807-16.
116. Rapezzi C, Leone O, Ferlito M, Biagini E, Cocco F, Arpesella G. Isolated ventricular non-compaction with restrictive cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2006; 27: 1927.
117. Biagini E, Ragni L, Ferlito M, et al. Different types of cardiomyopathy associated with isolated ventricular noncompaction. *Am J Cardiol* 2006; 98: 821-4.
118. Cunningham KS, Veinot JP, Butany J. An approach to endomyocardial biopsy interpretation. *J Clin Pathol* 2006; 59: 121-9.
119. Burke AP, Farb A, Robinowitz M, Virmani R. Serial sectioning and multiple level examination of endomyocardial biopsies for the diagnosis of myocarditis. *Mod Pathol* 1991; 4: 690-3.
120. Calabrese F, Valente M, Thiene G, et al. Enteroviral genome in native hearts may influence outcome of patients who undergo cardiac transplantation. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8: 39-46.
121. Leone O, Magelli C, Gallo C, et al. Severe postcardiac-transplant rejection associated with recurrence of giant cell myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 1996; 5: 163-7.
122. Lester WM, Gotlieb AI. Cardiovascular effects of systemic diseases and conditions. In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ, eds. *Cardiovascular pathology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 2001: 493-540.
123. Denbow CE, Lie JT, Tancredi RG, Bunch TW. Cardiac involvement in polymyositis: a clinicopathologic study of 20 autopsied patients. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 1088-92.
124. Bulkley BH, Roberts WC. The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy. A study of 36 necropsy patients. *Am J Med* 1975; 58: 243-64.
125. Fairfax MJ, Osborn TG, Williams GA, Tsai CC, Moore TL. Endomyocardial biopsy in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1988; 15: 593-6.
126. Salomone E, Tamburino C, Bruno G, Di Paola R, Silvestri F. The role of endomyocardial biopsy in the diagnosis of cardiac involvement in systemic lupus erythematosus. *Heart Vessels* 1989; 5: 52-3.
127. Nava A, Thiene G, Canciani B, et al. Clinical profile of concealed form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy presenting with apparently idiopathic ventricular arrhythmias. *Int J Cardiol* 1992; 35: 195-206.
128. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group on Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J* 1994; 71: 215-8.
129. Basso C, Nava A, Thiene G. *Cardiomiopatia aritmogena*. Milano: Arti Grafiche Color Black, 2001.
130. Ott P, Marcus FI, Sobonya RE, Morady F, Knight BP, Fuenzalida CE. Cardiac sarcoidosis masquerading as right ventricular dysplasia. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003; 26: 1498-503.
131. Chimenti C, Pieroni M, Maseri A, Frustaci A. Histologic findings in patients with clinical and instrumental diagnosis of

- sporadic arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 2305-13.
132. Pinamonti B, Miani D, Sinagra G, Bussani R, Silvestri F, Camerini F. Familial right ventricular dysplasia with biventricular involvement and inflammatory infiltration. *Heart Muscle Disease Study Group. Heart* 1996; 76: 66-9.
133. Basso C, Ronco F, Marcus FI, et al. Quantitative assessment of endomyocardial biopsy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an in vitro validation of diagnostic criteria. *Eur Heart J* 2008; 29: 2760-71.
134. Glenner GG. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses. *N Engl J Med* 1980; 302: 1283-92, 1333-43.
135. Glenner GG, Eanes ED, Bladen HA, Linke RP, Termine JD. Beta-pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J Histochem Cytochem* 1974; 22: 1141-58.
136. Cohen AS, Connors LH. The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *J Pathol* 1987; 151: 1-10.
137. Pepys MB, Baltz ML, de Beer FC, et al. Biology of serum amyloid P component. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 389: 286-98.
138. Westermark P, Araki S, Benson MD, et al. Nomenclature of amyloid fibril proteins. Report from the meeting of the International Nomenclature Committee on Amyloidosis. August 8-9, 1998. Part 1. *Amyloid* 1999; 6: 63-6.
