

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE VETERINARIE  
INDIRIZZO: SCIENZE CLINICHE VETERINARIE  
CICLO XXIV

**AMPIEZZA DELLA DISTRIBUZIONE ERITROCITARIA  
IN CANI CON MALATTIA DEGENERATIVA  
CRONICA VALVOLARE**

**Direttore della Scuola** : Ch.mo Prof. Massimo Morgante

**Coordinatore d'indirizzo**: Ch.mo Prof. Maurizio Isola

**Supervisore** :Ch.ma Prof.ssa Stefania Testoni

**Dottoranda** : Dott.ssa Angela Dalla Pria

## SOMMARIO

ACRONIMI .....	IV
RIASSUNTO .....	VI
ABSTRACT .....	VIII
1. INTRODUZIONE .....	1
2. LA MALATTIA DEGENERATIVA CRONICA VALVOLARE NEL CANE.....	3
2.1 Diagnosi clinica .....	6
2.2 Diagnosi radiografica.....	8
2.3 Diagnostica ecocardiografica .....	10
2.4 Diagnostica laboratoristica.....	13
I. <i>I peptidi natriuretici</i> .....	14
II. <i>Le troponine</i> .....	16
III. <i>Le catecolamine plasmatiche</i> .....	17
IV. <i>Le endoteline</i> .....	18
3. AMPIEZZA DI DISTRIBUZIONE ERITROCITARIA (RDW) IN MEDICINA UMANA E VETERINARIA	21
4. CONTRIBUTO SPERIMENTALE .....	25
4.1 Scopo .....	25
4.2 Materiali e metodi.....	26
I. <i>Pazienti</i> .....	26
II. <i>Valutazione cardiologica</i> .....	27
III. <i>Valutazione laboratoristica</i> .....	28

IV. <i>Analisi statistica</i> .....	28
4.3 Risultati.....	30
I. <i>Studio di popolazione</i> .....	30
II. <i>Analisi di laboratorio e variabili ecocardiografiche</i> .....	31
III. <i>Analisi dei livelli dell'RDW</i> .....	32
4.4 Discussione.....	41
4.5 Conclusioni .....	45
5. BIBLIOGRAFIA.....	46

## ACRONIMI

**ACVIM:** American College of Veterinary Internal Medicine

**ANP:** peptide natriuretico atriale tipo A

**AS:** atrio sinistro

**As/AO:** rapporto atrio sinistro aorta

**BNP:** peptide natriuretico atriale tipo B

**CI:** intervallo di confidenza

**CKCS:** cavalier King Charles spaniel

**DVSs:** diametro del ventricolo sinistro alla fine della sistole

**DVSd:** diametro del ventricolo sinistro alla fine della diastole

**E/A:** rapporto onda E onda A

**E'/A':** rapporto onda E' onda A'

**E/E':** rapporto onda E onda E'

**EDV-I:** indice del volume alla fine della diastole

**ESV-I:** indice del volume alla fine della sistole

**ET:** endoteline

**FA:** frazione di accorciamento

**FC:** frequenza cardiaca

**GC:** gittata cardiaca

**Hct:** ematocrito

**IC:** insufficienza cardiaca

**ICC:** insufficienza cardiaca congestizia

**IPA:** ipertensione polmonare arteriosa

**ISACHC:** Small Animal Cardiac Health Council

**MCHC:** concentrazione corpuscolare emoglobinica media

**MDCV:** malattia degenerativa cronica valvolare

**MVC:** volume corpuscolare medio

**OD:** odds ratio

**ODV:** Ospedale Didattico Veterinario

**RDW:** red distribution width

**RM:** rigurgito mitralico

**SNS:** sistema nervosa simpatico

**TNF $\alpha$ :** tumor necrosis factor  $\alpha$

**Vel. p. E:** velocità di picco del flusso transmitralico all'inizio della diastole

**VHS:** vertebral heart score

**VVSs:** volume del ventricolo sinistro alla fine della sistole

**VVSd:** volume del ventricolo sinistro alla fine della diastole

## RIASSUNTO

**Contesto:** In medicina umana alti livelli di ampiezza della distribuzione eritrocitaria (dall'inglese "*red distribution width*", RDW) sono stati associati a maggiori tassi di morbilità e mortalità in soggetti con insufficienza cardiaca (IC), inoltre è stato dimostrato che tale indice eritrocitario assume valore prognostico in pazienti affetti da IC.

**Ipotesi:** I livelli di RDW possono aumentare in corso di malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) del cane, sia con IC compensata che con IC scompensata.

**Animali:** Nello studio sono stati inclusi 294 animali, rispettivamente suddivisi in tre gruppi: di controllo (n= 25 cani), affetti da MDCV (n= 139 cani, di cui 91 con IC compensata [classe ISACHC 1a e 1 b] e 48 con IC scompensata [classe ISACHC 2 e 3]), affetti da altre patologie ma non da MDCV (n= 130 cani).

**Materiali e metodi:** Si tratta di uno studio retrospettivo che ha previsto in tutti gli animali la valutazione clinica più l'esecuzione di un profilo ematobiochimico completo; per il gruppo degli animali con MDCV e per il gruppo di cani sani è stato eseguito inoltre un esame ecocardiografico completo.

**Risultati:** La mediana dei valori dell'RDW dei cani affetti da MDCV (13,0%; range 11,0-18,4%) non è statisticamente differente rispetto a quella dei cani del gruppo di controllo (12,9%; range 11,8-14,5%), e a quella del gruppo di cani affetti da altre patologie ma non da MDCV (13,3%; range 11,0-22,6%). All'interno del gruppo di cani affetti da MDCV, il livello dell'RDW dei cani con IC compensata (12,9%; range 11,0-18,4%) non ha differenze statisticamente significative se paragonato con quello dei cani con IC scompensata (13,1%; range 11,3-15,8%). I livelli di RDW sono statisticamente e positivamente correlati con l'urea, ma in maniera debole (coefficiente di correlazione = 0,137,  $P = 0,019$ ), mentre sono correlati statisticamente ma debolmente e negativamente con l'ematocrito (coefficiente di correlazione = -0,278,  $P < 0,001$ ) e con la concentrazione emoglobinica (coefficiente di correlazione = -0,280,  $P < 0,001$ ). Non c'è alcuna correlazione tra il livello di RDW ed i parametri ecocardiografici indicatori di gravità di MDCV.

**Conclusioni:** I valori normali l'RDW non presentano innalzamenti nei cani con MDCV, se messi a confronto con i valori di cani sani e di cani affetti da altre patologie ma non da MDCV. Se si vorrà valutare il possibile valore prognostico dell'RDW in caso di MDCV nel cane, saranno necessari ulteriori studi.

## ABSTRACT

**Background:** Increased red cell distribution width (RDW) has been associated with adverse outcome in human patients with heart failure (HF), moreover RDW is a powerful prognostic marker in heart failure.

**Hypothesis:** RDW can be increased in dogs with chronic degenerative valvular disease (CDVD) with compensated or decompensated HF.

**Animals:** 294 dogs were included in the study; they were classified as control group (25 dogs, healthy), CDVD group (139 dogs, which dogs were 91 with compensated HF [ISACHC class 1a and 1b] and 48 with decompensated HF [ISACHC class 2 and 3]), other diseases without CDVD group (130 dogs).

**Methods:** Retrospective, case control study. The RDW was measured with an automated CBC analyzer and results were compared between groups.

**Results:** The median (range) level of RDW in dogs with CDVD, 13.0% (11.0-18.4%), was not significantly different compared either to that of healthy dogs, 12.9% (11.8-14.5%), and that of dogs with other diseases without CDVD, 13.3% (11.0-22.6%). The RDW level of dogs with CDVD and compensated HF, 12.9% (11.0-18.4%), was not significantly different to that of dogs with CDVD and decompensated HF, 13.1% (11.3-15.8%). The RDW level was positively but weakly correlated with urea levels (correlation coefficient = 0.137,  $P = 0.019$ ). The RDW level was significantly but weakly, negatively correlated with hematocrit (correlation coefficient = -.278,  $P < .001$ ) and hemoglobin concentration (correlation coefficient = -.280,  $P < .001$ ), and significantly but weakly correlated with serum urea (correlation coefficient = .137,  $P = .019$ ). No correlation was found between the RDW level and echocardiographic indices of CDVD severity.

**Conclusions and Clinical Importance:** The RDW is not increased in dogs with CDVD and is not correlated with echocardiographic indices of valvular disease severity. The prognostic significance of RDW in dogs with CDVD merits further investigation.

## 1. INTRODUZIONE

La presente tesi dottorale tratta della *malattia degenerativa cronica valvolare* (MDCV) del cane. Tale patologia ha maggior prevalenza specialmente nei soggetti maschi di età avanzata e di piccola taglia. Nel bassotto tedesco e nel Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), inoltre, è stata dimostrata una forte ereditarietà della patologia, in particolare, un recente studio di Madsen e colleghi (2011) ha identificato in questa ultima razza due *loci* che sono associati con lo sviluppo dell'MDCV.

La malattia è caratterizzata da una lunga fase preclinica seguita da una progressione cronica (Borgarelli *et al*, 2008). Nei cani che sviluppano insufficienza cardiaca congestizia (ICC) dovuta a MDCV, i sintomi generalmente sono progressivi ed i tempi di sopravvivenza, nonché la qualità di vita, variano considerevolmente da soggetto a soggetto (Haggstrom, 2009). Alcune tra le variabili correlate ai tempi di sopravvivenza sono la *compliance* del proprietario nel fornire cure adeguate, i trattamenti somministrati e l'eventuale presenza di altre complicazioni cardiovascolari come l'ipertensione polmonare o la rottura di una corda tendinea (Borgarelli, Savarino, Crosara, 2008).

La diagnosi di MDCV tipicamente prevede l'esecuzione di un'accurata indagine clinica, radiografica e ecocardiografica, ma studi recenti si sono indirizzati alla valutazione di biomarker circolanti utili sia a fini diagnostici sia prognostici, caratterizzati da bassi costi, rapidi protocolli di esecuzione e tempi rapidi di risposta. A questo scopo sono state studiate diverse sostanze, ma, per la bibliografia da noi consultata, non è ancora stato valutato l'utilizzo dell'ampiezza di distribuzione eritrocitaria (RDW, dall'inglese "*red cell distribution width*") come marker prognostico in corso di cardiopatia nel cane. Tale parametro è stato recentemente caratterizzato da utile significato prognostico negativo in pazienti umani affetti da diverse forme di malattie cardiache associate a insufficienza cardiaca. La presente trattazione ha pertanto lo scopo di studiare l'eventuale correlazione dei valori di RDW con la MDCV in soggetti di specie canina.



## 2. LA MALATTIA DEGENERATIVA CRONICA VALVOLARE NEL CANE

La *malattia degenerativa cronica valvolare* (MDCV) trova nella letteratura scientifica veterinaria più appellativi, tra i quali *degenerazione mixomatosa valvolare*, *endocardiosi*, *insufficienza o rigurgito acquisito valvolare*. Nel corso della presente tesi verrà utilizzata quella che, a parere della scrivente, è la definizione più corretta di questa patologia, vale a dire *malattia degenerativa cronica valvolare*.

L'MDCV è la cardiopatia acquisita più comune nel cane, nel quale rappresenta circa il 75% delle malattie cardiache; sebbene sia più diffusa nei soggetti di piccola taglia, può essere diagnosticata anche in cani di grossa mole. La sua prevalenza è correlata all'età e alla razza: è più frequente tra pazienti adulti- anziani, (Borgarelli e Haggstrom, 2010); inoltre, nei cani di razza CKCS e bassotto tedesco è stata dimostrata una forte ereditarietà della patologia (Lewis *et al*, 2011). Considerando cani meticci e di razza, i maschi sono più spesso affetti rispetto alle femmine, sviluppano più rapidamente ICC (Häggsström *et al*, 1992; Pedersen *et al*, 1999b; Serfass *et al*, 2006) anche all'interno di una stessa famiglia, e la malattia generalmente si manifesta in forma più grave (Borgarelli *et al*, 2008).

Alterazioni simili a questa patologia, si manifestano anche nell'uomo, cavallo e maiale; nell'uomo la condizione che presenta affinità con la MDCV del cane è chiamata "sindrome del prolasso mitralico" (Pedersen e Häggström, 2000; Reef *et al*, 1998; Gogna *et al*, 1998).

L'MDCV è causata da una progressiva degenerazione mixomatosa della valvola mitralica, la quale può essere accompagnata o meno da un concomitante coinvolgimento delle altre valvole (Borgarelli *et al*, 2008). Nel cane il 62% dei soggetti presenta alterazioni a carico della sola valvola mitralica, il 32,5% ha l'interessamento di sia della mitrale che della tricuspide, l'1.3% ha solamente coinvolta la valvola tricuspide (Buchanan, 1977).

I cambiamenti fisiopatologici che si verificano in corso di MDCV provocano ispessimento dei lembi valvolari e conseguente malfunzionamento degli stessi, determinando così rigurgito valvolare. Si assiste ad una degenerazione valvolare con distruzione

dell'architettura della matrice delle fibre collagene ed elastiche, nonché accumulo di proteoglicani all'interno della spongiosa valvolare. Anche le corde tendinee vengono coinvolte: divengono spesse e deboli e possono andare incontro a rottura (Obayashi *et al*, 2011).

Considerato che non tutti i cani sviluppano MDCV, probabilmente uno o più fattori primari iniziali aumentano il rischio di sviluppare la patologia negli animali predisposti. La natura dei fattori scatenanti ad oggi è sconosciuta, sebbene si creda che alcune anomalie del collagene e di altre componenti della matrice extracellulare possano predisporre allo sviluppo della patologia (Loardi *et al*, 2010). Resta comunque il sospetto di una base ereditaria (Obayashi *et al*, 2011), ad oggi dimostrata solo nel CKCS e nel bassotto tedesco. In queste razze, infatti, alcuni studi hanno evidenziato una ereditarietà di tipo poligenico, ciò significa che dall'accoppiamento di cani che presentano precocemente la patologia, nascerà una progenie che mediamente presenterà la malattia altrettanto precocemente. In molti paesi, infatti, si stanno ponendo delle misure sugli accoppiamenti in tali razze, per poter ridurre l'incidenza dell'MDCV tramite l'esclusione dei riproduttori che sviluppano precocemente soffi cardiaci auscultabili, o che all'esame ecocardiografico presentano segni di malattia (Haggstrom *et al*, 1992; Pedersen, 1995).

L'MDCV è caratterizzata da una lunga fase preclinica seguita da una progressione cronica; comunque cani in fase preclinica frequentemente muoiono per svariati altri motivi senza mai sviluppare ICC (Borgarelli *et al*, 2008).

Il rigurgito mitralico (RM) che consegue alla degenerazione mixomatosa della valvola, se di lieve entità, non provoca apparenti modificazioni delle camere cardiache o degli spessori delle pareti, né della funzione di pompa; la gittata cardiaca (GC) è perciò mantenuta e la piccola quantità di sangue rigurgitante è facilmente accolta dall'atrio sinistro (AS). Con la progressione delle lesioni valvolari, e quindi del RM, la diminuzione della GC anterograda è compensata da un aumento di quella totale e da un accrescimento della forza di contrazione (Haggstrom *et al*, 1997); tutto ciò provoca rimodellamento cardiaco (caratterizzato da dilatazione atriale e ventricolare sinistra), nonché ipertrofia miocardica eccentrica (Killingsworth *et al*, 2008), aumento della frequenza cardiaca (FC), modulazione del tono vascolare sistemico e del volume dei fluidi extracellulari (Haggstrom *et al*, 1997). Le conseguenze principali della dilatazione dell'AS includono la compressione del bronco principale sinistro, lo sviluppo di aritmie sopraventricolari e l'aumento della pressione del letto polmonare, che porta alla formazione di edema (Guglielmini, 2003). L'attivazione

neurormonale ed il restringimento delle piccole arterie coronariche, possono inoltre giocare un ruolo importante nella patogenesi del rimodellamento ventricolare sinistro (Killingsworth *et al*, 2008).

