

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA  
Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie  
Sezione di Clinica Medica**

**Dottorato di Ricerca in Scienze Cliniche e Farmaco-Tossicologiche  
Veterinarie**

**(Coordinatore: Prof. Angelo Persechino)**

**Studio su alcuni marker emocoagulativi**

**(Trombomodulina, Proteina C e Antitrombina III)**

**in gatti affetti da cardiomiopatie primitive a diverso stadio clinico**

**Docente guida:**

Ch.mo Prof.: Paolo Ciaramella

**Tesi di Dottorato del:**

Dr. Antonio Di Loria

**XVIII DOTTORATO DI RICERCA  
2002-2005**

# **Indice**

## **Premessa**

### **1.1 Le cardiomiopatie Feline Idiopatiche**

1.1.1 Cardiomiopatia ipertrofica(CMI)

1.1.2 Cardiomiopatia Restrittiva (CMR)

1.1.3 Cardiomiopatia dilatativa (CMD)

1.1.4 Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC)

### **1.2 Le cardiomiopatie feline quale modello della malattia nell'uomo: aspetti comparativi**

### **1.3 Trombosi e Trombo-embolismo**

1.3.1 Aspetti fisiopatologici dei fenomeni trombotici arteriosi

1.3.2 Emostasi e funzione endoteliale

1.3.3 Tromboembolismo arterioso del gatto

## **Parte sperimentale**

### **Materiali e Metodi**

### **Risultati**

### **Conclusioni e Discussioni**

## **Premessa**

Viene definita cardiomiopatia (kardía= cuore; mys= muscolo; pathos= sofferenza), una patologia cardiaca, primitiva o secondaria, caratterizzata da danno miocardico (Fuentes VL 1992). Si tratta di un gruppo eterogeneo di disordini, sia strutturali che funzionali, a carico del muscolo cardiaco (Fox 2003), che rappresentano nella specie felina le patologie cardiache di più frequente riscontro (Tilley e coll., 1977; Sisson e coll., 1999). L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce cardiomiopatia idiopatica una malattia primaria del muscolo cardiaco, la cui eziologia è sconosciuta. Le forme secondarie, invece, sono sostenute da processi infettivi, tossici, endocrino-metabolici, oppure rappresentano la sequela di vasculopatie coronariche. Nell'ultimo decennio ha ricevuto grande impulso la ricerca sulle miocardipatie del gatto, potendo questo animale rappresentare un modello per lo studio delle cardiomiopatie umane in virtù dei molti aspetti anatomico-clinici e patogenetici che le accomunano. Le cardiomiopatie vengono

classificate in base all'aspetto morfo-strutturale ed alle caratteristiche ecocardiografiche della funzione ventricolare. Esse possono essere suddivise in rapporto al tipo di deficit della funzione ventricolare che caratterizza la malattia cardiaca: si parla di deficit diastolico e sistolico a seconda che l'evento patologico coinvolga la compliance o la capacità contrattile ventricolare. Per rendere più chiara e definita la classificazione delle miocardiopatie, la World Health Organization/International Society e la Federation of Cardiology Task Force hanno proposto di suddividerle in: ipertrofica (CMI), dilatativa (CMD), restrittiva (CMR) e aritmogena del ventricolo destro (CMAVD). Purtroppo tale classificazione presenta dei limiti per quanto attiene alla specie felina. Infatti, alcune forme di cardiomiopatie descritte nel gatto non trovano una collocazione precisa nell'ambito della suddetta classificazione e vengono attualmente indicate con il termine generico di cardiomiopatie "indeterminate" o "non classificate" (Richardson P e coll., 1996; Kienle RD, 1998). Tra le cardiomiopatie feline quella ipertrofica rappresenta la forma di più frequentemente riscontro. Essa si caratterizza per la presenza

di ipertrofia ventricolare concentrica, con marcato ispessimento del miocardio e riduzione del lume ventricolare, in assenza di altre malattie cardiache o sistemiche in grado di indurre ipertrofia. La cardiomiopatia restrittiva è caratterizzata per un alterato riempimento diastolico ventricolare, dovuto a fibrosi endocardica ed endomiocardica diffusa, mentre gli spessori parietali appaiono normali o lievemente aumentati. La cardiomiopatia dilatativa si differenzia nettamente dalle precedenti, in quanto è presente in essa un assottigliamento degli spessori setto-parietali, associato a deficit della funzione sistolica. Le diverse forme di cardiomiopatie del gatto sono accomunate dalla notevole dilatazione dell'atrio sinistro, spesso associata alla comparsa di trombi. Le formazioni trombotiche atriali, spesso di grosse dimensioni, possono frammentarsi, divenendo trombo-emboli, che vengono trasportati dalla corrente sanguigna nella circolazione generale. Il tromboembolismo arterioso, in specie a livello della biforcazione aortico-iliaca rappresenta una possibile complicazione delle cardiomiopatie feline.