139. Kholová I, Niessen HW. Amyloid in the cardiovascular system: a review. *J Clin Pathol* 2005; 58: 125-33.
140. Shan KB, Inoue Y, Mehra MR. Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1805-13.
141. Leone O, Boriani G, Chiappini B, et al. Amyloid deposition as a cause of atrial remodelling in persistent valvular atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2004; 25: 1237-41.
142. Röcken C, Peters B, Juenemann G, et al. Atrial amyloidosis: an arrhythmogenic substrate for persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2002; 106: 2091-7.
143. Perugini E, Rapezzi C, Piva T, et al. Non-invasive evaluation of the myocardial substrate of cardiac amyloidosis by gadolinium cardiac magnetic resonance. *Heart* 2006; 92: 343-9.
144. Perugini E, Guidalotti PL, Salvi F, et al. Noninvasive etiologic diagnosis of cardiac amyloidosis using 99mTc-3,3-diphosphono-1,2-propanodicarboxylic acid scintigraphy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1076-84.
145. Röcken C, Sletten K. Amyloid in surgical pathology. *Virchows Arch* 2003; 443: 3-16.
146. Ladewig P. Double-refringence of the amyloid-Congo-red complex in histological sections. *Nature* 1945; 156: 81-2.
147. Cooper JH. Selective amyloid staining as a function of amyloid composition and structure. Histochemical analysis of the alkaline Congo red, standardized toluidine blue, and iodine methods. *Lab Invest* 1974; 31: 232-8.
148. Linke RP. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch* 2000; 436: 439-48.
149. Arbustini E, Verga L, Concardi M, Palladini G, Obici L, Merlini G. Electron and immuno-electron microscopy of abdominal fat identifies and characterizes amyloid fibrils in suspected cardiac amyloidosis. *Amyloid* 2002; 9: 108-14.
150. Linke RP. Monoclonal antibodies against amyloid fibril protein AA. Production, specificity, and use for immunohistochemical localization and classification of AA-type amyloidosis. *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 322-8.
151. Strega RJ, Saeger W, Linke RP. Diagnosis and immunohistochemical classification of systemic amyloidoses. Report of 43 cases in an unselected autopsy. *Virchows Arch* 1998; 433: 19-27.
152. van de Kaa CA, Hol PR, Huber J, Linke RP, Kooiker CJ, Gruys E. Diagnosis of the type of amyloid in paraffin wax embedded tissue sections using antisera against human and animal amyloid proteins. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986; 408: 649-64.
153. Satoskar AA, Burdge K, Cowden DJ, Nadasdy GM, Hebert LA, Nadasdy T. Typing of amyloidosis in renal biopsies: diagnostic pitfalls. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 917-22.
154. Solomon A, Murphy CL, Westermark P. Unreliability of immunohistochemistry for typing amyloid deposits. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 14-5.
155. Picken MM. Immunoglobulin light and heavy chain amyloidosis AL/AH: renal pathology and differential diagnosis. *Contrib Nephrol* 2007; 153: 135-55.
156. Picken MM, Herrera GA. The burden of "sticky" amyloid: typing challenges. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 850-1.
157. Hoshii Y, Takahashi M, Ishihara T, Uchino F. Immunohistochemical classification of 140 autopsy cases with systemic amyloidosis. *Pathol Int* 1994; 44: 352-8.
158. Ferrans VJ, Boyce SW. Metabolic and familial diseases. In: Silver MD, ed. *Cardiovascular pathology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1983: 1153-67.
159. Taylor MR, Ku L, Cavanaugh J, et al; Familial Cardiomyopathy Registry. Danon disease presenting with dilated cardiomyopathy and a complex phenotype. *J Hum Genet* 2007; 52: 830-5.
160. Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, et al. Autophagic vacuoles with sarcolemmal features delineate Danon disease and related myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 513-22.
161. Arad M, Maron BJ, Gorham JM, et al. Glycogen storage disease presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2005; 352: 362-72.