La diminuzione della gittata cardiaca anterograda e l'aumento della pressione idrostatica intracardiaca che avvengono in corso di MDCV, stimolano l'attivazione di sistemi neurormonali multipli, i quali hanno l'obiettivo di mantenere il flusso ematico e la pressione ematica. Per raggiungere tali scopi essi determinano un aumento della ritenzione renale di sodio e acqua, nonché vasocostrizione periferica; questi meccanismi sono ulteriormente favoriti dall'attivazione del sistema arginina-vasopressina e del sistema dell'endotelina-1. Il sistema dei peptidi natriuretici, invece, provvede a controbilanciare questi meccanismi tramite la stimolazione della diuresi e della vasodilatazione. In corso di MDCV avanzata gli effetti benefici stimolati dai peptidi natriuretici vengono sopraffatti, perciò vengono ulteriormente stimolate la vasocostrizione e la ritenzione di fluidi; tutto questo porta aumento del postcarico, rimodellamento cardiaco e sviluppo di ICC (Oyama, 2009).

I fattori di rischio che possono determinare la progressione della malattia sono l'età, il sesso, l'intensità del soffio cardiaco, il grado del prolasso valvolare, la severità delle lesioni valvolari ed il grado del RM (Borgarelli *et al*, 2008). Oltre a ciò, varie sono le complicazioni che in un cane affetto da MDCV in forma asintomatica possono accelerarne lo scompenso; tra queste ci sono l'ipertensione polmonare, la rottura delle corde tendinee, i problemi renali e le aritmie cardiache (Chetboul *et al*, 2009).

Uno studio di Pouchelon *et al* (2008) con un *follow up* della durata media di 1,8 anni, ha evidenziato che solamente il 17% dei cani con RM asintomatico ha poi sviluppato segni di ICC; in ogni modo non si conosce quale sia l'esatta percentuale di cani affetti da MDCV che poi potrà sviluppare ICC. Ad oggi le variabili che più si sono mostrate efficaci nel predire l'eventuale sviluppo di ICC non cambiano drammaticamente fino a quando essa non è imminente o addirittura presente; tra queste variabili ci sono parametri ecocardiografici, radiografici e neurormonali che verranno discussi in seguito.

Un lieve grado di MDCV, comunque, deve essere considerato una condizione relativamente benigna, vista la storia naturale della patologia ed il basso rischio che essa possa portare a morte improvvisa (Kvart *et al*, 2002; Atkins *et al*, 2007).

## 2.1 Diagnosi clinica

Tosse, dispnea, sincopi ed intolleranza all'esercizio (Serres *et al*, 2009) provocati da ICC sinistra, nonché ascite o effusione pleurica dovute a ICC destra secondaria ad ipertensione polmonare arteriosa (IPA), sono i rilievi anamnestici generalmente segnalati nei pazienti affetti da MDCV (Chetboul *et al*, 2009). I cani con grado lieve o moderato di MDCV saltuariamente mostrano segni clinici ed alcuni soggetti possono non sviluppare mai alcun sintomo; al contrario, i soggetti con grado severo di MDCV e RM, caratterizzato da dilatazione atriale e ventricolare sinistra, sono a maggior rischio di sviluppare segni di ICC (Haggstrom, Hoglund, Borgarelli, 2009).

Ad oggi non esiste un “*gold standard*” per diagnosticare MDCV di grado moderato, comunque si emette un sospetto diagnostico quando all'esame clinico di un paziente col tipico segnalamento viene auscultato un **soffio** dolce, olosistolico o pansistolico, che ha maggior intensità sopra all'area di proiezione mitralica, ovvero a livello di apice cardiaco sinistro. Questo soffio può essere avvertito durante ogni battito, ma può anche essere intermittente (Haggstrom, Hansson, Kwart, 1995; Pedersen *et al*, 1999a). Nei casi più gravi, in conseguenza della dilatazione atriale e ventricolare sinistra, ed in alcuni pazienti, a causa della concomitante presenza di rigurgito tricuspide, il soffio può irradiarsi alla base del cuore e all'emitorace destro. In uno stadio veramente precoce della patologia, si può riuscire ad auscultare solamente un click midsistolico intermittente (Pedersen e Haggstrom, 2000). I pazienti con RM moderato generalmente hanno il primo suono cardiaco di maggiore intensità, mentre in presenza di rigurgito severo si può rilevare anche un terzo suono cardiaco. Studi eseguiti su soggetti di CKCS hanno dimostrato che l'intensità del soffio assume valore prognostico (Haggstrom *et al*, 1992; Pedersen *et al*, 1999a; Kwart *et al*, 2002; Olsen *et al*, 2003), tuttavia questa correlazione non è emersa in un lavoro che includeva soggetti di altre razze (Borgarelli *et al*, 2008). Nei cani di grossa taglia a tal riguardo, l'intensità del soffio non pare assumere valore prognostico, probabilmente perché spesso presentano fibrillazione atriale ed insufficienza miocardica, le quali evenienze possono influenzare l'intensità del soffio (Borgarelli, Zini, D'Agnolo, 2004).

Il **polso femorale** in corso di MDCV generalmente è normale, ma in presenza di grave RM può essere celere (Kittleson e Kienle, 1998).

La **tosse** è un sintomo spesso presente: può essere una conseguenza dell'edema polmonare dovuto a ICC, oppure può essere legata a sottostanti patologie respiratorie (Oyama e Singletary, 2010). Questo sintomo, in ogni modo, può essere dovuto alla compressione esercitata dall'atrio sinistro dilatato sul bronco principale sinistro, ma ciò avviene soprattutto in presenza di broncomalacia primaria (Ettinger e Kantroviz, 2005). Spesso, infatti, i cani di piccola taglia ed in età geriatrica, sono affetti sia da patologie tracheobronchiali che da MDCV (Oyama e Singletary, 2010); in tali soggetti però, la tosse generalmente è conseguenza della patologia respiratoria primaria. Alla luce di quanto detto, può essere difficile valutare esattamente quale sia l'agente scatenante la tosse nei cani affetti sia da MDCV che da patologie respiratorie croniche (Takemura *et al*, 2009); per confermare o escludere la presenza di una patologia respiratoria primaria associata a MDCV, è necessario quindi eseguire un attento esame radiografico del torace.

I **rumori polmonari** in corso di MDCV possono essere normali, oppure possono essere presenti dei crepitii se c'è edema polmonare cardiogeno; ancora, si possono auscultare fischi e rantoli in soggetti con concomitanti patologie respiratorie (Kittleson e Kienle, 1998).

Uno studio di Crosara S. *et al* (2010) ha dimostrato che nei cani affetti da MDCV spesso sono presenti **disturbi del ritmo**, e che la dilatazione dell'atrio sinistro è associata ad un maggior rischio di sviluppo di aritmie sopraventricolari. Le aritmie più comuni in corso di MDCV sono le tachiaritmie, le quali sono associate con la severità della patologia mitralica, e le più comuni sono la fibrillazione atriale o la tachicardia sopraventricolare intermittente (Borgarelli *et al*, 2008)

La presenza di **sincope** in cani affetti da MDCV è stata correlata con elevati tassi di mortalità; esse possono essere indotte da tachiaritmie o bradiaritmie, da strenuo esercizio, da tamponamento cardiaco e da ipertensione polmonare (Borgarelli *et al*, 2008).

## 2.2 Diagnosi radiografica

Le radiografie del torace, insieme all'esame fisico, risultano essenziali per monitorare i pazienti affetti da MVCD: è raccomandabile l'esecuzione di proiezioni laterali destre e dorsoventrali, invece delle classiche laterali sinistre e ventrodorsali, che classicamente sono impiegate per indagare il torace (Hansson, Haggstrom, Kwart, 2009). I segni radiografici che solitamente si evidenziano in corso di tale patologia sono: ingrandimento dell'ombra cardiaca e dell'AS, eventuale aumento di radiopacità interstizio-alveolare conseguente alla presenza di edema polmonare (Häggsström *et al* 1997, Kittleson e Kienle 1998, Lord e Suter 1999, Sisson *et al* 1999), dilatazione delle vene polmonari, dislocazione dorsale della carena, della trachea e del bronco principale sinistro in seguito alla dilatazione dell'AS (Guglielmini, 2003). Un'attenta valutazione delle radiografie può rivelare la presenza di concomitanti patologie respiratorie primarie, come la malattia tracheobronchiale, o neoplasie polmonari che potrebbero essere la causa della tosse.

Per stabilire le dimensioni della silhouette cardiaca si può utilizzare il metodo del "vertebral heart score" (VHS). Tale tecnica è di semplice esecuzione e le misurazioni sono relativamente indipendenti dalle variabili paziente-dipendenti (ad esempio la conformazione del torace, il sesso ed il lato del decubito) ed operatore-dipendenti (come il livello di esperienza). Tramite il VHS si valutano le dimensioni della silhouette cardiaca in radiografie laterali toraciche: si misurano l'asse lungo e l'asse corto cardiaco, quindi li si compara con le vertebre toraciche. Il VHS, in pratica, non è altro che la somma dei due assi, ognuno misurato in direzione caudale, a partire dal limite craniale della quarta vertebra toracica. Valori normali di VHS nel cane sono inferiori o uguali a 10,5, tranne che per alcune razze come i boxer o i CKCS, che normalmente hanno valori più elevati. I cani affetti da MDCV e con segni chiaramente riconducibili a tosse di origine cardiaca, hanno misure di VHS maggiori se comparate con quelle di cani affetti da tosse non di origine cardiaca (Guglielmini *et al*, 2009).

Per valutare l'eventuale presenza di edema polmonare cardiogeno, è necessario concentrare la propria attenzione a livello di regioni polmonari ilari e caudo-dorsali, nelle quali usualmente l'edema si localizza e si manifesta con un pattern interstiziale sfocato non organizzato; questo ultimo eventualmente può progredire nel pattern interstiziale. La distribuzione di tale immagine nei lobi caudali generalmente è simmetrica, tuttavia in circa un terzo di pazienti affetti da RM può essere asimmetrica e interessare il solo lobo caudale destro (Diana *et al*, 2009).

Concludendo, l'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) raccomanda l'esecuzione di un esame radiografico del torace in tutti i cani affetti da MDCV allo scopo di stimare l'importanza emodinamica del RM e di ottenere un punto di partenza nel momento in cui il paziente sia ancora asintomatico (Atkins, Bonagura, Ettinger, 2009).

## 2.3 Diagnosi ecocardiografica

L'indagine ecocardiografica è indispensabile per emettere una diagnosi di MDCV, per escludere l'eventuale presenza di altre anomalie che possono portare a RM (come la displasia della valvola mitralica) (Borgarelli e Haggstrom, 2010), nonché per individuare l'eventuale presenza di patologie cardiovascolari concomitanti.

L'ecocardiografia permette di valutare la natura della lesione valvolare, la severità del RM, il grado di rimodellamento cardiaco, la presenza di disfunzione sistolo- diastolica, inoltre può fornire informazioni che possono indicare un aumento della pressione intravascolare (O'Gara *et al*, 2008). Essa ha gli svantaggi, tuttavia, di essere una tecnica che richiede un lungo periodo di esecuzione e di essere costosa, oltre che necessitare di un operatore esperto.

Per diagnosticare con l'ecocardiografia l'MDCV è necessario che venga evidenziata una morfologia valvolare anomala ed insufficienza valvolare, anche se l'una o l'altra possono non essere contemporaneamente presenti (Haggstrom *et al*, 2004). Le caratteristiche morfologiche dell'MVCD includono il prolasso e/o l'ispessimento di uno o entrambi i lembi valvolari mitralici. Con l'ecocardiografia bidimensionale il prolasso mitralico si presenta come un anomalo dislocamento sistolico dei lembi valvolari verso l'AS. Alcuni studi, suggeriscono che la proiezione parasternale destra quattro camere in asse lungo sia, nel cane, quella *gold standard* per identificarne l'eventuale presenza; è comunque consigliabile eseguire almeno due diverse proiezioni per averne conferma (Pedersen *et al*, 1996). Per verificare se i lembi mitralici sono ispessiti o meno, essi vengono confrontati con quelli della valvola aortica: devono essere simili, altrimenti, in corso di MDCV, possono essere lievemente ispessiti e lisci o anche diventare spessi ed irregolari (Boon JA, 2006). Quando, infatti, si osserva la valvola mitralica tramite l'ecocardiografia bidimensionale, è importante esaminarla *in toto*, perché spesso le lesioni sono distribuite in maniera non uniforme: solitamente le alterazioni degenerative appaiono più evidenti a livello di valva anteriore, proprio a livello del punto di inserzione delle corde tendinee. Oltre ad una compromissione valvolare, anche le corde tendinee possono appunto essere coinvolte: esse possono divenire ispessite ed allungate e con la progressione della malattia possono arrivare a rompersi, portando alla fluttuazione di un lembo valvolare durante il ciclo cardiaco.

Tramite l'esame ecocardio Doppler, spettrale o a flusso di colore, è possibile individuare e quantificare il RM; per allinearsi meglio a tale flusso la finestra ecografica ideale è

rappresentata dalla parasternale sinistra apicale quattro camere. Il Doppler spettrale viene impiegato per identificare il jet rigurgitante quando non si dispone del color Doppler; inoltre esso fornisce informazioni sulla velocità del jet di rigurgito e, quindi, permette di stimare il volume rigurgitante. Il color Doppler, invece, conferma la presenza del jet di rigurgito e consente di paragonare le dimensioni di tale jet con quelle dell'AS; questa misurazione è però semiquantitativa. Nel caso in cui sia richiesta una più esatta misurazione della frazione rigurgitante, si possono impiegare due diversi metodi (Haggstrom *et al*, 2004). La metodica PISA prevede l'utilizzo del color Doppler, che è un tipo di Doppler pulsato: quando la velocità del flusso transmitralico oltrepassa il limite di Nyquist, la mappa di colore varia da un colore al suo opposto. Questo fenomeno è impiegato nello studio della frazione rigurgitante mitralica perché, in corso di RM, il sangue all'interno del ventricolo sinistro subisce durante la sistole un'accelerazione, proprio nel momento in cui attraversa l'orifizio della valvola mitralica. Quando la velocità del flusso aumenta ed oltrepassa il limite di Nyquist, si registra un netto cambiamento del colore nell'immagine. La velocità del flusso al confine di tali variazioni di colore è determinata dal limite di Nyquist e, utilizzando le caratteristiche di questa zona di passaggio (velocità lungo tale confine e dimensioni del confine), è possibile calcolare la quota del flusso rigurgitante. Una tecnica alternativa a quella applicata con la metodica PISA, prevede che si sottragga il flusso anterogrado passante attraverso la valvola aortica in sistole da quello passante attraverso la valvola mitralica durante la diastole (Kittleson e Brown, 2003).

In corso di RM la funzionalità ventricolare sistolica e diastolica possono essere diminuite: queste informazioni in medicina umana sono indispensabili per guidare gli interventi chirurgici, ma in veterinaria non risultano così importanti, perché raramente vengono tentati approcci chirurgici. Queste informazioni, comunque, possono aiutarci a comprendere al meglio la storia naturale della patologia, a formulare una più accurata prognosi e a guidare gli interventi terapeutici.