I meccanismi che conducono alla formazione di trombi atriali non sono stati ancora completamente chiariti nel gatto. Sebbene siano state proposte diverse teorie trombogenetiche, nessuna di esse appare completamente esaustiva nella specie felina. In linea generale in corso di cardiomiopatie feline si può ritenere valida la triade virchowiana, che prende in considerazione la stasi sanguigna, il danno endoteliale e l'ipercoagulabilità ematica (Virchow, 1856). Il rallentamento della velocità del flusso sanguigno all'interno dell'atrio dilatato, a causa della ridotta compliance ventricolare, rappresenta nel gatto un fattore trombogenetico determinante. Infatti quando il flusso sanguigno subisce un rallentamento e diviene più viscoso, soprattutto in prossimità delle pareti delle camera atriale, i globuli rossi, le piastrine e gli altri fattori della coagulazione tendono ad unirsi, con l'innesco dei processi emocoagulativi. Nei pazienti umani il rinvenimento di contrasto ecografico spontaneo all'interno dell'atrio sinistro (smoke) viene associato costantemente all'aumento delle dimensioni e al rallentamento del flusso ematico della camera striale (Kittleson, 1998). Tale rilievo è

frequente nei pazienti umani con fibrillazione atriale, stenosi mitralica e cardiomiopatie, venendo considerato segno premonitore di trombosi atriale incipiente. Nella specie felina il contrasto ecografico spontaneo viene descritto in corso di cardiomiopatie, pur tuttavia non ci sono studi che dimostrino una stretta relazione tra tale segno ecografico e la successiva formazione di trombi nell'atrio sinistro.

Indagini necroscopiche condotte su gatti affetti da cardiomiopatie, hanno messo in rilievo in una certa percentuale dei casi, lesioni fibrotiche dell'endocardio atriale, associate a dilatazione e formazione di trombi all'interno dell'atrio (Kittleson, 1998). Non esistono dati certi riguardo l'estensione e la gravità dello sviluppo delle lesioni fibrotiche e lo sviluppo di trombi.

Alcuni studi effettuati su gatti cardiopatici hanno fornito elementi indicativi di una condizione di ipercoagulabilità ematica. Helensky e Ross (1987), in uno studio effettuato in gatti cardiopatici, hanno messo in luce un aumento dell'aggregabilità piastrinica. Welles e coll., (1994) hanno riscontrato livelli più alti

di AT III e più bassi di plasminogeno in animali con cardiomiopatia. Di notevole interesse, nel gatto, è il riscontro di una maggiore sensibilità in vitro agli stimoli di aggregazione piastrinica, rispetto all'uomo e ad altre specie animali (Ohta e coll., 1992; Kittleson, 1998). Quest'ultimo rilievo farebbe ipotizzare una maggiore suscettibilità della specie felina alla formazione di trombi in condizioni di alterata emodinamica.

Le moderne teorie riguardanti la fisiopatologia dello scompenso cardiaco tendono a considerare quest'ultimo una malattia neuro-ormonale sistemica. Da questo punto di vista il coinvolgimento dell'endotelio vasale gioca un ruolo centrale. Esso è attualmente considerato come un importante organo endocrino, che svolge un ruolo critico di interfaccia tra la circolazione sanguigna ed i tessuti corporei, presiedendo a numerose funzioni regolatorie. Inoltre, le sue proprietà anticoagulanti, fibrinolitiche e antitrombotiche, contribuiscono al mantenimento delle normali proprietà reologiche del sangue. Esistono evidenze cliniche, sia nei pazienti umani che in modelli animali, che dimostrano, come l'endotelio venga coinvolto, non

solo in corso di patologie prettamente ipertensive primarie e secondarie, ma anche in corso di insufficienza cardiaca congestizia (Clavell e coll., 1993; Rubanyi, 1993; Sisson 2004). Infatti, l'insufficienza cardiaca cronica, sia essa legata a deficit sistolico che a deficit diastolico, induce modificazioni emodinamiche di tale portata da richiedere l'attivazione a lungo termine dei meccanismi sistemici e locali dell'omeostasi idroelettrolitica e pressoria. Attualmente si ritiene che la disfunzione endoteliale rappresenti parte integrante dei meccanismi fisiopatologici che determinano l'evoluzione dell'insufficienza cardiaca. Inoltre, nei pazienti umani esistono numerose evidenze cliniche che attestano l'associazione tra disfunzione endoteliale e condizioni di ipercoagulabilità ematica, con l'aumento del rischio di trombosi vascolare. A tale proposito la valutazione dei livelli plasmatici di alcuni fattori endoteliali, ad azione pro-coagulante (fattore di von Willebrand) e ad azione anticoagulante (TM, proteina C e ATIII), come marker di rischio trombotico e di danno endoteliale nei pazienti umani cardiopatici,

è di comune utilizzo nella pratica clinica (Pelkonen KM 2005; Freestone, 2005)