162. Edwards WD. Pathology of endomyocardial biopsy. In: Waller BF, ed. *Pathology of the heart and great vessels*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1988: 191-275.
163. Desnick RG, Ioannou YA, Eng CM. Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Valle D, ed. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, NY: McGraw-Hill, 1995: 2741-84.
164. Hoigné P, Attenhofer Jost CH, Duru F, et al. Simple criteria for differentiation of Fabry disease from amyloid heart disease and other causes of left ventricular hypertrophy. *Int J Cardiol* 2006; 111: 413-22.
165. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1995; 333: 288-93.
166. Broadbent JC, Edwards WD, Gordon H, Hartzler GO, Krawisz JE. Fabry cardiomyopathy in the female confirmed by endomyocardial biopsy. *Mayo Clin Proc* 1981; 56: 623-8.
167. Matsui S, Murakami E, Takekoshi N, Hiramaru Y, Kin T. Cardiac manifestations of Fabry's disease. Report of a case with pulmonary regurgitation diagnosed on the basis of endomyocardial biopsy findings. *Jpn Circ J* 1977; 41: 1023-36.
168. Kato H, Sato K, Hattori S, Ikemoto S, Shimizu M, Isogai Y. Fabry's disease. *Intern Med* 1992; 31: 682-5.
169. Wadskov S, Andersen V, Kobayasi T, Søndergaard J, Sørensens SA. On the diagnosis of Fabry's disease. *Acta Derm Venereol* 1975; 55: 363-6.
170. Arbustini E, Morbini P, Grasso M, et al. Restrictive cardiomyopathy, atrioventricular block and mild to subclinical myopathy in patients with desmin-immunoreactive material deposits. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 645-53.
171. Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, et al. Desmin accumulations restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 477-83.
172. Grasso M, Pilotto A, Marziliano M, Pasotti M, Arbustini E. "Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular block resulting from a desmin mutation (letter to the Editor)". *Int J Cardiol* 2008; 131: 144-5.
173. Pruszczyk P, Kostera-Pruszczyk A, Shatunov A, et al. Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular block resulting from a desmin mutation. *Int J Cardiol* 2007; 117: 244-53.
174. Taylor MR, Slavov D, Ku L, et al; Familial Cardiomyopathy Registry; BEST (Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial) DNA

- Bank. Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2007; 115: 1244-51.
175. Milner DJ, Taffet GE, Wang X, et al. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 2063-76.
176. Jacobs A. Iron overload - clinical and pathologic aspects. *Semin Hematol* 1977; 14: 89-113.
177. Ross CE, Muir WA, Alan BP, Graham RC, Kellermeyer RW. Hemochromatosis. Pathophysiologic and genetic considerations. *Am J Clin Pathol* 1975; 63: 179-91.
178. Cutler DJ, Isner JM, Bracey AW, et al. Hemochromatosis heart disease: an unemphasized cause of potentially reversible restrictive cardiomyopathy. *Am J Med* 1980; 69: 923-8.
179. Barosi G, Arbustini E, Gavazzi A, Grasso M, Pucci A. Myocardial iron grading by endomyocardial biopsy. A clinico-pathologic study on iron overloaded patients. *Eur J Haematol* 1989; 92: 382-8.
180. Scheuer PJ, Williams R, Muir AR. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J Pathol Bacteriol* 1962; 84: 53-64.
181. Fitchett DH, Coltart DJ, Littler WA, et al. Cardiac involvement in secondary hemochromatosis: a catheter biopsy study and analysis of myocardium. *Cardiovasc Res* 1980; 14: 719-24.
182. Lombardo T, Tamburino C, Bartoloni G, et al. Cardiac iron overload in thalassemic patients: an endomyocardial biopsy study. *Ann Hematol* 1995; 71: 135-41.