Una diminuzione della funzionalità ventricolare sistolica porta ad avere frazione di eiezione (FE) e frazione d'accorciamento (FA) aumentate (generalmente la FA è maggiore del 50% se non si è in corso di disfunzione miocardica, tra il 33 ed il 45% quando c'è alterazione della contrattilità miocardica; tutto questo avviene a causa dell'aumento del precarico e della diminuzione del poscarico), diametro del ventricolo sinistro alla fine della sistole (DVSs) o volume del ventricolo sinistro alla fine della sistole (ESV-I) aumentati, ridotta escursione della parete ventricolare sinistra, ridotto ispessimento della parete ventricolare sinistra. Una

diminuzione della funzionalità ventricolare diastolica è, invece, caratterizzata da ridotto rapporto onda E onda A (E/A) del flusso transmitralico, diminuita velocità E' e rapporto onda E' onda A' (E'/A') con il doppler tissutale. Oltre a ciò in corso di RM si può assistere ad aumento delle pressioni di riempimento; questo fa aumentare il diametro (DVDd) ed il volume del ventricolo sinistro (VVSd) alla fine della diastole, fa sì che ci sia un pattern di riempimento pseudo normale in pazienti che precedentemente avevano un rilassamento anomalo o in cani con più di dieci anni d'età, aumenta la velocità della fase precoce dell'onda E del flusso transmitralico, incrementa il rapporto onda E onda E' (E/E') col doppler tissutale, diminuisce il tempo di decelerazione dell'onda E trans-mitralica ed il tempo di rilasciamento isovolumetrico, etc (Bonagura e Schober, 2009).

Alcune variabili ecocardiografiche possono essere davvero utili nell'identificazione di soggetti ad alto rischio di progressione della patologia; tra queste la dilatazione dell'AS sembra essere la più affidabile (Borgarelli, Savarino, Crosara, 2008). Per predire l'eventuale insorgenza di ICC in corso di MDCV è molto importante valutare il rapporto AS aorta (AS/Ao), il DVSD ed il DVSS, l'indice del volume alla fine della diastole (EDV-I) e quello alla fine della sistole (ESV-I), nonché il pattern del flusso transmitralico (Haggstrom *et al*, 2009).

## 2.4 Diagnosi laboratoristica

L'MDCV provoca una diminuzione della GC ed un aumento della pressione idrostatica intracardiaca, ciò stimola la risposta di più sistemi neurormonali, che mantengono livelli adeguati di GC, pressione ematica e perfusione tissutale (Oyama, 2009). Tramite l'attivazione di tali sistemi, variano i livelli degli ormoni e di neurotrasmettitori da essi coinvolti, ma anche di altre sostanze attive a livello di apparato cardiocircolatorio; tutte queste sostanze le quali, grazie ad indagini laboratoristiche, possono o potranno in futuro essere rilevate e quantificate. Sia in medicina umana che in medicina veterinaria, infatti, è stato proposto l'utilizzo di biomarker a fini diagnostici e prognostici in corso di malattia cardiaca.

Questo settore della diagnostica, infatti, è sempre più in espansione, perché potrebbe offrire il vantaggio di fornire una rapida diagnosi di malattia cardiaca, senza la necessità di eseguire indagini collaterali costose o che richiedono strumenti sofisticati e personale adeguatamente preparato. Oltre a ciò, una volta in possesso di una diagnosi (ottenuta con gli strumenti classici o con questi marker), monitorando i livelli di tali sostanze, si potrebbe teoricamente capire come evolve il decorso della patologia e, quindi il clinico potrebbe avere un aiuto per decidere se variare o meno la terapia somministrata; ancora, si potrebbe formulare una prognosi più accurata e, quindi, valutare l'eventuale rischio di morte acuta.

Tra i marker più valutati in medicina veterinaria in corso di malattia cardiovascolare, sicuramente bisogna annoverare i peptidi natriuretici e le troponine, ma sono stati oggetto di studio anche le catecolamine plasmatiche, le endoteline ed altre sostanze che ad oggi sono state meno studiate come la vasopressina, l'adrenomedullina, l'interleuchina ST2, la proteina C reattiva, etc. Booswood (2008) ha proposto una suddivisione dei marker soppraccitati tra le seguenti categorie: da danno miocitario (troponina-I e troponina-T), da stress miocitario (peptidi natriuretici, adrenomedullina, interleuchina ST2), da rimodellamento (metalloproteinasi di matrice ed inibitori tissutali delle metallo proteinasi), da disfunzione endoteliale (P-selectina, dimetilarginina simmetrica ed asimmetrica, fattore di Von Willibrand, L-arginina, metaboliti dell'ossido nitrico), da infiammazione (proteina C reattiva, interleuchine, *tumor necrosis factor*  $\alpha$ ), marker neurormonali (endotelina-1, grande endotelina-1). Oltre a fornire questa suddivisione, egli ha sottolineato le potenziali applicazioni cliniche dei biomarker, quali: individuazione di patologie subcliniche, diagnosi di sindromi acute o croniche, stratificazione del rischio dei pazienti, monitoraggio della progressione della malattia o della risposta alla terapia, scelta della terapia migliore.

## I. I peptidi natriuretici

La famiglia dei peptidi natriuretici (NP) comprende un gruppo di peptidi che nei vertebrati è collegato filogeneticamente, funzionalmente e strutturalmente, la cui funzione principale consiste nella regolazione dell'omeostasi dei fluidi. Ad oggi sono stati scoperti sei NP; tra essi, in cardiologia dei piccoli animali è stato maggiormente studiato il tipo A (ANP) ed il tipo B (BNP), considerati marker di aumento dello stress miocardico (Braunwald, 2008). Nell'uomo la produzione ed il rilascio di ANP e BNP sono legate principalmente alla distensione del tessuto miocardico, sebbene stimoli come l'attivazione del sistema nervoso simpatico (SNS) e del sistema renina-angiotensina-aldosterone, l'endotelina 1, l'ischemia e l'infiammazione possano anch'essi attivarne il rilascio (Goetze *et al*, 2003; Magga *et al*, 1998; Redemaker, 2004; Vila *et al*, 2008; Wiese *et al*, 2000).

L'ANP e il BNP (ma anche gli altri NP) sono prodotti in forma di pre pro ormoni, i quali vengono clivati prima in pro ormoni (proANP e proBNP) e, quindi, in ormoni attivi. Sono poi scissi da specifiche proteasi sieriche in un frammento attivo carbossi-terminale (C-ANP e C-BNP), ed in uno inattivo ammino-terminale (NT-proANP e NT-proBNP) (Potter *et al*, 2009; Mair, 2008).

La loro azione è mediata da due recettori principali, che si trovano in quantità predominante nei reni, polmoni, vasi e ghiandole surrenali. Una volta legati ai recettori stimolano la produzione di guanina-ciclica-monofosfato, la quale determina vasodilatazione, aumento del flusso ematico glomerulare e del tasso di filtrazione, ridotto il riassorbimento di sodio, natriuresi e diuresi (Oyama, 2009). La variabilità degli effetti che l'ANP ed il BNP sono in grado di determinare dipende principalmente dalle differenze della loro espressione e produzione locale (Kimmenade e Jannuzzi, 2009).

E' ampiamente dimostrato che questi peptidi sono marker di patologia cardiaca e di severità della malattia cardiaca (Moonarmart *et al*, 2010); in medicina umana, esistono studi che ne prevedono l'impiego come agenti terapeutici in corso di cardiopatie (Lisy *et al*, 2001; Lea e Burnett, 2007), infatti, in corso di insufficienza cardiaca (IC) acuta l'infusione di BNP è associata a miglioramenti emodinamici e sintomatici (Publication Committee for the VMAC Investigators, 2002). In medicina veterinaria ci si è concentrati prevalentemente sullo studio dell'ANP e del BNP; per di più, considerato che i frammenti NT-proANP e NT-proBNP hanno maggior emivita (Hunt *et al*, 1999; Cowie *et al*, 1997) e sono più stabili quando vengono

raccolti e maneggiati, è più semplice misurare i livelli di questi due metaboliti (Serres *et al*, 2009). Ancora, in generale, i peptidi N-terminali sono marker più sensibili di patologia cardiaca rispetto ai peptidi C-terminali, ed i loro livelli tendono ad essere maggiormente correlati con la severità della cardiopatia sottostante (Hunt *et al*, 1999; Cowie *et al*, 1997).

Secondo gli studi più recenti, pare che in cani con segni respiratori dovuti a cause sconosciute ci siano maggiori indicazioni per testare l'NT-proBNP: valori inferiori a 900 pmol/L sono altamente specifici di patologie respiratorie, mentre risultati superiori a 1800 pmol/L sono specifici di ICC. È, quindi, possibile discriminare l'origine di segni quali la tosse, anche se valori intermedi tra 900 e 1800 pmol/L devono essere interpretati con cautela: ecco perché i livelli di questa molecola dovrebbero sempre essere considerati all'interno del quadro clinico completo (Fine *et al*, 2008; Oyama *et al*, 2009).

Serres e colleghi (2009) hanno evidenziato che le concentrazioni di NT-proBNP hanno una forte correlazione con la severità clinica dell'MDCV, e che questa molecola è in grado di predire la mortalità dovuta a cause cardiache in cani affetti da MDCV sintomatica; tuttavia ulteriori studi sono richiesti per meglio definire i valori diagnostici e le popolazioni *target*.

Dosaggi ripetuti dell'NT-proBNP possono anche essere utili nel guidare le terapie: uno studio pilota di Achen *et al* (2009) ha evidenziato che le variazioni dei livelli di questa molecola in cani affetti da MDCV, erano sempre in accordo con le decisioni terapeutiche prese dai cardiologi. In questo lavoro i pazienti in terapia erano periodicamente monitorati tramite le convenzionali metodiche diagnostiche, quindi i clinici, conoscendo solo gli esiti di tali indagini ma non i livelli di NT-proBNP, decidevano se variare o meno il dosaggio del diuretico. I risultati ottenuti suggeriscono che le concentrazioni del suddetto biomarker, cambiano in concomitanza con le condizioni cliniche e, quindi, possono aiutare il cardiologo nelle scelte terapeutiche. Questo però è l'unico studio a riguardo e, visto che i lavori di medicina umana hanno risultati contraddittori, saranno richiesti ulteriori studi di approfondimento.

Il dosaggio dell'NT-proBNP non è scevro da alcune limitazioni, ad esempio patologie concorrenti (come problemi renali, patologie infettive, ipertensione sistemica e polmonare) e la somministrazione di farmaci che variano il volume ematico (diuretici), possono influenzarne le concentrazioni. Oltre a ciò, la stabilità della molecola in vivo è altamente tempo e temperatura-dipendente: ecco perché è utile eseguire un monitoraggio sempre insieme alla valutazione completa del quadro clinico. Ancora, considerato che l'NT-proBNP è in parte

escreto tramite la filtrazione renale, nei pazienti con problemi renali e diminuita filtrazione glomerulare, i valori ottenuti sono maggiori rispetto a quelli di pazienti non affetti da tali patologie, dando a volte dei falsi positivi o negativi. Questo ultimo fenomeno può però essere parzialmente ovviato utilizzando valori normalizzati per l'azotemia. È, inoltre, necessario ricordare che oltre a variare in corso di patologia, i livelli di NT-proBNP fluttuano in uno stesso paziente di giorno in giorno, probabilmente a causa del ritmo circadiano o delle variazioni del volume ematico, e che il metodo di raccolta dei campioni, di maneggiamento ed i protocolli di spedizione possono influenzare i risultati ottenuti (O'Hanlon *et al*, 2007; Wu Ah, 2006).

Concludendo, nonostante siano emerse alcune problematiche dagli studi che hanno verificato l'utilità di queste molecole, molte sono le indicazioni per andare ad approfondire le nostre conoscenze a riguardo.

## II. *Le troponine*

Le troponine sono sostanze ampiamente studiate in corso di patologia cardiaca. Esse sono un complesso di proteine intracellulari formato da 3 subunità (cTnI, cTnT e cTnC) che aiutano a regolare l'accoppiamento eccitazione-contrazione delle proteine del sarcomero (Oyama e Sisson, 2004). Normalmente all'interno del sistema circolatorio sono presenti in quantità così esigue da non essere rilevabili con le metodiche ad oggi a nostra disposizione (Wallace *et al*, 2006). La cTnI è la componente inibitoria del complesso delle troponine cardiache ed impedisce l'interazione tra l'actina e la miosina fino a quando il calcio intracellulare è legato dalla cTnC. La cTnI normalmente è unita ai filamenti di actina tramite la cTnC, ma in risposta a danni del sarcomero si stacca, perciò viene rilasciata nel citosol e nello spazio extracellulare. Esiste un'alta omologia della sequenza amminoacidica tra la cTnI umana e quella canina, permettendo l'impiego di kit prodotti ad uso umano anche per campioni ematici canini (Guglielmini *et al*, 2010).

Alte concentrazioni di cTnI e cTnT sono un indicatore sensibile e specifico di danno miocardico e necrosi cellulare; in corso di cardiomiopatia, MDCV e stenosi subaortica congenita, infatti, molto spesso si registra un innalzamento dei loro livelli plasmatici. Studi condotti su persone con cardiopatie croniche indicano che lievi aumenti delle troponine sono probabilmente dovuti alla progressione della degenerazione subclinica dei miociti, la quale è associata al peggioramento delle condizioni cliniche (Oyama e Sisson, 2004). In corso di MDCV

la concentrazione di cTnI è aumentata sia in cani con ipertensione precapillare che postcapillare (Guglielmini *et al*, 2010). Probabilmente in futuro le concentrazioni delle troponine cardiache potranno essere impiegate per valutare il rischio di stratificazione in alcune popolazioni canine (Church *et al*, 2007), mentre sembra che in cani con embolismo polmonare acuto il loro impiego sia di valore limitato (Guglielmini *et al*, 2010). C'è, inoltre, una lieve evidenza nella letteratura veterinaria che esse possano essere utilizzate per valutare la risposta alle terapie instaurate (Connolly *et al*, 2005).

### III. *Le catecolamine plasmatiche*

Le catecolamine plasmatiche (adrenalina e noradrenalina) sono ormoni a basso peso molecolare sintetizzati a partire dall'amminoacido L-tirosina, vengono rilasciate dal SNS presente a livello di midollare surrenalica in risposta a stimoli di stress acuto (Sisson, 2004).

In un cuore normale il recettore adrenergico primario è chiamato  $\beta_1$  e, se attivato, aumenta il livello di calcio intracellulare, il quale a sua volta provoca un incremento della forza di contrazione e della FC. A livello di muscolatura liscia periferica, invece, il recettore adrenergico primario è detto  $\alpha_1$  ed una sua attivazione fa aumentare il calcio intracellulare, il quale, a questo livello, provoca vasocostrizione. Una stimolazione adrenergica, perciò, mantiene il flusso cardiaco e la pressione ematica.

In corso di RM, nell'uomo ma anche nel cane, si assiste ad un aumento persistente dell'attivazione del SNS; questo provoca un ulteriore peggioramento della patologia cardiaca tramite processi multipli che includono ipertrofia dei miociti, tachicardia persistente, maggior richiesta d'ossigeno da parte dei miociti, incremento del precarico, *downregulation* dei recettori, produzione inefficiente di energia, e perdita di miociti per apoptosi e necrosi. Gli effetti benefici dell'attivazione a breve termine del SNS sono, quindi, inficiati da quelli dannosi che avvengono a causa di un'attivazione simpatica a lungo termine (Davila *et al*, 2005; Hanks *et al*, 2006).