Lo scopo delle nostre indagini, che formano l'oggetto della presente tesi di dottorato, è quello di identificare, attraverso uno studio su 50 gatti affetti da cardiomiopatie primitive (CMI, CMR, UCM), a diverso stadio clinico, esaminati durante l'attività clinica svolta presso la sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università Federico II di Napoli e presso la Soundtechnologies Inc. Carlsbad California (USA) dal 2002 al 2005, i tassi plasmatici di alcuni fattori implicati nel processo emocoagulativo quali, trombomodulina (TM), proteina C e antitrombina III (ATIII). La dimostrazione di una possibile associazione tra le modificazioni plasmatiche di tali fattori e lo studio, potrebbe certamente aiutare il clinico, sia a meglio comprendere l'esatto ruolo che l'endotelio e il processo emocoagulativo svolgono in tali affezioni sia, in futuro, a mettere in atto misure più razionali per il controllo degli eventi trombotici.

I risultati della presente indagine saranno preceduti da una trattazione sulle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e diagnostiche riguardanti le cardiomiopatie nella specie felina e umana e sugli aspetti eziopatogenetici dei fenomeni trombotici arteriosi.

## **1.1 Le cardiomiopatie Feline Idiopatiche**

### **1.1.1 Cardiomiopatia ipertrofica(CMI)**

**La cardiomiopatia ipertrofica(CMI)** è una patologia primitiva del muscolo cardiaco che colpisce i gatti, l'uomo e altre specie animali, tra cui tra cui i cani e i suini. Nonostante siano trascorsi 47 anni dalla prima descrizione di questa patologia miocardica, ancora oggi essa è oggetto di notevole interesse da parte dei ricercatori sia in campo umano che veterinario (Teare D 1958). Dopo l'uomo solo nel gatto è stata descritta un'ereditarietà (Liu SK e Tilley 1980), mentre nei suini essa è solo sospetta (Huang SY 1996). In medicina umana, un recente studio epidemiologico, basato su uno screening ecocardiografico di massa, ha messo in luce un'incidenza della CMI pari allo 0,2% (Maroon e coll., 1995; 2003). Tenendo presente la popolazione mondiale (circa 6 miliardi) e italiana (circa 60 milioni) tale patologia può potenzialmente interessare 12.000.000 individui nel mondo e 120.000 in Italia. Questi di dati numerici giustificano la crescente l'attenzione rivolta alla

CMI, rappresentando essa un modello naturale di studio della malattia umana. La CMI rappresenta la forma di più frequente riscontro nel gatto, con un'incidenza del 1,6%. Essa è caratterizzata, dal punto di vista morfo-strutturale, da ipertrofia concentrica ventricolare, in assenza di cause evidenti responsabili di quest'ultima (ipertensione arteriosa sistemica, ipertiroidismo, acromegalia). Altri aspetti salienti della CMI sono rappresentati da dilatazione atriale sinistra, ostruzione dinamica del tratto di efflusso del ventricolo sinistro (LVOT) e da aumento della contrattilità ventricolare. L'ipertrofia a carico del ventricolo può esprimersi con diversa distribuzione; difatti possiamo riscontrare forme globali e simmetriche (interessamento diffuso del setto e della parete libera ventricolare), asimmetriche settali totali o segmentali, asimmetriche parietali totali o segmentali (Peterson e coll., 1993). Nell'uomo tale cardiomiopatia riconosce una eziologia ereditaria ed è causata da mutazioni in 7 geni che codificano per diverse proteine sarcomeriche (Bonne e coll., 1998). Tali proteine anomale interferiscono con la funzione del sarcomero,

alterando i meccanismi contrattili dei cardiomiociti, cui segue lo sviluppo di ipertrofia cardiaca. Il muscolo cardiaco sostituisce continuamente i sarcomeri difettosi con nuovi sarcomeri, producendosi così un ispessimento del miocardio, nonostante le proteine sarcomeriche siano anomale e non funzionanti. In base al tipo di mutazione, ed al grado di penetranza, conseguono espressioni fenotipiche diverse delle proteine sarcomeriche interessate e quindi differenti espressioni cliniche della malattia. E' stato accertato in pazienti umani che mutazioni della catena pesante della  $\beta$  miosina ( $\beta$ -MHC): Arg - Gln, Arg - Cys, Arg - Trp sono associate a malattia con prognosi infausta; in contrasto mutazioni  $\beta$ -MHC: Leu -Val evidenziano una bassa penetranza e risultano associate a malattia con decorso benigno e ridotta incidenza di morte cardiaca improvvisa. Le mutazioni che riguardano la troponina T e l' $\alpha$ -tropomiosina determinano, invece, una ipertrofia di lieve entità e spesso subclinica, ma associata a morte improvvisa in una certa percentuale dei pazienti. Nell'uomo le mutazioni sarcomeriche  $\beta$ -MHC rappresentano il 35-40% (Marian e Roberts, 1995), le