183. Finsterer J, Stöllberger C. The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology* 2003; 99: 1-19.
184. Perrot A, Spuler S, Geier C, Dietz R, Osterziel KJ. Cardiac manifestations of muscular dystrophies. *Z Kardiol* 2005; 94: 312-20.
185. Nigro G, Comi LI, Politano L, et al. Evaluation of the cardiomyopathy in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1995; 18: 283-91.
186. Ohlendorf K. Towards an understanding of the dystrophin-glycoprotein complex: linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle fibers. *Eur J Cell Biol* 1996; 69: 1-10.
187. Cziner DG, Levin RI. The cardiomyopathy of Duchenne's muscular dystrophy and the function of dystrophin. *Med Hypotheses* 1993; 40: 169-73.
188. Melacini P, Fanin M, Angelini A, et al. Cardiac transplantation in a Duchenne muscular dystrophy carrier. *Neuromuscul Disord* 1998; 8: 585-90.
189. Rapezzi C, Leone O, Biagini E, Coccolo F. Echocardiographic clues to diagnosis of dystrophin related dilated cardiomyopathy. *Heart* 2007; 93: 10.
190. Jay V, Becker LE, Ackley C, Ray P. Dystrophin analysis in the diagnosis of childhood muscular dystrophy: an immunohistochemical study of 75 cases. *Pediatr Pathol* 1993; 13: 635-57.
191. Maeda M, Nakao S, Miyazato H, et al. Cardiac dystrophin abnormalities in Becker muscular dystrophy assessed by endomyocardial biopsy. *Am Heart J* 1995; 129: 702-7.
192. Arbustini E, Diegoli M, Morbini P, et al. Prevalence and characteristics of dystrophin defects in adult male patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1760-8.
193. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 2001; 106: 18-26.
194. DiMauro S, Hirano M. Mitochondria and heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1998; 13: 190-7.
195. Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 2001; 106: 46-52.
196. Taylor GP. Neonatal mitochondrial cardiomyopathy. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7: 620-4.
197. Taylor RW, Giordano C, Davidson MM, et al. A homoplasmic mitochondrial tRNA mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 41: 1786-96.
198. Andreu AL, Checcarelli N, Iwata S, Shanske S, DiMauro S. A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Pediatr Res* 2000; 48: 311-4.
199. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1362-9.
200. Billingham M. Pharmacotoxic myocardial disease: an endomyocardial study. In: Sekiguchi M, Olsen E, Goodwin J, eds. *Myocarditis and related disorders*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1985: 278-82.
201. Buja LM, Ferrans VJ, Roberts WC. Drug-induced cardiomyopathies. *Adv Cardiol* 1974; 13: 330-48.
202. Kasper EK, Agema WR, Hutchins GM, Deckers JW, Hare JM, Baughman KL. The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 673 consecutive patients. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 586-90.
203. Billingham ME, Bristow MR. Evaluation of anthracycline cardiotoxicity: predictive ability and functional correlation of endomyocardial biopsy. *Cancer Treat Symp* 1984; 3: 71-6.
204. Rowan RA, Masek MA, Billingham ME. Ultrastructural morphometric analysis of endomyocardial biopsies. Idiopathic dilated cardiomyopathy, anthracycline cardiotoxicity, and normal myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1988; 2: 137-44.
205. Buja LM, Ferrans VJ, Graw RG Jr. Cardiac pathologic findings in patients treated with bone marrow transplantation. *Hum Pathol* 1976; 7: 17-45.
206. Hall JC, Harruff R. Fatal cardiac arrhythmia in a patient with interstitial myocarditis related to chronic arsenic poisoning. *South Med J* 1989; 82: 1557-60.
207. Jarvis JQ, Hammond E, Meier R, Robinson C. Cobalt cardiomyopathy: a report of two cases from mineral assay laboratories and a review of the literature. *J Occup Med* 1992; 34: 620-6.
208. Alexander CS. Cobalt in the heart. *Ann Intern Med* 1969; 70: 411-3.
209. Kragel AH, Travis WD, Feinberg L, et al. Pathologic findings associated with interleukin-2-based immunotherapy for cancer: a postmortem study of 19 patients. *Hum Pathol* 1990; 21: 493-502.