In medicina umana le concentrazioni plasmatiche della noradrenalina in pazienti affetti da ICC sono direttamente correlate con la gravità dell'IC ed inversamente correlate con la sopravvivenza; oltre a ciò, in pazienti in terapia per ICC, alte concentrazioni di norepinefrina sono correlate con un declino delle condizioni cliniche. Bisogna però non dimenticare che le

concentrazioni plasmatiche, oltre che in corso di IC, aumentano in svariate altre circostanze, incluso lo stress emozionale e l'esercizio fisico, diminuendo così la specificità del monitoraggio di tali ormoni.

In medicina veterinaria pochi hanno studiato i livelli di catecolamine in pazienti affetti da patologia cardiaca e, non è stato valutato se esse possono essere impiegate o meno come predittori di mortalità. Per tutti questi motivi l'interpretazione delle concentrazioni delle catecolamine plasmatiche in veterinaria è sempre problematica, oltre al fatto che esiste una notevole variazione delle misurazioni anche in pazienti appropriatamente categorizzati in accordo con la severità della sottostante patologia cardiaca; ancora, il maneggiamento dei campioni deve essere eseguito in modo rigoroso, visto che le catecolamine sono soggette ad ossidazione e, quindi, necessitano l'impiego di antiossidanti per preservare il campione prima delle analisi, nonché una centrifugazione a freddo e la conservazione a temperature inferiori agli zero gradi centigradi (Sission, Oyama, Solter, 2003).

#### IV. *Le endoteline*

La famiglia delle endoteline (ET) comprende tre peptidi correlati, ET-1, ET-2 e ET-3, che derivano da molecole di maggiori dimensioni, secrete dalle cellule endoteliali vascolari (ma anche da miociti e da altre cellule della muscolatura liscia vascolare). Esse sono prodotte come pre pro ormoni, cioè pre pro ET, dalle quali vengono ottenute le pro ET (dette anche grandi ET) e, quindi, clivate a livello del terminale amminico per ricavarne la forma matura.

L'ET-1 è un peptide composto da 21 amminoacidi ed è l'isoforma predominante della famiglia delle ET (O'Sullivan *et al*, 2007); la sequenza amminoacidica che la compone è molto conservata nei mammiferi, tanto che l'ET-1 canina è identica a quella umana, elemento che torna vantaggioso nella validazione di test in grado di dosarne i livelli. La produzione di questa molecola avviene in risposta a ipossia e a fattori meccanici (stiramento e stress da forze laterali), sostanze vasoattive come angiotensina II, arginina-vasopressina, norepinefrina, bradichinina, fattori di crescita e citochine, inclusi il *growth factor*  $\beta$ , il *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e l'interleuchina-1 (Miyachi e Masaki, 1999; Noll, Wenzell, Luscher, 1996). L'ET-1 è un potente vasocostrittore, ma ha anche azioni inotropica e cronotropica positiva, ha proprietà mitogeniche, stimola il sistema renina- angiotensina- aldosterone ed il SNS (O'Sullivan *et al*, 2007). Essa agisce su due recettori, ET<sub>A</sub> ed ET<sub>B</sub>. Tra gli effetti principali legati all'attivazione di

ET<sub>A</sub> troviamo la vasocostrizione della muscolatura liscia, l'aumento della contrattilità miocardica e la secrezione di aldosterone. Una stimolazione cronica di tale recettore ed elevati livelli per tempi prolungati di ET-1, provocano proliferazione ed ipertrofia della muscolatura liscia vasale, nonché ipertrofia miocardica; ecco spiegato perché l'ET-1 è una delle sostanze mitogeniche incriminate nel rimodellamento patologico vascolare e cardiaco in risposta ad ipertensione cronica ed IC. Persone affette da IC hanno elevate concentrazioni di ET-1 e grande ET-1, inoltre i loro livelli sono correlati direttamente con la gravità della patologia ed i tempi di sopravvivenza.



### 3. AMPIEZZA DI DISTRIBUZIONE ERITROCITARIA (RDW) IN MEDICINA UMANA E VETERINARIA

Più è semplice la metodica necessaria per titolare un marcatore biologico, più esso risulterà utile nella pratica clinica: ecco perché si studiano nuovi protocolli o kit che siano facili da utilizzare, rapidamente eseguibili e con i costi più contenuti possibile. L'identificazione di nuovi marker permette di migliorare la stratificazione del rischio di una malattia, comprendere al meglio la patofisiologia della patologia sottostante e suggerire nuove strade terapeutiche (Felker *et al*, 2007).

In medicina umana già da anni si sta cercando valutare l'utilizzo dell'ampiezza di distribuzione eritrocitaria (RDW, "*red distribution width*") come marker prognostico in corso di malattia cardiaca: essa è uno dei parametri eritrocitari ottenibili tramite l'esecuzione di un banale esame emocromocitometrico, indagine che oggigiorno viene eseguita routinariamente. Anche in medicina veterinaria l'esame emocromocitometrico è eseguito di consuetudine, almeno nelle strutture più recenti, quindi il possibile impiego dell'RDW in cani affetti da MCDV potrebbe avere grandi risvolti pratici.

L'RDW misura la variazione delle dimensioni degli eritrociti di un campione ematico e, da un punto di vista matematico, è così espressa:  $RDW = (\text{Derivazione Standard del volume eritrocitario} / \text{volume eritrocitario medio}) \times 100$  (Evans *et al*, 1991). Questo parametro eritrocitario stima la variabilità delle dimensioni dei globuli rossi circolanti (Hampole *et al*, 2009), cioè è una misura quantitativa dell'anisocitosi (Forhecz *et al*, 2009); generalmente è impiegato nella diagnosi differenziale delle anemie (Tonelli *et al*, 2007). Per poter distinguere un'anemia rigenerativa da una non rigenerativa, il *gold standard* è in realtà la conta reticolocitaria; questa però non è sempre disponibile nelle strutture veterinarie, perciò la valutazione dell'eventuale presenza o meno di anisocitosi e policromasia fornisce un metodo spesso impiegato, anche se un po' meno soddisfacente, (Neiger, Hadley e Pfeiffer, 2002).

L'RDW aumenta in corso di insufficiente produzione eritrocitaria (ad esempio da deficienza di ferro, anemie da patologie croniche, deficienza di vitamina B12 o folati,

emoglobinopatie), aumentata distruzione eritrocitaria (emolisi) o dopo una trasfusione di sangue (Allen *et al*, 2010), ma anche in corso patologie infiammatorie ed in gravidanza (Jaewon *et al*, 2009). Può, inoltre, essere utilizzata per escludere la deficienza di ferro, quando la concentrazione sierica di ferritina non riflette accuratamente le riserve sideremiche a causa della presenza di severo danno tissutale (Forhecz *et al*, 2009).

Il primo studio in medicina umana che ha valutato la relazione del parametro laboratoristico RDW con la ICC è stato condotto da Felker e colleghi (2007), ha coinvolto un ampio numero di pazienti e ha studiato 36 dei parametri eseguiti di routine in più laboratori. Le conclusioni ottenute sostengono che l'RDW è un importante predittore di morbilità e mortalità in pazienti affetti da ICC; in precedenza, comunque, alcuni lavori avevano associato questo parametro con altri processi patologici come patologie epatiche, malnutrizione, cancro del colon e metastasi al midollo osseo.

Il successivo lavoro di Tonelli e colleghi (2008) ha evidenziato, in una popolazione di infartuati che non presentavano evidenti segni clinici di IC, una graduale ed indipendente associazione tra il livello dell'RDW ed un maggior rischio di mortalità dovuta ad una causa qualsiasi, nonché lo sviluppo di nuovi fenomeni di IC e di eventi coronarici.

In medicina umana sempre più dati suggeriscono che lo stato anemico può essere un fattore di rischio indipendente di mortalità in pazienti affetti da IC (Mozaffarian *et al*, 2003): se si considera un *follow up* di 1- 3 anni i pazienti con anemia hanno un rischio di mortalità da 1.5 a 2 volte superiore rispetto a quelli non anemici (Heehling *et al*, 2011). Uno studio di Mozaffarian e colleghi (2003) afferma che se si cura lo stato anemico, migliorano i sintomi e la frazione di eiezione, inoltre a diminuisce il periodo di ospedalizzazione e la necessità di impiegare diuretici, suggerendo perciò che lo stato anemico può essere un fattore di rischio modificabile in corso di IC.

In pazienti affetti da ICC di grado avanzato l'anemia ha un'alta prevalenza e, in corso di IC, è più frequente nelle donne, in pazienti anziani, in soggetti con insufficienza renale cronica ed in quelli con stadi di malattia cardiaca più gravi. Nei pazienti con IC generalmente quattro sono i tipi di anemia che giocano un ruolo predominante: l'anemia da diluizione, da deficienza di ferro, da patologia cronica e l'anemia renale (Heehling *et al*, 2011). Tra i suddetti tipi di anemia, la più frequente è quella ferro-privata (Nanas *et al*, 2006) (cioè normocitica, che spesso

è classificata come l'anemia da malattia cronica; Tang e Katz, 2006), accompagnata da livelli eccessivamente bassi di eritropoietina ma normali o aumentate concentrazioni di ferritina; questo ultimo parametro probabilmente è aumentato a causa dell'infiammazione che spesso accompagna la sindrome da ICC (Nanas *et al*, 2006). Quanto appena descritto è anche chiamato "sindrome dell'anemia cardio-renale", ed è dovuta ad insufficienza renale cronica, la quale è associata ad ipoemoglobinemia, anemia e ICC. Pare comunque che l'anemia presente in corso di ICC sia dovuta alla combinazione di più fattori, tra i quali: progressiva disfunzione renale (che porta alla diminuzione dei livelli di eritropoietina, con diminuzione della produzione eritrocitaria da parte del midollo osseo), elevati livelli di citochine plasmatiche (in particolare TNF $\alpha$  e l'interleuchina-6), malassorbimento gastroenterico dovuto ad edema, malnutrizione (che include un ridotto apporto di ferro dovuto alla diminuzione dell'appetito in corso di ICC), impiego di ace-inibitori ed antagonisti del recettore dell'angiotensina (l'angiotensina stessa è un potente stimolatore dell'eritropoiesi), diabete ed iperglicemia concomitanti a ICC (che possono danneggiare le cellule renali addette alla produzione di eritropoietina), farmaci antiaggreganti come l'acido acetilsalicylico o anticoagulanti (i quali possono favorire la perdita ematica a livello di apparato gastroenterico).

Il monitoraggio dei livelli di RDW, ancora, è utile anche in corso di PH, alla quale è associato in maniera indipendente con i tassi di mortalità e, rispetto al marker NT-proBNP, risulta essere un migliore indicatore per poter effettuare una valida prognosi (Hampole *et al*, 2009). Alti livelli di RDW sono associati a peggiori parametri emodinamici, e pare che tale parametro eritrocitario possa essere d'aiuto nella stratificazione del rischio in pazienti con embolismo polmonare acuto (Zorlu *et al*, 2011).

L'utilità della valutazione dei livelli dell'RDW in corso di patologia cardiaca è dimostrata anche da un punto di vista ecocardiografico: è significativamente correlato con l'indice di volume dell'AS (IVAS), la velocità dell'onda E ed il rapporto E/E' in pazienti affetti da IC acuta (Jaewon *et al*, 2009).

Studi recenti hanno, inoltre, evidenziato un'importante relazione tra i marcatori di infiammazione e l'RDW in corso di IC; l'anisocitosi, infatti, riflette non solo la deficienza di ferro legata ai bassi livelli di emoglobina, ma anche l'influenza che l'infiammazione può avere nel provocare modificazioni dell'eritropoiesi (Forhecz *et al*, 2009).

Per quanto riguarda la specie canina, l'anemia emolitica immunomediata primaria è una delle cause più frequenti di emolisi: essa provoca la distruzione dei globuli rossi in conseguenza alla produzione di anticorpi contro gli eritrociti stessi (Piek *et al* 2008). Tale forma di anemia è di tipo rigenerativo e, così come in medicina umana, tra gli indici eritrocitari a nostra disposizione il metodo più accurato per diagnosticarla è l'RDW, specialmente se associato a policromasia; infatti la valutazione di parametri classici come il volume corpuscolare medio (MCV, dall'inglese "*mean corpuscular volume*") e la concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC, dall'inglese "*mean corpuscular hemoglobin concentration*") sottostimano significativamente le anemie rigenerative (Hodges e Christopher, 2011). È necessario, però, prestare attenzione alla razza del cane che si sta valutando, perché in Schnauzer nani e medi, Alaskan Malamut e Drentse Potrijshond esiste una stomatocitosi di tipo ereditario, la quale provoca un aumento dei livelli di RDW anche quando non si è in corso di vera e propria anemia rigenerativa (Bonfanti *et al*, 2004).

In cani affetti da patologia cardiaca, per quanto riguarda i biomarker, è stata studiata solamente la relazione tra i livelli di cTnI e la presenza di anemia emolitica immunomediata primaria. Paragonando, infatti, cani con tale patologia e cani sani o con patologie non anemiche e non cardiache, i primi hanno concentrazioni significativamente maggiori di cTnI; ciò significa che essi hanno una maggior incidenza di danno miocitario (Gow *et al*, 2009).

È stato studiato anche come varia la funzione piastrinica, altro parametro ottenibile tramite l'esecuzione del profilo emocromo citometrico, in bassotti tedeschi affetti da MCDV in stadio iniziale. All'interno dei complicati processi patogenetici dell'MCDV, potrebbe infatti essere coinvolta un'alterazione della funzione piastrinica, legata al flusso turbolento ad alta velocità ed ai cambiamenti dello sforzo di taglio (*shear stress*) che avvengono attorno alla valvola mitralica prolassata. I risultati ottenuti studiando suddetti cani, mostrano alterazioni della funzione piastrinica (già evidenziati in alcuni studi condotti con soggetti di CKCS), forse legate all'arteriosclerosi di piccoli vasi che è molto frequente in cani affetti da MCDV; non si sa comunque se tale disfunzione può giocare o meno un ruolo nella progressione della patologia cardiaca. Saranno necessari ulteriori studi per poter utilizzare questo parametro come marker prognostico per lo sviluppo di MDCV nel cane (Moesgaard *et al*, 2009).

## 4. CONTRIBUTO SPERIMENTALE

### 4.1 Scopo

La diagnostica laboratoristica, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, è un settore sempre più in espansione ed ha lo scopo di fornire utili mezzi per giungere facilmente, e con i costi più contenuti possibili, ad una rapida diagnosi di malattia.

Nell'uomo alti livelli di RDW sono stati associati ad esiti avversi in pazienti in corso di IC. In medicina veterinaria, per la bibliografia da noi consultata, non è stata ancora studiata la valutazione dei livelli dell'RDW in cani affetti da MDCV; inoltre non è stata valutata adeguatamente la correlazione tra anemia, RDW e la cosiddetta sindrome cardio-renale.

Obiettivo del presente lavoro è stato lo studio dei livelli di RDW in cani affetti da MDCV con o senza ICC scompensata, per poter comprendere se tale indice eritrocitario può rivestire il ruolo di marcatore prognostico in corso di MDCV. A tal scopo sono stati confrontati tre gruppi di cani: sani, affetti da MDCV, con patologie diverse dalla MDCV. Oltre a ciò, comparando i suddetti gruppi, si è provveduto a confrontare i livelli di RDW con altri parametri laboratoristici e alcuni indici ecocardiografici prognostici di patologia valvolare nel cane.