mutazioni riguardanti la troponina T il 5 % e quelle riguardanti l' $\alpha$ -tropomiosina il 15 % (Watkins e coll., 1995; Seidman JG, Seidman CE, 1998). Nell'ambito della specie felina, in alcune razze (Persiano e Main Coon), ed in particolari linee familiari, è ipotizzabile un meccanismo genetico, simile a quello verificato nell'uomo. Di particolare interesse è lo studio condotto da Marian e coll. (1995), che hanno veicolato nei cardiomiociti felini il gene mutato per la  $\beta$  miosina ( $\beta$ -MHC): Arg – Gln, utilizzando come vettore un adenovirus, che ha dato luogo dopo 5 giorni a gravi modificazioni sarcomeriche analoghe a quelle dell'uomo, nel 50 % dei cardiomiociti. In alcune famiglie di gatti di razza Main Coon, la malattia riconosce una trasmissione ereditaria con carattere autosomico dominante e penetranza del 100% in età adulta (Kitleson e coll., 1999). La CMI viene frequentemente descritta nei gatti Persiani (Martin e coll., 1994), sebbene venga anche segnalata nei gatti europei e nei gatti American Shortair (Di Loria e coll., 2005; Meurs e coll., 1997) Nell'uomo una caratteristica morfo-strutturale saliente è rappresentata dall'orientamento anomalo di almeno il 5 % delle

fibre miocardiche , che si riscontra nel 90 % dei pazienti. Nel gatto è possibile rinvenire la medesima alterazione in circa il 30% dei soggetti ammalati, sebbene nelle famiglie di Maine Coon interessate l'orientamento anomalo delle fibre rappresenti un aspetto pressoché costante (Kittleson, 1998). In molti gatti la malattia decorre in forma silente e la diagnosi rappresenta un reperto occasionale, nel corso di indagini pre-operatorie (ad. es. ovarioisterectomie, detartrasi, ecc.). Il riscontro di un soffio o di aritmie, rappresenta spesso l'unico segno clinico evidente. Nelle fasi avanzate della malattia, il rilievo di ingrandimento dell'atrio depone solitamente per una prognosi sfavorevole. A tale riguardo Peterson e coll., (1993) riportano tempi di sopravvivenza maggiori di tre mesi rispetto alla media dei gatti ammalati, in presenza di un atrio sinistro con dimensioni normali e capacità contrattile conservata del miocardio. Non sono infrequenti casi di morte improvvisa analogamente a quanto avviene nell'uomo. Dal punto di vista fisiopatologico la riduzione della compliance ventricolare, dovuta alla marcata ipertrofia concentrica, determina ipertensione a carico del letto

vascolare polmonare con insorgenza di edema polmonare acuto. Il tromboembolismo arterioso (TEA) rappresenta una comune complicazione della CMI nel gatto. Infatti, Smith e Tobias (2003) in una casistica di 127 animali con tromboembolismo arterioso riferiscono che il 19 % di TEA era conseguente a CMI.

### **1.1.2 Cardiomiopatia Restrittiva (CMR)**

Si tratta di una cardiomiopatia ad eziologia sconosciuta, caratterizzata da ostacolato riempimento diastolico ventricolare dovuto ad un processo di irrigidimento del miocardio (Wynne e coll., 1997; Richardson e coll., 1996). Ne consegue un incremento della pressione telediastolica ventricolare, che nelle fasi avanzate della patologia è responsabile di insufficienza cardiaca congestizia sinistra e/o destra (Kushwaha e coll., 1997). Infatti, il riempimento protodiastolico del ventricolo sinistro è rapido, ma viene prontamente ostacolato a causa delle pareti ventricolari rigide (Wynne e coll., 1997; Appleton e coll., 1988) Nei pazienti umani, così come nei gatti, è possibile differenziare due forme: CMR miocardica ed CMR endomiocardica (Kushwaha e coll., 1997; Angelini e coll., 1997). La forma miocardica è caratterizzata da alterata compliance ventricolare, pareti ventricolari normali o modicamente ispessite, dilatazione ventricolare destra, marcata dilatazione atriale o biatriale, e funzione sistolica normale o

lievemente ridotta (Fox, 1999; Liu e Fox, 1999). La forma endomiocardica si associa invece ad estesa fibrosi endocardica o endomiocardica (Fox, 1999). L'eziopatogenesi della CMR appare ancora oggi incerta, sebbene si facciano strada due ipotesi patogenetiche. La prima ipotesi invoca un possibile ruolo dell'eosinofilia. Infatti evidenze sperimentali hanno dimostrato come i granulociti eosinofili possano danneggiare il miocardio con conseguente riparazione da parte di tessuto fibroso (Fauci e coll., 1982; Kushwaha e coll., 1997). Tale supposizione eziologia è suffragata dalla presenza nell'uomo di cardiomiopatie eosinofiliache, quali la cardiomiopatia eosinofilica o Endocardite di Löffler (Fauci e coll., 1982; Olsen e Spry, 1985; Berger e coll., 1994; Tai e coll., 1987). Nel gatto pochi casi di CMR sono stati associati ad ipereosinofilia, sebbene tale condizione non sembra predisporre allo sviluppo di tali cardiomiopatie (Liu e Fox, 1999; Saxon e coll., 1991; Scott e coll., 1985; Mc Ewen e coll., 1985; Meurs e coll., 2000). La seconda ipotesi riconosce come genesi della CMR una disfunzione del sistema immunitario conseguente ad infezioni