210. Samlowski WE, Ward JH, Kraven CM, Freedman RA. Severe myocarditis following high-dose interleukin-2 administration. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 838-41.
211. Schuchter LM, Hendricks CB, Holland KH, et al. Eosinophilic myocarditis associated with high-dose interleukin-2 therapy. *Am J Med* 1990; 88: 439-40.
212. Kragel AH, Travis WD, Steis RG, Rosenberg SA, Roberts WC. Myocarditis or acute myocardial infarction associated with interleukin-2 therapy for cancer. *Cancer* 1990; 66: 1513-6.
213. Fineschi V, Neri M, Riezzo I, Turillazzi E. Sudden cardiac death due to hypersensitivity myocarditis during clozapine treatment. *Int J Legal Med* 2004; 118: 307-9.
214. Virmani R, Farb A, Burke A, Atkinson JB. The endomyocardial biopsy: techniques and role in diagnosis of heart disease. In: Virmani R, Farb A, Burke A, Atkinson JB, eds. *Cardiovascular pathology*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 2001: 280-320.
215. Robben NC, Pippas AW, Moore JO. The syndrome of 5-fluorouracil cardiotoxicity. An elusive cardiopathy. *Cancer* 1993; 71: 493-509.
216. Hochster H, Wasserheit C, Speyer J. Cardiotoxicity and cardioprotection during chemotherapy. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 304-9.
217. Alexander CS, Niño A. Cardiovascular complications in young patients taking psychotropic drugs. A preliminary report. *Am Heart J* 1969; 78: 757-69.
218. Tseng HL. Interstitial myocarditis probably related to lithium carbonate intoxication. *Arch Pathol* 1971; 92: 444-8.
219. Adachi Y, Yasumizu R, Hashimoto F, et al. An autopsy case of giant cell myocarditis probably due to a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Pathol Int* 2001; 51: 113-7.

220. Fabrizio L, Regan TJ. Alcoholic cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994; 8: 89-94.
221. Wilke A, Kaiser A, Ferency I, Maisch B. Alcohol and myocarditis. *Hertz* 1996; 21: 248-57.
222. Virmani R, Robinowitz M, Smialek JE, Smyth DF. Cardiovascular effects of cocaine: an autopsy study of 40 patients. *Am Heart J* 1988; 115: 1068-76.
223. Willens HJ, Chakko SC, Kessler KM. Cardiovascular manifestations of cocaine abuse: a case of recurrent dilated cardiomyopathy. *Chest* 1994; 106: 594-600.
224. Melandri R, Re G, Lanzarini C, et al. Myocardial damage and rhabdomyolysis associated with prolonged hypoxic coma following opiate overdose. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996; 34: 199-203.
225. Sheppard M, Davies MJ. Cardiac hypertrophy, myocarditis and cardiomyopathy. In: Sheppard M, Davies MJ, eds. *Practical cardiovascular pathology*. London: Arnold, 1998: 103-48.
226. Billingham ME. Morphological changes in drug-induced heart disease. In: Bristow M, ed. *Drug-induced heart disease*. Amsterdam: Elsevier-North Holland Biomedical Press, 1980.
227. Lewis W, Silver MD. Adverse effects of drugs on the cardiovascular system. In: Silver MD, Gotlieb I, Schoen FJ, eds. *Cardiovascular pathology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 2001: 541-61.
228. Tsiplenkova VG, Vikhert AM, Cherpachenko NM. Ultrastructural and histochemical observations in human and experimental alcoholic cardiomyopathy [abstract]. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8 (Suppl A): 22A.
229. Roberts WC. Primary and secondary neoplasms of the heart. *Am J Cardiol* 1997; 80: 671-82.
230. Burke AP, Virmani R. *Tumours of the heart and great vessels*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1996.