## 4.2 Materiali e metodi

### *I. Pazienti*

Nel presente studio sono state valutate le cartelle cliniche di soggetti di specie canina, visitati presso il servizio di medicina interna e di cardiologia dell'Ospedale didattico veterinario (ODV) dell'Università degli Studi di Padova e di Teramo, nel periodo compreso tra settembre 2006 e gennaio 2011. I soggetti erano pazienti delle suddette cliniche, oppure venivano riferiti da strutture esterne per un consulto. Nell'ambito di questa casistica, sono stati selezionati solo gli animali che rispettavano i seguenti criteri di inclusione: disponibilità di anamnesi e valutazione clinica diretta, con particolare riferimento agli apparati cardiocircolatorio e respiratorio; diagnosi clinica di MDCV; profilo emocromocitometrico e biochimico eseguito presso le suddette strutture.

I cani inseriti nel presente studio sono stati suddivisi in tre gruppi: il gruppo dei cani sani (gruppo di controllo), il gruppo dei cani affetti da MDCV (a loro volta ulteriormente suddivisi in cani con IC compensata o scompensata), il gruppo dei cani affetti da altre malattie (diverse dall'MDCV).

I cani del gruppo di controllo sono stati sottoposti ad un attento esame fisico, nonché ad un'indagine ecocardiografica e Doppler ecocardiografica e, quindi, ad un prelievo ematico per eseguire un profilo emocromocitometrico e biochimico.

Per gli animali inseriti nel gruppo degli affetti da MDCV, la diagnosi è stata emessa valutando i dati clinici (ad esempio il rilievo di un soffio sistolico apicale sinistro), ecocardiografici (come lembi valvolari ispessiti, nodulari o prolassanti all'ecocardiografia bidimensionale) e Doppler ecocardiografici (rigurgito valvolare mitralico di grado moderato o severo). Sulla base di tutti questi dati poi sono stati ulteriormente suddivisi in cani affetti da IC compensata o scompensata, in accordo con la classificazione dell'International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC), rispettivamente in: cani con IC compensata (classe ISACHC Ia e Ib) e cani con IC scompensata (classe ISACHC II e III). Anche questi soggetti sono stati sottoposti ad un esame ematobiochimico.

Nel gruppo dei cani con patologie diverse dall'MDCV l'assenza di tale malattia si è basata sull'esame fisico, in particolare sull'assenza all'auscultazione cardiaca di un soffio sistolico

udibile o di un click; per essere inseriti in questo gruppo, poi, oltre all'esecuzione di un prelievo ematico per un profilo emocromocitometrico e biochimico, era richiesta la conoscenza della diagnosi di sede di malattia.

## *II. Valutazione cardiologica*

In ogni centro l'esame ecocardiografico e Doppler ecocardiografico sono stati eseguiti dallo stesso operatore esperto impiegando due ecocardiografi in commercio quali: Aplio SSA-770° (Toshiba Medical Systems, Zoetermeer, Paesi Bassi, fornito di due sonde phased array, 2,5-3,5MHz e 4,5-6,5MHz, rispettivamente) e Zone Ultra (Zonare, Mountain View, California, fornito di due sonde phased array, 1-4MHz e 4-10MHz, rispettivamente).

I cani sono stati contenuti manualmente in decubito laterale destro o sinistro e l'esame è stato eseguito senza ricorrere a sedazione. Sono state utilizzate le proiezioni standard parasternale sinistra, parasternale destra e sub-costale; l'esame ecocardiografico ha compreso l'ottenimento di immagini in modalità bidimensionale, M-mode, Doppler spettrale e Doppler a codice Colore, con costante monitoraggio elettrocardiografico.

Dalla proiezione parasternale destra sono state ottenute le misure ventricolari tramite l'esame ecocardiografico M-mode, nonché il diametro atriale sinistro e aortico, che sono stati misurati impiegando il metodo bidimensionale. Tramite la finestra parasternale sinistra apicale con visione quattro camere è stata ottenuta la valutazione Doppler spettrale e Doppler a codice di colore del flusso transmitralico. La presenza del jet di rigurgito mitralico è stata identificata come comparsa, in sistole, di segnale color Doppler in avvicinamento in blue, in verde o in mosaico di colore, proveniente dalla valvola mitrale e diretto verso la cavità dell'atrio sinistro.

Nella successiva analisi statistica sono stati valutati i seguenti parametri ecocardiografici e Doppler ecocardiografici: DVSs, AS, Ao, velocità di picco del flusso transmitralico all'inizio della diastole (vel. p. E). In più, sono stati considerati i rapporti degli indici ecocardiografici: DVSd:Ao, DVSs:Ao, FA, AS:Ao.

### *III. Valutazione laboratoristica*

In ogni centro sono stati eseguiti entro le 24 ore dal prelievo, il profilo emocromocitometrico e biochimico sul sangue in K<sub>2</sub>EDTA e sul siero ottenuto da animali che avevano osservato almeno nove ore di digiuno. I parametri ematologici, incluso l'RDW, sono stati misurati utilizzando lo stesso analizzatore automatico (ADVIA 120 automated CBC) in entrambe i centri; i parametri biochimici sierici sono stati ottenuti impiegando rispettivamente i macchinari BT 1500 (Biotecnica, Roma, Italia) presente nell'ODV di Padova, e AU 400 TM (Mishima Olympus, Shizuoka, Giappone) presente nell'ODV di Teramo.

Gli intervalli di riferimento di normalità dei laboratori nei quali sono state eseguite le analisi per RDW, ematocrito (Hct), creatinina sierica ed urea sierica sono rispettivamente: 11,9-14,5%, 37-57%, 0,5-1,5 mg/dL, e 20-50 mg/dL. I cani sono stati, quindi, considerati anemici, se l'Hct era  $\leq 36\%$ , e azotemici se le concentrazioni di creatinina e/o urea sieriche erano rispettivamente  $>1,5$  mg/dL e  $>50$  mg/dL.

### *IV. Analisi statistica*

Per valutare la normalità o meno della distribuzione dei dati è stato impiegato il test non parametrico a singolo campione di Kolmogorov-Smirnov; i dati distribuiti normalmente sono stati quindi riportati come  $\text{media} \pm \text{DS}$ , mentre quelli distribuiti non normalmente come mediana e range.

Per analizzare i dati continui con distribuzione normale (quali Hct, MCV, DVSD/Ao e FA), è stato utilizzato il test ANOVA a una via, seguito dal post test Tamhane per confronti multipli, ed il test del Chi-quadro per confrontare i dati categorici.

Per studiare i dati distribuiti non normalmente (quali età, peso corporeo, emoglobina, RDW, urea, creatinina, concentrazione proteica, DVSS/Ao, AS/Ao, e vel. p. E) è stato impiegato il test non parametrico di Kruskal-Wallis per un paragone all'interno dei vari gruppi, seguito dal test non parametrico di Mann-Whitney per un paragone tra i vari gruppi accoppiati (con la correzione di Bonferroni per i paragoni multipli).

Per verificare il grado di associazione tra l'RDW e le variabili incluse nello studio (età, peso corporeo, parametri ematologici e biochimici sierici, nonché gli indici ecocardiografici e

Doppler ecocardiografici), è stato utilizzato il grado di correlazione espresso attraverso il coefficiente rho di Sperman.

Nei cani affetti da MDCV ed in quelli con altre patologie ma senza MDCV, sono stati calcolati gli *odds ratio* (OR) allo scopo di valutare l'associazione con la prevalenza di anemia e azotemia. Nei cani azotemici e in quelli anemici appartenenti ai succitati due gruppi, l'OR è stato, inoltre, impiegato per valutare rispettivamente l'associazione con il tipo di azotemia (ad esempio azotemia pre-renale o renale) e con la presenza o assenza di anemia.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite impiegando un software statistico (SPSS 15.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL) ed è stato scelto come livello minimo di significatività un valore di  $P < 0,05$ .

## 4.3 Risultati

### *I. Studio di popolazione*

Dei 294 soggetti inclusi nello studio, appartenenti a diverse razze, 164 erano maschi e 130 erano femmine. In base alla suddivisione precedentemente indicata, i tre gruppi principali sono risultati composti da: 25 cani sani (di cui 11 erano maschi e 14 femmine), 139 affetti da MDCV (77maschi e 62 femmine) e 130 affetti da altre patologie senza MDCV (76 maschi e 54 femmine). La descrizione dei dati segnaletici e morfometrici (età, peso corporeo, sesso e razza) di questi tre gruppi è presentata in **Tabella 1**.

I cani affetti da MDCV sono risultati statisticamente più anziani (11,0, 3,0-17,0 anni,  $P<0,001$ ) di quelli del gruppo di controllo sano e dei cani con altre patologie ma senza MCDV. Ancora, i cani affetti da MDCV hanno presentato un peso corporeo statisticamente inferiore (10,0, 1,8-56,0 chilogrammi,  $P<0,001$ ) rispetto a quelli del gruppo di controllo e dei cani con altre patologie ma senza MCDV.

Nel gruppo di controllo, i cani meticci sono apparsi i più rappresentati ( $n=8$  cani), seguiti da esemplari di Pastore tedesco ( $n=3$  cani), Boxer e Pinscher ( $n=2$  cani). Tra i soggetti affetti da MDCV, i meticci sono risultati i più frequenti ( $n=69$  cani), seguiti da quelli di razza Bassotto tedesco e Yorkshire terrier ( $n= 7$  cani), quindi CKCS ( $n=6$  cani), Pastore tedesco, Pinscher e Barboncino nano ( $n= 5$  cani), Bracco italiano e Setter inglese ( $n= 4$  cani). All'interno del gruppo di cani affetti da altre patologie ma non da MDCV i meticci sono stati i più frequenti ( $n=50$  cani), seguiti da cani Pastore tedesco ( $n=13$  cani), Barboncino ( $n=5$  cani), Bassotto tedesco, Pinscher e Rottweiler ( $n=4$  cani).

Tra i cani affetti da MDCV, il 65,5% ( $n= 91/139$  cani) ha manifestato IC compensata e il 34,5% ( $n= 48/139$  cani) IC scompensata; inoltre alcuni cani affetti da MDCV sono contemporaneamente risultati affetti anche da altre malattie. In **Tabella 2** è illustrata la prevalenza delle comorbidità presenti tra i cani del gruppo di affetti da MDCV, nonché la prevalenza delle varie malattie all'interno del gruppo di cani affetti da altre patologie ma non da MDCV.

## II. *Analisi di laboratorio e variabili ecocardiografiche*

I parametri ematologici e biochimici osservati nei tre gruppi di cani, nonché le variabili ecocardiografiche osservate nei cani sani ed in quelli affetti da MDCV, sono illustrate nella **Tabella 3** e nella **Tabella 4**.

L'anemia è risultata maggiormente prevalente nei cani affetti da altre patologie senza MDCV (n = 32/139, 24,6%) rispetto ai cani affetti da MDCV (n = 12/130, 8,6%) (OR 3,4; 95% CI 1,7-7,0;  $P = 0,001$ ). Sebbene nei cani affetti da MDCV sia stata principalmente osservata anemia di grado lieve (n = 11/12, 92,7%), non è presente alcuna differenza statisticamente significativa nella prevalenza di questa forma di anemia, confrontando i cani di tale gruppo e quelli affetti da altre patologie ma privi di MDCV (n = 18/32, 43,8%) (OR 8,6; 95% CI 1,0-394,0;  $P = 0,06$ ).

La prevalenza dell'azotemia non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra i cani affetti da MDCV (n = 34/139, 24,5%) e quelli con altre patologie ma senza MDCV (n = 36/130, 27,7%) (OR 0,85; 95% CI 0,47-1,61;  $P = 0,6$ ), anche se l'azotemia di tipo pre-renale ha avuto maggior prevalenza nei cani affetti da MDCV (n = 23/34, 67,6%) se paragonati con i cani affetti da altre patologie ma senza MDCV (n = 12/36, 33,3%) (OR 4,18; 95% CI 1,38-12,95;  $P = 0,008$ ). Non è stata rilevata alcuna differenza nella prevalenza dell'anemia associata ad azotemia tra i cani con MDCV (n = 4/12, 33,3%) e quelli con altre patologie ma senza MDCV (n = 14/32, 43,8%) (OR 0,64; 95% CI 0,13-3,09;  $P = 0,77$ ).

La media  $\pm$  SD dell'Hct dei cani con MDCV ed IC compensata ( $45,1\% \pm 6,7\%$ ) è risultata significativamente inferiore rispetto a quella del gruppo di controllo ( $49,4\% \pm 4,0\%$ ,  $P < 0,01$ ), mentre la media  $\pm$  SD dell'Hct ( $41,4\% \pm 10,0\%$ ) e la mediana della concentrazione emoglobinica ( $15,0$  g/dL,  $2,5$ - $21,1$  g/dL) del gruppo di cani con altre patologie ma senza MDCV è risultata significativamente inferiore se paragonata a quella degli altri gruppi di cani ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , rispettivamente).

La mediana della concentrazione sierica dell'urea nei cani con MDCV ed IC scompensata ( $37,6$  mg/dL,  $8,9$ - $139,0$  mg/dL) e dei cani con altre patologie ma senza MDCV ( $34,0$  mg/dL,  $8,0$ - $383,0$  mg/dL) è risultata significativamente superiore se confrontata con quella dei cani del gruppo sano di controllo ( $20,1$  mg/dL,  $10,3$ - $47,0$  mg/dL,  $P \leq 0,001$ ) e se confrontata con quella dei cani con MDCV ed IC compensata ( $25,5$  mg/dL,  $4,6$ - $225,7$  mg/dL,  $P < 0,001$ ).

La mediana della concentrazione sierica della creatinina del gruppo dei cani con MDCV ed IC scompensata (1,05 mg/dL, 0,49-3,86 mg/dL) è risultata significativamente superiore se paragonata a quella dei cani con MDCV ed IC compensata (0,94 mg/dL, 0,47-5,55 mg/dL,  $P<0,05$ ).

La concentrazione delle proteine sieriche dei cani con MDCV ed IC scompensata (62,5 g/L, 36,0-75,0 g/L) è risultata significativamente inferiore se paragonata a quella dei cani del gruppo di controllo (67,0 g/L, 57,0-74,0 g/L,  $P<0,05$ ) e a quella dei cani con MDCV ed IC compensata (65,0 g/L, 35,0-85,0 g/L,  $P<0,05$ ).

I dati ecocardiografici del gruppo di cani affetti da MDCV e del gruppo di controllo sono illustrati in **Tabella 4**. I cani con MDCV, sia con IC compensata che con IC scompensata, hanno mostrato valori dei parametri ecocardiografici significativamente superiori, quali: DVSD:AO ( $P<0,001$ ), DVSS:AO ( $P<0,001$ ), AS:AO ( $P<0,001$ ), e FA ( $P\leq 0,001$ ) se paragonati ai valori dei cani del gruppo di controllo. La vel. p. E è significativamente superiore ( $P<0,001$ ) nei cani con MDCV ed IC scompensata se paragonata a quella dei cani del gruppo di controllo e dei cani con MDCV associata ad IC compensata. I cani con MDCV ed IC scompensata hanno evidenziato valori significativamente superiori per i seguenti indici ecocardiografici, DVSD:AO ( $P<0,001$ ), DVSS:AO ( $P<0,001$ ), AS:AO ( $P<0,001$ ), se confrontati con i valori dei cani con MDCV ed IC compensata.

### *III. Analisi dei livelli dell'RDW*

I valori dell'RDW all'interno dei vari gruppi sono rappresentati nella **Figura 1 e 2** e nella **Tabella 3**.