virali. Endomiocarditi di origine non accertata sono state descritte in alcuni casi di fibrosi endomiocardica (Liu e Fox, 1999; Stalis e coll., 1995; Liu, 1977). Inoltre materiale genomico di parvovirus è stato isolato dal miocardio felino in cardiomiopatie (compresa la CMR) e miocarditi (Meurs e coll., 2000). Altri autori hanno proposto che la fibrosi endomiocardica (FEM) rappresenti nei pazienti umani l'esito di vasculiti (Huong e coll., 1997). Tali ipotesi necessitano, comunque di ulteriori studi approfonditi, atti a meglio definire il ruolo delle infezioni virali e della risposta immunitaria nella genesi della cardiomiopatia restrittiva. Dal punto di vista anatomopatologico, il segno distintivo della FEM è caratterizzato da una grave ed estesa cicatrice (Liu e Fox, 1999; Fox, Sisson, Moise, 1999; Kushwaha e coll., 1997), che solitamente interessa il ventricolo sinistro. Il ventricolo destro, a differenza di ciò che accade nell'uomo, risulta interessato raramente. Frequente è il riscontro di una grossa cicatrice disposta a ponte fra la parete libera ventricolare e il setto interventricolare, che determina una stenosi stabile, quasi a

mimare una sorta di tubo rigido che si estende dalle porzioni medie a quelle apicali del ventricolo. Meno comunemente è possibile osservare forme di gravità estrema, dette obliteranti con fibrosi estesa e riduzione sostanziale della camera ventricolare sinistra. Il tessuto fibrotico può inoltre rendersi responsabile della fusione dei muscoli papillari e delle corde tendinee, e di irregolarità a carico dei lembi mitralici, determinando così rigurgito mitralico. Le classiche lesioni della CMR sono associate in alcuni casi ad infarti miocardici focali a livello del ventricolo sinistro. A livello di atrio, orecchietta o ventricolo sinistro si possono riscontrare trombi murali, con possibili complicazioni tromboemboliche a livello di tratto distale dell'aorta e delle arterie renali. Nei casi avanzati il quadro clinico è caratterizzato da versamento pericardico, toracico ed addominale. I reperti ecocardiografici nei gatti affetti da CMR appaiono simili a quelli delle forme umane di FEM (Fox, Sisson, Moise, 1999; Vijayaraghavan e coll., 1983; Acquatella e coll., 1990). Infatti ecograficamente sono visibili aree iperecogene che corrispondono alla cicatrice fibrotica, che

appare disposta nella porzione media del ventricolo. Inoltre, l'esame doppler evidenzia un flusso transmitralico con pattern restrittivo (inversione rapporto onde E/A). Allo stato attuale comunque non è possibile distinguere, sulla base dei soli rilievi morfo-strutturali, la CMR idiopatica da alcune malattie a carattere infiltrativo del miocardio e da processi riparativi conseguenti a miocarditi o all'azione di altre noxae.

### **1.1.3 Cardiomiopatia dilatativa (CMD)**

La cardiomiopatia dilatativa (CMD) è una sindrome caratterizzata da dilatazione tetracamerale, assottigliamento degli spessori setto-parietali, insufficienza mitralica relativa e da ridotta funzione sistolica. Fino agli anni 80 la CMD rappresentava il 30% di tutte le patologie cardiache feline (Fox, 1999). A seguito della sistematica supplementazione di taurina nelle diete commerciali per gatti, la percentuale di incidenza si è ridotta drasticamente all'3-7% (Ettingher, 2000). Nella nostra casistica personale la CMD risulta al disotto dell'1%. Molte razze mostrano una predisposizione alla deficienza di taurina (siamese, abissino e burnese), con un'incidenza maggiore (69%) nel sesso maschile (Fox, 1999). La forma di CMD taurino-dipendente risulta essere reversibile; difatti, l'aggiunta di questo elemento corregge la disfunzione sistolica. L'eziologia della forma idiopatica sembra essere plurifattoriale: mutazioni genetiche, miocarditi virali, disturbi del sistema immunitario. I dati riguardanti l'eziopatogenesi della CMD felina sono molto

scarsi, e molte ipotesi patogenetiche rappresentano soltanto la traslazione di quanto noto in medicina umana. Alcuni gatti con CMD idiopatica hanno mostrato un'estesa lesione fibrotica del miocardio, associata a lesioni infartuali (Fox e coll., 1997). Lawler e coll., (1993) hanno segnalato una forma ereditaria di CMD felina. La possibilità che una miocardite sia associata ad una CMD felina è suggerita dall'isolamento di DNA genomico virale del parvovirus da tessuti miocardici di gatti con CMD (Meurs e coll., 2000).