231. Fletcher CD, Unni KK, Mertens F. *World Health Organization classification of tumours: tumours of soft tissue and bones*. Lyon: IARC Press, 2002.
232. Burke AP, Veinot JP, Loire R, et al. Tumours of the heart: introduction. In: Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris C, eds. *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC Press, 2004: 250-4.
233. Basso C, Valente M, Thiene G. *Tumori del cuore*. Roma: Arti Grafiche Color Black, 2005.
234. Basso C, Valente M, Poletti A, Casarotto D, Thiene G. Surgical pathology of primary cardiac and pericardial tumors. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997; 12: 730-7.
235. Coindre JM. Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology* 2003; 43: 1-16.
236. Ordoñez NG. Application of immunocytochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas: a review and update. *Adv Anat Pathol* 1999; 5: 67-85.
237. Elaine SJ, Harris NL, Stein H, Wardiman JW. *World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press, 2001.
238. Billingham ME. Dilemma of variety of histopathologic grading systems for acute cardiac allograft rejection by endomyocardial biopsy. *J Heart Transplant* 1990; 9: 272-6.
239. Billingham ME, Cary NR, Hammond E, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection. Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant* 1990; 9: 587-93.
240. Sharples LD, Cary NR, Large SR, Wallwork J. Error rates with which endomyocardial biopsy specimens are graded for rejection after cardiac transplantation. *Am J Cardiol* 1992; 70: 527-30.
241. Angelini A, Valente M, Thiene G, et al. Monitoraggio biptico del paziente trapiantato. *G Ital Cardiol* 1989; 19: 1144-9.
242. Brunner-La Rocca HP, Sütsch G, Schneider J, Follath F, Kiowski W. Natural course of moderate cardiac allograft rejection (International Society for Heart Transplantation grade 2) early and late after transplantation. *Circulation* 1996; 94: 1334-8.
243. Winters GL, McManus BM. Consistencies and controversies in the application of the International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation for heart transplant biopsy specimens. *Rapamycin Cardiac Rejection Treatment Trial Pathologists*. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 728-35.
244. Fishbein MC, Bell G, Lones MA, et al. Grade 2 cellular heart rejection: does it exist? *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 1051-7.
245. Milano A, Caforio AL, Livi U, et al. Evolution of focal moderate (International Society for Heart and Lung Transplantation grade 2) rejection of the cardiac allograft. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 456-60.
246. Clausell N, Butany J, Gadstone P, et al. Myocardial vacuolization, a marker of ischemic injury, in surveillance cardiac biopsies posttransplant: correlations with morphologic vascular disease and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Pathol* 1996; 5: 29-37.
247. Joshi A, Masek MA, Brown BW Jr, Weiss LM, Billingham ME. "Quilty" revisited: a 10-year perspective. *Hum Pathol* 1995; 26: 547-57.
248. Aull MJ, Buell JF, Trofe J, et al. Experience with 274 cardiac transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorder: a report from the Israel Penn International Transplant Tumor Registry. *Transplantation* 2004; 78: 1676-82.
249. Ziarkiewicz-Wróblewska B, Górnicka B, Suleiman W, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder: morphological picture and diagnostic difficulties. *Transplant Proc* 2006; 38: 168-72.
250. Smith RN, Brousaides N, Grazette L, et al. C4d deposition in cardiac allografts correlates with alloantibody. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1202-10.
251. Reed EF, Demetris AJ, Hammond E, et al; International Society for Heart and Lung Transplantation. Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 153-9.
252. Gallo P, Agozzino L, Angelini A, et al. Causes of late failure after heart transplantation: a ten-year survey. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 1113-21.
253. Paavonen T, Mennander A, Lautenschlager I, Mattila S, Häyry P. Endothelialitis and accelerated arteriosclerosis in human heart transplant coronaries. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12: 117-22.
254. Neish AS, Loh E, Schoen FJ. Myocardial changes in cardiac transplant-associated coronary arteriosclerosis: potential for timely diagnosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 586-92.