Il valore della mediana dell'RDW dei cani sani è risultato pari a 12,9% (range 11,8-14,5%), mentre quello dei cani con MDCV è pari a 13,0% (range 11,0-18,4%); fra questi ultimi, 15 cani (10,8%) hanno presentato livelli di RDW al di sopra del normale limite superiore di riferimento (cioè  $\geq 14,6\%$ ). Il valore della mediana dell'RDW dei cani con altre patologie ma senza MDCV è risultato pari a 13,3% (range 11,0-22,6%), e 27 dei soggetti appartenenti a questo gruppo (20,8%) hanno mostrato livelli di RDW al di sopra del normale limite superiore di riferimento.

Il valore della mediana dell'RDW dei cani con altre patologie ma senza MDCV è risultato significativamente superiore se paragonato a quello dei cani sani ( $P=0,029$ ). Non è

stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nei livelli di RDW tra il gruppo di cani con MDCV e quelli sani ( $P=0,205$ ), né tantomeno tra gruppo di cani con MDCV e quello dei cani con altre patologie ma senza MDCV ( $P=0,064$ ).

All'interno del gruppo di cani con MDCV, il livello di RDW è stato, rispettivamente, pari a 12,9% (range 11,0-18,4%) nei cani con IC compensata, e 13,1% (range, 11,3-15,8%), nei cani con IC scompensata. Non è apparsa alcuna differenza statisticamente significativa tra l'RDW dei cani con MDCV ed IC compensata, e quelli del gruppo con MDCV ed IC scompensata ( $P=0,823$ ). Per di più, i livelli di RDW dei cani con MDCV e IC sia compensata che scompensata, non sono risultati statisticamente differenti da quelli del gruppo di controllo ( $P=0,267$  e  $P=0,193$ , rispettivamente) e da quelli del gruppo di cani con altre patologie ma senza MDCV ( $P=0,078$  e  $P=0,242$ , rispettivamente).

L'associazione tra i livelli di RDW e le variabili demografiche, laboratoristiche ed ecocardiografiche, è illustrata nella **Tabella 5**.

Il livello di RWD è risultato significativamente, negativamente ma debolmente correlato con l'Hct (coefficiente di correlazione =  $-0,278$ ,  $P<0,001$ ) e la concentrazione emoglobinica (coefficiente di correlazione =  $-0,280$ ,  $P<0,001$ ), mentre è risultato correlato in maniera significativa e positiva, ma debole, con la concentrazione dell'urea sierica (coefficiente di correlazione =  $0,137$ ,  $P=0,019$ ). Non è stata osservata alcuna correlazione tra il livello di RDW, le variabili demografiche e gli altri parametri di laboratorio considerati.

La correlazione tra il livello di RDW ed il rapporto AS:Ao è risultata ai limiti di significatività (coefficiente di correlazione =  $0,153$ ,  $P = 0,051$ ), mentre non si è osservata alcuna correlazione tra il livello di RDW e gli altri parametri ecocardiografici e eco-Doppler indicatori di severità di MDCV considerati nel presente studio.

**Tabella 1.** Dati demografici dei 294 cani inseriti nello studio.

Variabile	Gruppo di controllo	Gruppo affetti da MDCV	Gruppo affetti da altre patologie	Valore P-
No. di cani	25	139	130	
Età (anni)	6,0 (2,0-14,0)	11,0 (3,0-17,0)* <sup>§</sup>	8,0 (1,0-17,0)	<0,001
Peso corporeo (kg)	18,0 (5,0-48,0)	10,0 (1,8-56,0)* <sup>§</sup>	18,0 (1,6-56,0)	<0,001
Sesso (♂/♀)	11/14	77/62	76/54	0,382
Razza (No. di cani)	Meticcio (8)	Meticcio (69)	Meticcio (50)	
	Pastore tedesco (3)	Bassotto tedesco, Yorkshire terrier (7)	Pastore tedesco (13)	
	Boxer, Pinscher (2)	CKCS (6)	Poodle (5)	
	Altre razze (12)	Pastore tedesco, Pinscher, Barboncino (5)	Bassotto tedesco, Pinscher, Rottweiler (4)	
		Bracco italiano, Setter inglese (4)	Boxer, Epagneul Breton, Labrador, Pointer, Setter inglese, Yorkshire terrier (3)	
		Pechinese (3)	AST, Beagle, Pitt Bull, Bracco italiano, Siberian Husky (2)	
		Dalmata, Epagneul Breton, Greyhound, Labrador, Maltese, WHWT (2)	Altre razze (22)	
		Altre razze (12)		

I risultati sono espressi come mediana (range).

\* P < 0,001 paragonata con i cani del gruppo di controllo.

<sup>§</sup> P < 0,001 paragonata con i cani del gruppo affetti da altre patologie.

MDCV, malattia degenerativa cronica valvolare; CKCS, Cavalier king Charles spaniel; WHWT, West Highland white terrier, AST, American Staffordshire terrier.

**Tabella 2.** Prevalenza di comorbidità in cani con malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) e di malattie in cani con altre patologie (AP) senza MDCV.

Patologie	Prevalenza
<b>MDCV (n = 139 cani)</b>	
Urinarie	22,3% (n= 31 cani)
Respiratorie	18,0% (n= 25 cani)
Neoplastiche	5,8% (n= 8 cani)
Gastrointestinali ed epatiche	2,2% (n= 3 cani)
Genitali	1,4% (n= 2 cani)
Endocrine	0,7% (n= 1 cani)
<b>AP (n = 130 cani)</b>	
Endocrine	21,5% (n = 28 cani)
Neoplastiche	20% (n = 26 cani)
Infiammatorie/infettive	14,6% (n = 19 cani)
Gastrointestinali ed epatiche	8,5% (n = 11 cani)
Malattie urinarie	6,9% (n = 9 cani)
Ematopoietiche e genitali	6,2% (n = 8 cani)
Tossicologiche	4,6% (n = 6 cani)
Dermatologiche	3,1% (n = 4 cani)

**Tabella 3.** Analisi di laboratorio in 25 cani sani (gruppo di controllo), 139 cani con malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) e 130 cani con altre patologie (AP) senza MDCV.

Variabile	Controllo (n = 25)	MDCV		AP (n = 130)	Valore-P
		ICc (n = 91)	ICs (n = 48)		
<b>Ematologia</b>					
Hct (%)	49 ± 4	45,1 ± 6,7**	47,4 ± 7,5	41,4 ± 10,0**.§§,##	<0,001
Hb (g/dL)	16,5 (12,7-18,9)	15,7 (6,3-20,6)	17,0 (11,8-21,8)	15,0 (2,5-21,1)*.§,#	<0,001
RDW (%)	12,9 (11,8-14,5)	12,9 (11,0-18,4)	13,1 (11,3-15,8)	13,3 (11,0-22,6)*	0,085
MCV (fL)	68,5 ± 2,2	68,1 ± 4,0	67,8 ± 3,0	67,9 ± 5,7	0,935
<b>Biochimica</b>					
Urea (mg/dL)	20,1 (10,3-47,0)	25,5 (4,6-225,7)	37,6 (8,9-139,0)***.§§§	34,0 (8,0-383,0)***.§§§	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,96 (0,45-1,40)	0,94 (0,47-5,55)	1,05 (0,49-3,86) <sup>§</sup>	0,95 (0,28-8,18)	0,130
Proteine (g/L)	67,0 (57,0-74,0)	65,0 (35,0-85,0)	62,5 (36,0-75,0)*.§	65,0 (27,0-93,0)	0,088

I dati distribuiti normalmente sono espressi come media ± deviazione standard, i dati distribuiti non normalmente sono espressi come mediana (range).

\* P < 0,05 paragonata con il gruppo di controllo.

\*\* P < 0,01 paragonata con il gruppo di controllo.

\*\*\* P ≤ 0,001 paragonata con il gruppo di controllo.

§ P < 0,05 paragonata con il gruppo di cani affetti da MDCV e ICc.

§§ P < 0,01 paragonata con il gruppo di cani affetti da MDCV e ICc.

§§§ P < 0,001 paragonata con il gruppo di cani affetti da MDCV e ICc.

# P < 0,001 paragonata con il gruppo di cani affetti da MDCV e ICs.

## P < 0,001 paragonata con il gruppo di cani affetti da MDCV e ICc.

### P < 0,001 paragonata con il gruppo di cani affetti da MDCV e ICc.

ICc, insufficienza cardiac compensata; ICs, insufficienza cardiac scompensata; Hct, ematocrito; Hb, emoglobina; RDW, ampiezza di distribuzione eritrocitaria; MCV, volume corpuscolare medio; DVSD, diametro ventricolare sinistro in diastole; Ao, diametro aortico; DVSS, diametro ventricolare sinistro in sistole; AS, diametro atriale sinistro; FA, frazione di accorciamento; vel. p. E, velocità di picco del flusso transmitralico diastolico; ND, non disponibile.

**Tabella 4.** Variabili ecocardiografiche e Doppler ecocardiografiche in 25 cani sani (gruppo di controllo), 139 cani con malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) e 130 cani con altre patologie (AP) senza MDCV.

Variabile	Controllo (n = 25)	MDCV		AP (n = 130)	Valore-P
		ICc (n = 91)	ICs (n = 48)		
DVSd/Ao	1,61 ± 0,17	2,09 ± 0,37*	2,78 ± 0,62* <sup>§</sup>	ND	<0,001
DVSs/Ao	1,02 (0,73-1,22)	1,25 (0,78-2,46)*	1,60 (0,77-2,64)* <sup>§</sup>	ND	<0,001
AS/Ao	1,30 (0,90-1,50)	1,54 (0,96-2,50)*	2,57 (1,75-3,55)* <sup>§</sup>	ND	<0,001
FA (%)	35 ± 4	40 ± 9*	43 ± 9*	ND	<0,001
vel. p. E (m/s)	0,80 (0,49-1,09)	0,73 (0,46-1,22)	1,36 (0,32-2,31)* <sup>§</sup>	ND	<0,001

I dati distribuiti normalmente sono espressi come media ± deviazione standard, i dati distribuiti non normalmente sono espressi come mediana (*range*).

\*  $P \leq 0,001$  paragonata con il gruppo di controllo.

<sup>§</sup>  $P < 0,001$  paragonata con il gruppo di cani affetti da MDCV e ICc.

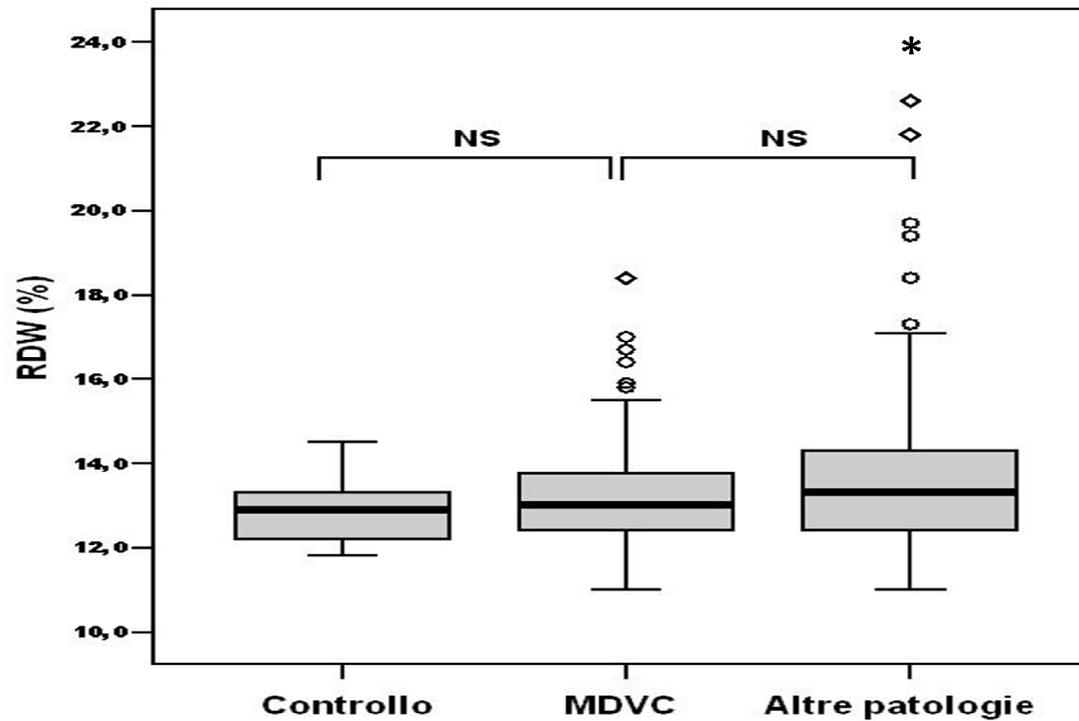
ICc, insufficienza cardiac compensata; ICs, insufficienza cardiac scompensata; Hct, ematocrito; Hb, emoglobina; RDW, ampiezza di distribuzione eritrocitaria; MCV, volume corpuscolare medio; DVSd, diametro ventricolare sinistro in diastole; Ao, diametro aortico; DVSs, diametro ventricolare sinistro in sistole; AS, diametro atriale sinistro; FA, frazione di accorciamento; vel. p. E, velocità di picco del flusso transmitralico diastolico; ND, non disponibile.

**Tabella 5.** Correlazioni tra RDW e i parametri demografici, laboratoristici, ecocardiografici.

Variabile	N. di cani	Coefficiente di correlazione	Valore P-
Età	294	0,097	0,100
Peso	294	0,015	0,802
Hct	294	-0,278	<0,001
Hb	294	-0,280	<0,001
MCV	294	-0,065	0,267
Urea	294	0,137	0,019
Creatinina	294	-0,002	0,971
Proteine	294	-0,018	0,759
DVSd/Ao	164	0,118	0,135
DVSs/Ao	164	0,068	0,387
As/Ao	164	0,153	0,051
FA	164	0,036	0,649
Vel. p. E	164	-0,037	0,653

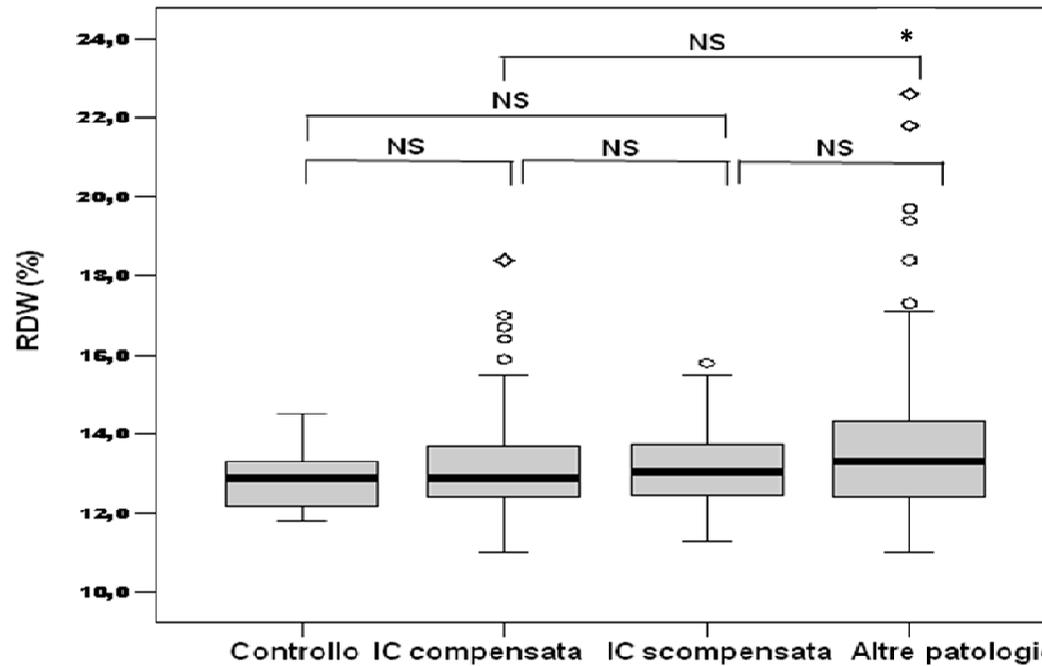
RDW, ampiezza di distribuzione eritrocitaria; Hct, ematocrito; Hb, emoglobina; MCV, volume corpuscolare medio; DVSd, diametro ventricolare sinistro diastolico; Ao, diametro aortico; DVSs, diametro ventricolare sinistro sistolico; AS, diametro atriale sinistro; FA, frazione d'accorciamento; Vel. p. E, velocità di picco diastolica transmitralica.