#### **1.1.4 Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVC)**

Si caratterizza per una infiltrazione fibroadiposa progressiva del miocardio del ventricolo destro. Tale infiltrazione in alcuni casi può estendersi al ventricolo sinistro e al setto interventricolare (Richardson e coll., 1996; McKenna WJ e coll. 1994). Si manifesta con marcata dilatazione ed assottigliamento dell'atrio e del ventricolo destro. La valvola tricuspide a causa della grave dilatazione ventricolare e del maleallineamento dei muscoli papillari, può presentare segni insufficienza tricuspide, da considerare relativa per la mancanza di segni displasici a carico dei lembi valvolari. Le modificazioni strutturali sono responsabili di instabilità elettrica miocardica, con sviluppo di tachiaritmie, sopraventricolari e ventricolari e morte improvvisa (Brembilla-Perrot e coll., 1998). La causa di tali cambiamenti strutturali non è nota, anche se sono state ipotesi riguardanti i possibili eventi scatenanti (miocarditi, malattie autoimmuni, ereditarietà, apoptosi

cellulare (Pinamonti e coll., 1992; Fontane e coll., 1998; Fox e coll., 1998; Mallat e coll., 1996). La prevalenza della ARVC nei gatti rappresenta il 2-4% delle cardiomiopatie feline diagnosticate presso l'Animal Medical Center di New York; l'età degli animali oscilla tra 2 e 20 anni, senza una specifica predisposizione razziale.

## **1.2 Le cardiomiopatie feline quale modello della malattia nell'uomo: aspetti comparativi**

Numerose ricerche sono state finalizzate, in questi ultimi anni, alla possibilità di definire un modello animale che potesse essere utilizzato nello studio delle cardiomiopatie umane. Infatti, anche se utilizzati per lungo tempo nello studio di molte patologie umane, i modelli murini o altri animali da laboratorio non sempre si sono mostrati in grado di riprodurre fedelmente le condizioni che si verificano in vivo in altre specie animali, uomo compreso. Nel 1996 Geisterfer-Lowrance e coll., hanno proposto il topo quale animal-model per lo studio della cardiomiopatia ipertrofica umana, patologia che riveste una notevole importanza a causa della sua elevata incidenza. L'utilizzo di topi transgenici è stato molto utile per valutare l'impatto di geni mutati sulla capacità contrattile del muscolo cardiaco. Tuttavia, le ridotte dimensioni del cuore murino e la sua elevata frequenza, condizionano spesso una differente espressione fenotipica dei geni mutati in corso di CMI (Tardiff

JC e coll., 1998). Il cuore dei topi geneticamente modificati mostra, in disaccordo con quanto succede nell'uomo, un minor grado di ipertrofia e l'assenza di morte improvvisa. Per tali motivi, pur offrendo il modello murino una notevole maneggevolezza nella manipolazione genetica e rapidità nello sviluppo della patologia, l'attenzione dei ricercatori si è spostata su modelli di animali superiori, che per la loro complessità più si avvicinano all'uomo. Molti studi anatomoistopatologici hanno messo in evidenza notevoli similitudini morfo-strutturali tra la cardiomiopatia ipertrofica umana e quella felina (Tilley e coll., 1977; Andrews e coll., 1979; Liu e coll., 1980; Smucher ML 1990; Liu SK e coll., 1993; Liu SK e coll., 1994; Dai e coll., 1995; Huang e coll.,1996). Inoltre, trials clinici condotti nella specie felina hanno mostrato come la sintomatologia ed il follow-up terapeutico mostrino notevoli analogie in queste due forme di CMI (Fox, 1995). La storia clinica di pazienti umani e felini è infatti accomunata dall'insorgenza di insufficienza cardiaca congestizia con edema polmonare, aritmie, tromboembolismo arterioso e possibile morte improvvisa. Lo

studio comparativo uomo-gatto ha senz'altro ricevuto un impulso determinante dall'avvento, a partire dagli anni 80' dell'applicazione dell'ecocardiografia nella diagnosi cardiologica, che ha consentito di definire meglio i caratteri anatomici delle cardiomiopatie feline ed una più corretta classificazione delle stesse. Negli ultimi anni studi condotti sul genoma di gatti portatori di cardiomiopatia ipertrofica, hanno chiarito come anche nella specie felina tale malattia riconosca un'eziologia genetico-ereditaria. Kittleson e coll., (1999) hanno dimostrato, nell'ambito di una colonia di gatti di razza Main Coon, una ereditabilità, autosomica dominante della malattia, analogamente a quanto avviene nell'uomo. Tali rilievi hanno consolidato l'ipotesi che il gatto rappresenta un ottimo modello naturale di malattia per lo studio della CMI umana. Inoltre, lo studio comparativo gatto-uomo risulta notevolmente agevolato dall'alta incidenza della CMI nella specie felina. Infine, le similitudini eziologiche, patogenetiche e cliniche lasciano supporre che il modello felino possa essere esteso anche allo

studio di altre forme di cardiomiopatia umana, quali ad esempio  
la CMR.

## **1.3 Trombosi e Trombo-embolismo**

### **1.3.1 Aspetti fisiopatologici dei fenomeni trombotici arteriosi**

Con il termine di trombosi si intende la formazione di masse solide nelle cavità cardiache o in quelle dei vasi arteriosi o venosi durante la vita, a partire da costituenti normali del sangue. Esiste una differenza fra trombo e coagulo; mentre il trombo resta adeso alla parete del vaso ed è friabile, con superficie irregolare e struttura non omogenea, il coagulo non aderisce alla superficie del vaso, presentando superficie liscia e levigata. Ad oggi la triade di Virchow rimane, il fondamento concettuale per comprendere la patogenesi della trombosi, anche se, col progredire delle conoscenze sull'emostasi, negli ultimi decenni è stata riconosciuta l'importanza delle alterazioni vasali e della rottura di alcuni equilibri nella regolazione dei meccanismi emocoagulativi. A seconda della composizione e del colore, si distinguono tre tipi di trombi: bianchi rossi e variegati. Le piastrine aderiscono all'endotelio danneggiato, si aggregano ed

innescano una tipica risposta di attivazione con liberazione di ADP,  $\text{Ca}^{++}$ , serotonina, prostaglandine, PAF e altri fattori che ne favoriscono l'ulteriore aggregazione attorno al nucleo primitivo. Si forma così il trombo bianco, costituito principalmente da piastrine. Poiché anche il meccanismo della coagulazione viene attivato in sede locale, insieme alle piastrine si troveranno polimeri di fibrina atti a stabilizzare ulteriormente il trombo bianco. Quando il reticolo di fibrina diviene particolarmente stabile ed abbondante, riesce a trattenere globuli rossi ed i leucociti, formando una lamina rossa sovrapposta al trombo bianco. L'alternanza di lamine bianche (prevalenza di piastrine, chiamate strie di Zahn) e lamine rosse (prevalenza di globuli rossi e fibrina) dà luogo al trombo variegato. Infine, il trombo rosso si caratterizza per la presenza quasi esclusiva di fibrina e globuli rossi con poche piastrine sparse. Il trombo rappresenta quindi il prodotto di un processo coagulativo parziale. In quello bianco il processo è limitato alla componente endotelio-piastrinica, mentre in quello rosso si assiste all'attivazione completa dei meccanismi emocoagulativi. La natura del trombo,

dipende da vari fattori, ma soprattutto dalla velocità della corrente sanguigna, che favorisce l'allontanamento dalla formazione trombotica dei globuli rossi, dotati di peso specifico elevato e poco viscosi, e dalla rapidità del processo coagulativo. I trombi arteriosi presentano una struttura differente rispetto a quelli venosi. I trombi arteriosi sono prevalentemente piastrinici o variegati, poiché la notevole velocità del sangue arterioso fa sì che i globuli rossi aderiscano difficilmente al trombo, rappresentando così un fattore limitante per la crescita dei trombi stessi. Al contrario, i trombi venosi, essendo la velocità del sangue venoso notevolmente ridotta, risultano essere costituiti prevalentemente da globuli rossi. A tal riguardo un interessante aspetto differenziale viene fornito dalla valutazione dell'utilizzazione piastrinica e del consumo di fibrinogeno in corso di trombosi. Si è riscontrato che fibrinogeno e piastrine marcate (iodio;<sup>51</sup>Cr), infuse in pazienti sani, normalmente sopravvivono rispettivamente 5-6 giorni e 8-9 giorni. Nei pazienti che mostrano trombosi arteriosa la sopravvivenza delle piastrine appare fortemente ridotta a causa della loro rapida

utilizzo a formare il trombo bianco. Il fibrinogeno resta invece nel range di normalità, in quanto non viene immediatamente utilizzato. Nei pazienti con trombosi venosa, invece, i tempi di sopravvivenza delle piastrine, e soprattutto del fibrinogeno, sono molto ridotti a causa della loro utilizzazione per la formazione del trombo rosso.

Macroscopicamente il trombo presenta una testa, un corpo e la coda. La testa rappresenta il punto di attacco all'endotelio danneggiato, ed è essenzialmente costituita da piastrine e fibrina. Il corpo, per lo più variegato, è costituito nelle arterie prevalentemente da piastrine, mentre nelle vene è prevalentemente rosso. Esso può essere mobile ed estendersi nel letto vascolare secondo il flusso ematico, raggiungendo lunghezze ragguardevoli. La coda appare costituita soprattutto, nei vasi venosi, da fibrina e globuli rossi e può anch'essa assumere lunghezza variabile. I trombi possono essere completamente ostruttivi (trombi ostruenti), oppure possono occupare soltanto una porzione del lume del vaso, restando accollati alle sue pareti (trombi parietali). Una varietà di trombi