**Figura 1** Box plots del livello di RDW (ampiezza della distribuzione eritrocitaria) del gruppo di controllo, del gruppo di affetti da malattia degenerativa cronica valvolare (MDCV) e del gruppo affetti da altre patologie.



I box rappresentano il range interquartile (dal 25° al 75° percentile), le barre orizzontali all'interno di ogni box rappresentano i valori delle mediane, i whisker rappresentano il 5° ed il 95° percentile, i valori fuori range ed estremamente fuori range sono rappresentati rispettivamente come punti e diamanti. \*, differenza statistica rispetto al gruppo di controllo ( $P < 0,005$ ); NS, non significativo; MDCV, malattia degenerativa cronica valvolare; RDW, red blood cell distribution width (ampiezza di distribuzione eritrocitaria).

**Figura 2.** Box plots del livello di RDW (ampiezza della distribuzione eritrocitaria) del gruppo di controllo, del gruppo di affetti da malattia degenerativa cronica valvolare con insufficienza cardiaca (IC) compensata, del gruppo di affetti da malattia degenerativa cronica valvolare con insufficienza cardiaca (IC) scompensata e del gruppo affetti da altre patologie.



I box rappresentano il range interquartile (dal 25° al 75° percentile), le barre orizzontali all'interno di ogni box rappresentano i valori delle mediane, i whisker rappresentano il 5° ed il 95° percentile, i valori fuori range ed estremamente fuori range sono rappresentati rispettivamente come punti e diamanti. \*, differenza statistica rispetto al gruppo di controllo ( $P < 0,005$ ); NS, non significativo; MDCV, malattia degenerativa cronica valvolare; RDW, red blood cell distribution width (ampiezza di distribuzione eritrocitaria).

## 4.4 Discussione

Il RDW può essere misurato sia utilizzando strumenti ad impedenza che strumenti a citofluorimetria, come parte di un esame emocromocitometrico di *routine*. In questo studio è stato impiegato un laser citofluorimetro, il sistema ADVIA 120 automated CBC, che è considerato il *gold standard* per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico nel cane (Welles, Hall, Carpenter, 2009; Moritz *et al*, 2004).

Alti valori di RDW indicano la presenza in circolo di eritrociti con una grande varietà di dimensioni (Evans *et al*, 1991). L'ipotesi iniziale della presente tesi dottorale era quella che l'RDW possa assumere valori più elevati in cani con MDCV, analogamente a quanto osservato in pazienti umani cardiopatici. In medicina umana un'ampia letteratura scientifica ha evidenziato, infatti, una correlazione tra i valori di RDW ed i tassi di morbilità e mortalità legati all'IC, oltre che una forte relazione con prognosi avverse. Pertanto, questo indice eritrocitario viene attualmente utilizzato come marker prognostico in corso di diverse cardiopatie. Con tali obiettivi, nel presente studio è stata condotta una valutazione retrospettiva su cani affetti da MDCV (sia con IC compensata che con IC scompensata), ponendo a confronto i valori di RDW, oltre che di alcuni altri parametri laboratoristici e ecocardiografici, con quelli osservati in due gruppi di controllo rappresentati da cani sani e cani affetti da patologie diverse ma privi di MDCV.

Nei pazienti umani affetti da patologie cardiache, temi come l'anemia e la cosiddetta "sindrome dell'anemia cardiorenale" sono stati ampiamente approfonditi dall'odierna letteratura scientifica. In medicina veterinaria, al contrario, l'eventuale correlazione tra le patologie cardiache e l'anemia è stata poco studiata; comunque pare che essa sia poco frequente in corso di patologia cardiaca nel cane (Ohad, Berkowitz, Bdolah-Abram, 2010).

Relativamente alla prevalenza di anemia, è risultata essere piuttosto bassa ( $n = 12/130$ , 8,6%) nel gruppo di cani cardiopatici mentre è stata osservata una prevalenza significativamente più elevata ( $n = 32/139$ , 24,6%) nei cani affetti da altre patologie ma non da MDCV. Per di più, analizzando il livello di gravità dell'anemia, la forma più frequentemente riscontrata nel gruppo di cani con MDCV è stata di tipo lieve ( $n = 11/12$ , 92,7%), mentre nei cani affetti da patologie diverse dall'MDCV sono stati osservati diversi stadi di gravità. Tutto questo può essere spiegato dal fatto che il gruppo dei cani affetti da MDCV non comprende

animali con patologie ematologiche primitive, le quali invece sono presenti (seppur modestamente) tra i cani affetti da altre patologie ma non da MDCV.

Di conseguenza, anche la diminuzione di parametri laboratoristici quali l'Hct e la concentrazione emoglobinica risulta ovvia, visto che tali parametri sono legati allo stato anemico. Andando, infatti, ad esaminare i livelli di Hct, nel presente studio sono risultati statisticamente inferiori nei cani affetti da MDCV ed IC compensata, se paragonati a quelli dei cani appartenenti al gruppo di controllo. In realtà i valori della concentrazione emoglobinica sono risultati statisticamente differenti solamente tra i cani del gruppo affetto da altre patologie ma non da MDCV, i quali hanno valori inferiori rispetto al gruppo di cani sani e al gruppo di cani affetti da MDCV.

La prevalenza dell'azotemia non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra i cani affetti da MDCV e quelli con altre patologie ma senza MDCV, anche se l'azotemia di tipo pre-renale ha avuto maggior prevalenza nei cani affetti da MDCV se paragonati con i cani affetti da altre patologie ma senza MDCV. Ancora, l'urea ha mostrato livelli statisticamente superiori nei cani con MDCV ed IC scompensata, se paragonati a quelli del gruppo di controllo e dei cani affetti da MDCV ed IC compensata. Tale risultato può essere spiegato considerando che, nei pazienti affetti da MDCV, le diminuite *performances* cardiache portano ad una diminuzione della perfusione degli organi; pertanto anche i reni ne possono risentire, portando ad una riduzione della loro funzione di filtro e, quindi, ad un aumento dei livelli di urea sierica. Questa spiegazione può valere ancora di più se si confrontano i pazienti affetti da MDCV ed IC compensata con quelli affetti da MDCV ed IC scompensata perché, ovviamente, nell'ultimo gruppo la funzione di pompa del cuore è ulteriormente ridotta, quindi la perfusione renale ne risente maggiormente. A tal riguardo anche i livelli di creatinina dei cani con MDCV ed IC scompensata, sono risultati significativamente superiori a quelli del gruppo degli affetti da MDCV ed IC compensata. Questi dati, infatti, trovano pieno riscontro nella letteratura scientifica veterinaria esistente (Boswood e Murphy, 2006; Nicolle *et al*, 2007).

Per tutti i gruppi, il presente studio ha pertanto preso in considerazione parametri renali quali l'urea e la creatinina, allo scopo di verificare la presenza o meno della cosiddetta sindrome dell'anemia cardio-renale, diffusa tra le persone affette da cardiopatia. I risultati ottenuti nel presente studio evidenziano che l'anemia non ha alta prevalenza nei cani affetti da MDCV, probabilmente perché i meccanismi patofisiologici che provocano tale malattia nel cane sono differenti da quelli della corrispettiva malattia presente nell'uomo.

Paragonando i livelli (mediana) di RDW tra i tre gruppi, non sono risultati essere statisticamente differenti. È emerso che l'RDW dei cani affetti da patologie diverse dalla MDCV, ha livelli significativamente maggiori se confrontato con quello del gruppo di controllo, comunque tra i cani affetti da MDCV, pochi hanno avuto livelli statisticamente superiori di RDW se paragonati con gli altri due gruppi.

Per quel che riguarda i parametri ecocardiografici, è emerso che essi hanno valori statisticamente maggiori nei cani con MDCV ed IC compensata, rispetto ai cani del gruppo di controllo ed, inoltre, all'interno del gruppo di cani affetti da MDCV, quelli con IC scompensata hanno valori statisticamente maggiori rispetto ai cani con IC compensata. Tutto ciò, ovviamente, indica la presenza di un peggioramento della funzionalità cardiaca a mano a mano che la patologia progredisce.

Andando ad analizzare le eventuali correlazioni presenti tra tutti i parametri che sono stati valutati, i livelli di RDW sono statisticamente e positivamente correlati solamente con l'urea, ma in maniera debole. In realtà, ci si sarebbe dovuto aspettare una correlazione anche con i livelli di creatinina, evento che non è accaduto. I livelli di RDW, inoltre e ovviamente, sono correlati debolmente e negativamente con l'Hct e l'MCHC. Oltre a ciò, i livelli dell'RDW non si sono dimostrati correlati con gli indici ecocardiografici di ingrandimento atriale sinistro e di funzionalità cardiaca alterata all'interno del gruppo dei cani affetti da MDCV.

In medicina umana diversi studi hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione tra l'RDW ed eventi cardiovascolari (Tonelli *et al*, 2008), oltre che con le patologie infiammatorie dell'intestino (Clarke, Sagunathy, Kansal, 2008), l'ipertensione polmonare (Hampol *et al*, 2009), l'embolismo polmonare acuto (Zorlu *et al*, 2011), la cirrosi epatica in pazienti alcolizzati e non alcolizzati (Milik *et al*, 2011), gli stati infiammatori in generale, etc. Come appena detto, gli stati infiammatori possono provocare aumenti dei livelli di RDW, quindi una spiegazione plausibile dei sopraccitati risultati, può risiedere nel fatto che i cani con patologie diverse dall'MDCV, forse, hanno maggiori livelli di stato infiammatorio, legati alla sottostante patologia primaria, i quali potrebbero aver maggiormente influenzato i valori dell'RDW. Non si spiega perché l'RDW dei cani affetti da MDCV non abbia valori statisticamente superiori rispetto al gruppo di controllo, forse questo può essere almeno in parte legato alle limitazioni del presente studio.

I cani inseriti nel gruppo di affetti da MDCV, infatti, sono risultati statisticamente più anziani e con un peso corporeo statisticamente inferiore, rispetto a quelli del gruppo di controllo, il che non permette di avere un perfetto termine di paragone tra i due gruppi; tuttavia, è bene sottolineare che è difficile trovare cani di media-piccola taglia e di media-tarda età che non siano affetti da MDCV.

Nei cani affetti da altre patologie, ma non da MDCV, non è stato eseguito un esame ecocardiografico e Doppler ecocardiografico, quindi l'esclusione di una eventuale presenza di MDCV si è basata solamente sull'esame fisico (assenza di soffio o click sistolico all'auscultazione cardiaca); a tal riguardo, però, la grande maggioranza dei cani affetti da MDCV spesso presenta un reperto auscultatorio.

Ulteriori studi sono perciò richiesti, per poter verificare se esista o meno un reale significato prognostico dei livelli di RDW nei pazienti di specie canina affetti da MDCV; questi dovrebbero contemplare studi prospettici, gruppi di controllo senza differenze significative di età- peso- sesso- razza rispetto al gruppo di pazienti cardiopatici, indagini complete ecocardiografiche per tutti i soggetti ed eventualmente un preciso risultato finale di valutazione dei soggetti.

## 4.5 Conclusioni

Il presente studio ha evidenziato che l'RDW dei cani affetti da MDCV non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto a quello del gruppo dei cani sani di controllo, mentre l'RDW dei cani affetti da patologie diverse dalla MDCV ha mostrato avere livelli significativamente maggiori, sempre se confrontato col gruppo di controllo. All'interno del gruppo di cani affetti da MDCV, poi, i livelli di RDW non hanno differenze statisticamente significative tra il gruppo dei cani con MDCV ed IC compensata ed il gruppo dei cani con MDCV ed IC scompensata. Oltre a ciò, paragonando l'anemia tra i suddetti gruppi di cani, essa ha una maggior prevalenza nel gruppo degli affetti da altre patologie (ma non da MDCV), se confrontata col gruppo dei cani con MDCV, quindi la "sindrome dell'anemia cardiorenale" non si è rivelata una condizione frequente nei cani affetti da MDCV. Probabilmente ciò è spiegabile considerando che tra i cani affetti da altre patologie ma non da MDCV erano presenti alcuni soggetti che presentavano patologie ematologiche primarie ed, in più, che i fattori fisiopatologici alla base dell'insufficienza cardiaca nel cane non sono gli stessi rispetto all'uomo.

I dati della presente tesi dottorale, quindi, mostrano che i livelli di RDW non presentano innalzamenti rispetto ai valori normali nei cani affetti da MDCV. Se si vorrà in futuro valutare il valore prognostico di questo parametro eritrocitario in corso di MDCV saranno necessari ulteriori studi prospettici.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Achen SE, Gordon SG, Roland RM *et al* (2009): Serial evaluation of NT-proBNP in dogs with CHF predicts clinical score and the presence or absence of radiographic pulmonary edema. *J Vet Intern Med* **23**:687

Atkins C, Keene B, Brown B *et al* (2007): Results of the veterinary enalapril trial to prove reduction in onset of heart failure in dogs chronically treated with enalapril alone for compensated, naturally occurring mitral valve insufficiency. *JAVMA* **231**oct(7):1061-1069

Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, *et al* (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* **26**:1142–50

Bonagura JD e Schober KE (2009): Can ventricular function be assessed by echocardiography in chronic canine mitral valve disease? *J of Small Anim Pract* **50**(1):12–24

Bonfanti U, Comazzi S, Paltrinieri S, Bertazzolo W (2004): Stomatocytosis in 7 related Standard Schnauzers. *Vet Clin Pathol* **33**:234–239

Boon JA. Acquired heart disease. In: Boon JA editor. *Manual of veterinary echocardiography*. 1<sup>st</sup> edition. Iowa (USA): Blackwell publishing; 2006; p. 261-262.

Borgarelli M, Zini E, D'Agnolo G, *et al* (2004): Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *J Vet Cardiol* **6**:25–31

Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, *et al* (2008): Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med* **22**:120-128

Borgarelli M e Haggstrom J (2010): Canine Degenerative Myxomatous Mitral Valve Disease: Natural History, Clinical Presentation and Therapy. *Vet Clin Small Anim* **40**:651–663

Boswood A, Murphy A (2006): The effect of heart disease, heart failure and diuresis on selected laboratory and electrocardiographic parameters in dogs. *J Vet Cardiol* **8**:1-9

Boswood A (2009): Biomarkers in cardiovascular disease: beyond the natriuretic peptides. *J Vet Cardiol* **11**:S23-S32

Braunwald E (2008): Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* **358**:2148-2159

Buchanan JW (1977): Chronic valvular disease (endocardiosis) in dog. *Adv Vet Sci* **21**:57-106

Chetboul V, Serres F, Tissier R *et al* (2009): Association of Plasma N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Concentration with Mitral Regurgitation Severity and Outcome in Dogs with Asymptomatic Degenerative Mitral Valve Disease. *J Vet Intern Med* **23**:984–994

Church WM, Sisson DD, Oyama MA, Zachary JF (2007): Third degree atrioventricular block and sudden death secondary to acute myocarditis in a dog. *J Vet Cardiol* **9**:53-57

Clarke, Sagunathy, Kansal (2008): RDW as an additional marker in inflammatory bowel disease/undifferentiated colitis. *Dig Dis Sci. Sep*; **53**(9):2521-3

Connolly DJ, Guitian J, Boswood A, Neiger R (2005): Serum troponin I levels in hyperthyroid cats before and after treatment with radioactive iodine. *J Feline Med Surg* **7**:289-300

Cowie MR, Struthers AD, Wood DA *et al* (1997): Value of natriuretic peptides in assessment of patients with possible new heart failure in primary care. *Lancet* **350**:1349-53

Crosara S, Borgarelli M, Perego M *et al* (2010): Holter monitoring in 36 dogs with myxomatous mitral valve disease. *Aust Vet J* **88**:386–392

Davila DF, Nunez TJ, Odreman R, De Davila CA (2005): Mechanisms of neurohormonal activation in chronic congestive heart failure: pathophysiology and therapeutic implications. *Internat J Cardiol* **101**:343-346

Diana A, Guglielmini C, Pivetta M *et al* (2009): Radiographic features of cardiogenic pulmonary edema in dogs with mitral regurgitation: 61 cases (1998–2007). *JAVMA*, **235**(9):1058- 1063

Doiguchi O, Takahashi T (2000): Examination of quantitative analysis and measurement of the regurgitation rate in mitral valve regurgitation by the “proximal isovelocity surface area” method. *J Vet Med Sci* **62**:109-112

Ettinger S, Kantrowitz B. Disease of the trachea. In: Ettinger S, Feldman EC, editors. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6th edition. St. Louis (MO): Elsevier Saunders; 2005. p. 1217–32

Felker GM, Allen LA, Pocock SJ *et al* (2007): Red Cell Distribution Width as a Novel Prognostic Marker in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* **50**:40–7

Fine DM, Declue AE, Reiner CR (2008): Evaluation of circulating amino terminalpro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc* **232**:1674-1679

Forhecz Z, Gombos T, Borgulya G *et al* (2009): Red cell distribution width in heart failure: Prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. *Am Heart J* **158**:659-66

Gagna C, Meier D, Ru G *et al* (1998): Pathology of mitral valve in regularly slaughtered pigs: an abattoir survey on the occurrence of myxoid degeneration (endocardiosis), fibrosis and valvulitis. *J Vet Med Ser A* **45**:383-95

Goetze jP, Christoffersen C, Perko M *et al* (2003): Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *The FASEB J* **17**,1105-1107

Gow DJ, Gow AG, Bell R *et al* (2009): Serum cardiac troponin I in dogs with primary immune-mediated haemolytic anaemia. *J Small An Pract* **52**:259-264

Guglielmini C (2003): Cardiovascular Diseases in the Ageing Dog: Diagnostic and Therapeutic Problems. *Vet Res Commun* **27**(1):555–560

Guglielmini C, Diana A, Pietra M *et al* (2009): Use of the Vertebral Heart Score in Coughing Dogs with Chronic Degenerative Mitral Valve Disease. *J Vet Med Sci* **71**(1):913

Guglielmini C, Civitella C, Diana A *et al* (2010): Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Precapillary and Postcapillary Pulmonary Hypertension. *J Vet Intern Med* **24**:145–152

Hägström J, Hansson K, Kvarn C, Swenson L (1992): Chronic valvular disease in the cavalier King Charles spaniel in Sweden. *Vet Rec* **131**(24):549-53

Hägström J, Hansson K, Kvarn C (1995): Heart sounds and murmurs: changes related to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniel. *J Vet Intern Med* **9**:75-85

Hägström J, Hansson K, Kvarn C *et al* (1997): Effects of naturally acquired decompensated mitral valve regurgitation on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic peptide concentration in dogs. *Am J Vet Res* **58**(1):77-82

Haggstrom J, Pedersen HD, Kvarn C (2004): New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Vet Clin Small Anim* **34**:1209-1226

Haggstrom J, Hoglund K, Borgarelli M (2009): An update on treatment and prognostic indicators in canine myxomatous mitral valve disease. *J Small Anim Pract* **50**(1):25–33

Hampole CV, Mehrotra AK, Thenappan T *et al* (2009): Usefulness of red cell distribution width as a prognostic marker in pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* **104**(6):868-72

Hankes GH, Ardell JL, Tallaj J *et al* (2006): Beta1-adrenoceptor blockade mitigates excessive norepinephrine release into cardiac interstitium in mitral regurgitation in dog. *Am J Physiol. Heart and Circulat Physiol* **291**:H147-H151

Hansson K, Haggstrom J, Kwart C, Lord P (2009): Reader performance in radiographic diagnosis of signs of mitral regurgitation in cavalier King Charles spaniels. *J Small Anim Pract* **50**(1):44–53

Haehling S, Anker MS, Jankowska EA *et al* (2011): Anemia in chronic heart failure: can we treat? What to treat? *Heart Fail Rev*. DOI 10.1007/s10741-011-9283-x.

Hodges J e Christopher MM (2011): Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *JAVMA* **238**(11):1452-1458

Hunt PJ, Yandle TG, Nicholls MG *et al* (1995): The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (pro-BNP) circulates in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 1175-83

Jaewon O, Seok-Min K, Hong N *et al* (2009): Relation Between Red Cell Distribution Width With Echocardiographic Parameters in Patients With Acute Heart Failure. *J Cardiac Fail* **15**:517-522

Killingsworth C, Denney T, Zheng J *et al* (2008): Dissociation between cardiomyocyte function and remodeling with beta-adrenergic receptor blockade in isolated canine mitral regurgitation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(6):H2321-7

Kimmenade RJ e Jannuzzi JL (2009): The evolution of the natriuretic peptides e Current applications in human and animal Medicine. *J Vet Cardiol* **11**:S9eS21

Kittleson MD. Myxomatous atrioventricular valvular degeneration. In: KittlesonMD e Brown W, editors. *Small animal cardiovascular medicine*. 1<sup>st</sup> edition. St. Louis (USA): Mosby; 1998; p. 297-318

Kittleson M, Brown W (2003): Regurgitant fraction measured by using the proximal isovelocity surface area in dogs with chronic myxomatous mitral valve disease. *J Vet Intern Med* **17**:84-88

Kvart C, Häggström J, Pedersen HD *et al* (2002): Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation. *J Vet Intern Med* **16**(1):80-8

Lee CY, Burnett Jr JC (2007): Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail Rev* **12**:131-142

Lewis T, Swift S, Wooliams JA, Blott S (2011): Heritability of premature mitral valve disease in Cavalier King Charles spaniels. *Vet J* **188**:73- 6

Lisy O, Lainchbury JG, Leskinen H, Burnett Jr JC (2001): Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, dendroaspis natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure. *Hypertension* **37**:1089-1094

Loardi C, Alamanni F, Trezzi M *et al* (2010): Biology of mitral valve prolapse: the harvest is big, but the workers are few. *Int J Cardiol*. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.11.004

Lord PF e Suter PF. Radiology. In: Ed PR Fox, DD Sisson, NS Moise. *Textbook of canine and feline cardiology*. Philadelphia (USA), Saunders; 1999. pp 107-129

Madsen MB, Olsen LH, Haggstrom J (2011): Identification of 2 loci associated with Development of myxomatous mitral Valve disease in cavalier king Charles Spaniels. *J heredity* **102**(s1):s62–s67

Magga J, Vuolteenaho O, Tokola H *et al* (1998): B-type natriuretic peptide: a myocyte-specific marker for characterizing load-induced alterations in cardiac gene expression. *Annals of Medicine* **30**(1):39-45

Mair J. (2008): Biochemistry of B-type natriuretic peptide—where are we now? *Clin Chem Lab Med* **46**:1507–14.

Milić S, Mikolasević I, Radić M *et al* (2011): Clinical utility of red cell distribution width in alcoholic and non-alcoholic liver cirrhosis. *Coll Antropol. Sept* **35**(2):335-8

Miyauchi T, Masaki T (1999): Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physio* **61**:391-415

Moesgaard SG, Sørensen TM, Sterup A *et al* (2009): Changes in platelet function in Dachshunds with early stages of myxomatous mitral valve disease. *Res Vet Sci* **86**:320-324

Moonarmart W, Boswood A, Fuentes VL *et al* (2010): N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *J Small Anim Pract* **51**:84–96

Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K *et al* (2004): Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol* **33**:32-38

Mozaffarian D, Nye R, Levy WC (2003): Anemia predicts mortality in severe heart failure: the prospective randomized amlodipine survival evaluation (PRAISE). *J Am Coll Cardiol* **41**(11):1933-9.

Nanas JN, Matsouka C, Karageorgopoulos D *et al* (2006): Etiology of Anemia in Patients With Advanced Heart Failure. *J Am College Cardiol* **48**(12):2485- 9

Neiger R, Hadley J e Pfeiffer DU (2002): Differentiation of dogs with regenerative and non-regenerative anaemia on the basis of their red cell distribution width and mean corpuscular volume. *Vet Rec* **150**:431-434

Nicolle A, Chetboul V, Allerheiligen T *et al* (2007): Azotemia and Glomerular Filtration Rate in Dogs with Chronic Valvular Disease. *J Vet Intern Med* **21**:943–949

Noll G, Wenzell RR, Luscher TF (1996): Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. *Moll Cell Biochem* **157**:259-67

Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H *et al* (2011): Effects of transforming growth factor- $\beta$ 3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *Am J Vet Res* **72**(2):194-202

O’Gara P, Sugeng L, Lang R *et al* (2008): The role of imaging in chronic degenerative mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol, Cardiovasc Imaging* **1**:221-237

Ohad DG, Berkowitz J, Bdolah-Abram T (2010): Is the cardio-renal-anemia syndrome prevalent in dogs? *Proc. 2010 ACVIM Forum, Anheim June 9-12 2010. J Vet Intern Med* **24**:672 (abstract).

O’Hanlon R, O’Shea P, Ledwidge M, *et al* (2007): The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J Card Fail* **13**:50–5

Olsen LH, Martinussen T, Pedersen HD (2003): Early echocardiographic predictors of myxomatous mitral valve disease in dachshunds. *Vet Rec* **152**(10):293-7

Olsen LH, Häggstrom J, Petersen HD. Acquired valvular heart disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of veterinary Internal Medicine*, 7<sup>th</sup>ed. St. Louis, MI: Saunders Elsevier; 2010. p. 1299-1319

O’Sullivan ML, O’Grady MR, Minors SL (2007): Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* **21**(1):92-9

Oyama MA e Sisson DD (2004): Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *J Vet Intern Med* **18**(6):831-9

Oyama MA (2009): Neurohormonal activation in canine degenerative mitral valve disease: implications on pathophysiology and treatment. *J Small Anim Pract* **50**(1):3–11

Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, *et al* (2009): Differentiation of congestive heart failure versus respiratory disease in dogs with respiratory signs using NT-proBNP assay.

J Am Vet Med Assoc **235**:1319–25

Oyama MA e Singletary GE (2010): The Use of NT-proBNP Assay in the Management of Canine Patients with Heart Disease. Vet Clin Small Anim **40**:545–558

Pedersen HD (1995): Mitral valve prolapsed in 3-year old healthy Cavalier King Charles Spaniels. An echocardiographic study. Can J Vet Res **59**:294-8

Pedersen HD, Kristensen B, Norby B, *et al* (1996): Echocardiographic study of mitral valve prolapse in dachshunds. Zentralbl Veterinarmed A; **43**:103–10

(A) Pedersen HD, Haggstrom J, Falk T *et al* (1999): Auscultation in mild mitral regurgitation in dogs: observer variation, effects of physical maneuvers, and agreement with color Doppler echocardiography and phonocardiography. J Vet Intern Med **13**:56-64

(B) Pedersen HD, Lorentzen KA, Kristensen BO (1999): Echocardiographic mitral valve prolapse in cavalier King Charles spaniels: epidemiology and prognostic significance for regurgitation. Vet Rec **144**(12):315-20

Pedersen HD e Haggstrom J (2000): Mitral valve prolapsed in the dog: a model of mitral valve prolapsed in man. J Cardiovasc Res **47**:234- 43

Piantedosi D, Cortese L, Di Loria A *et al* (2009): Plasma atrial natriuretic peptide (proANP 31-67), B-type natriuretic peptide (Nt-proBNP) and endothelin-1 (ET-1) concentrations in dogs with chronic degenerative valvular disease (CDVD). Vet Res Commun **33** (1):197-200

Piek CJ, Junius G, Dekker A, Schrauwen E *et al* (2008): Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs. J Vet Intern Med **22** (2):366-73

Potter LR, Yoder AR, Flora DR, *et al* (2009): Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. Handb Exp Pharmacol **191**:341–66

Pouchelon JL, Jamet N, Gouni V *et al* (2008): Effect of benazepril on survival and cardiac events in dogs with asymptomatic mitral valve disease: a retrospective study of 141 cases. *J Vet Int Med*, **22**:905-914

Publication Committee For The VMAC Investigators (Vasodilatation in the Management of Acute CHF)(2002) Intravenous nesiritide vs nitroglycerin for treatment of decompensated congestive heart failure: a randomized controlled trial. *JAMA* **287**:1531-1540

Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA *et al* (2004): Combined inhibition of angiotensin II and endothelin suppresses the brain natriuretic peptide response to developing heart failure. *Clinical sci* **106**: 569-576

Reef V, Bain F, Spencer P (1998): Severe mitral regurgitation in horses: clinical, echocardiographic and pathological findings. *Equine Vet J* **30**:18-27

Serfass P, Chetboul V, Sampedrano C *et al* (2006): Retrospective study of 942 small-sized dogs: Prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sided heart failure, critical effects of breed and sex. *J Vet Cardiol* **8**:11-18

Serres F, Pouchelon JL, Poujol L *et al* (2009): Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J Vet Cardiol* **11**:103-121

Sisson DD, Oyama Ma, Solter PF (2003): Plasma levels of ANP, BNP, epinephrine, noriepinephrine, serum aldosterone, and plasma rennin activity in healthy cats and cats with myocardial disease. *J Vet Intern Med* **17**:438

Sisson DD (2004): Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *Vet Clin Small Anim* **34**:1105-1126

Takemura N, Toda N, Miyagawa Y *et al* (2009): Evaluation of Plasma N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) Concentrations in Dogs with Mitral Valve Insufficiency. *J Vet Med Sci* **71**(7):925–929

Tang YD, Katz SD (2006): Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circul* **113**:2454-2461

Tonelli M, Sacks F, Arnold M *et al* (2008): Relation Between Red Blood Cell Distribution Width and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease. *Circul* **117**:163-168

Vila G, Resl M, Stelzeneder D *et al* (2008): Plasma NT-proBNP increases in response to LPS administration in healthy men. *J Appl Physiol* **105**: 1741-1745

Wallace TW, Abdullah SM, Drazner MH *et al* (2006): Prevalence and determinants of troponin T elevation in the general population. *Circul* **113**: 1958-1965

Welles EG, Hall AS, Carpenter MD (2009): Canine complete blood counts: a comparison of four in-office instruments with the ADVIA 120 and manual differential counts. *Vet Clin Pathol* **38**(1): 20–29

Wiese S, Breyer T, Dragu A *et al* (2000): Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circul* **102**: 3074-3079

Wu AH (2006): Serial testing of B-type natriuretic peptide and NT pro-BNP for monitoring therapy of heart failure: the role of biologic variation in the interpretation of results. *Am Heart J* **152**:828–34

Zorlu A, Bektasoglu G, Kukul Guven FM *et al* (2011): Usefulness of admission red cell distribution width as a predictor of early mortality in patients with acute pulmonary embolism. *Am J Cardiol* **109**(1):128-34