parietali sono i trombi a cavaliere, che si formano a livello della biforcazione e triforcazione dei vasi. Un ulteriore suddivisione dei trombi può essere effettuata in base alla sede, distinguendo quindi trombi venosi, arteriosi e intracardiaci. La trombosi intracardiaca è relativamente frequente e si verifica principalmente negli atri, ed in particolar modo nelle auricole, in rapporto a disturbi di circolo correlati a patologie cardiache. Nelle camere cardiache essi possono assumere forma rotondeggiante, trombi a palla, e determinare un ostacolo al normale flusso durante il ciclo cardiaco. I trombi intracardiaci, inoltre, possono subire un rimaneggiamento fibrinolitico, cui segue il distacco di frammenti in grado di migrare verso altre sedi, seguendo il flusso ematico. Nell'uomo la fibrillazione e la fluttuazione atriale, sono eventi aritmici che predispongono alla formazione dei trombi intracardiaci, con conseguenti fenomeni tromboembolici a carico di altri distretti corporei. Una volta formatosi, il trombo può andare incontro ad una evoluzione: organizzazione, ricanalizzazione, rammollimento, calcificazione. L'organizzazione consiste nella trasformazione del trombo in

tessuto connettivale: cellule endoteliali, macrofagi e fibroblasti della parete del vaso, e probabilmente anche cellule ematiche, invadono il trombo, dando luogo alla proliferazione di un connettivo giovane con i caratteri del tessuto di granulazione.

La ricanalizzazione rappresenta un'ulteriore evoluzione del processo ed è dovuta alla neoformazione di una rete capillare ed anche di canali che attraversano il trombo in tutta la sua lunghezza. La portata ematica di questi nuovi vasi resta sempre inferiore a quella del vaso trombizzato, il che spiega perché alla ricanalizzazione non segue il recupero funzionale.

Il rammollimento del trombo invece, avviene per l'entrata in funzione di meccanismi proteolitici. Proteasi, di origine batterica, granulocitaria o plasmatica (in particolar modo la fibrinolisinasi), possono digerire la massa trombotica. Il trombo può quindi essere invaso da macrofagi e neutrofili, attratti da potenti stimoli chemiotattici, quali i fibrinopeptidi derivati dalla lisi di fibrina e il fattore piastrinico IV, liberatosi dalle piastrine aggregate. Queste cellule fagocitano tutti i detriti cellulari e parte dei prodotti della fibrinolisi, favorendo così la lisi del trombo.

Per ciò che concerne la calcificazione occorre dire che si tratta di un'evenienza alquanto rara.

Le conseguenze cliniche della trombosi possono essere molto gravi. Le due principali complicazioni sono rappresentate dall'occlusione e dall'embolia, quest'ultima responsabile anch'essa di riduzione o arresto del circolo, sebbene in distretti distanti da quelli in cui è avvenuta la formazione del trombo. L'occlusione porta all'arresto parziale o totale del flusso di sangue e quindi dell'apporto di ossigeno ad i tessuti irrorati da quel vaso. Se il vaso interessato è funzionalmente terminale, e non è presente un circolo collaterale, il tessuto interessato va incontro a necrosi (infarto). Se invece l'occlusione è parziale, o vi sono circoli collaterali in grado di garantire una certa irrorazione, il tessuto viene interessato da danni più o meno gravi, in funzione del grado di ischemia. L'altra complicazione è data dal distacco e/o frammentazione del trombo, con formazione di emboli (tromboemboli) di varia grandezza, che possono ostruire i vasi, in particolare quelli del microcircolo. I sintomi clinici possono essere diversi a seconda del tessuto o organo interessato e del

calibro dei vasi occlusi. Nel caso in cui vengano interessati importanti vasi encefalici o cardiaci si può avere morte improvvisa. Gli esatti meccanismi patogenetici che determinano la formazione dei trombi, sono a tutt'oggi oggetto di discussione. Più di un secolo fa Virchow (1856) ipotizzava che tre principali classi di fattori contribuiscano alla genesi della trombosi, (triade di Virchow):

- Stasi sanguigna
- Danno dell'endotelio vasale
- Alterazioni di componenti ematiche relative all'emostasi

Il ruolo svolto dalle caratteristiche del flusso ematico è evidenziato dal fatto che la distribuzione dei trombi nell'albero vasale, viene influenzata dalle leggi idrodinamiche che regolano il flusso laminare. Il sangue infatti tende a scorrere in un vaso ideale in strati cilindrici concentrici; quelli più interni sono più veloci di quelli periferici e più vicini alle pareti. Negli strati più interni tendono a disporsi le particelle di maggiori dimensioni e densità, come i globuli rossi. Quanto maggiore è la velocità del flusso, tanto più sarà rispettata questa disposizione. Le piastrine

si dispongono nelle zone leggermente più periferiche, essendo più piccole degli eritrociti, ma non prendono contatto con la parete endoteliale, grazie alla repulsione elettrostatica tra le membrane cellulari. Questo spiega perché normalmente le cellule ematiche, non solo non aderiscono all'endotelio, ma non formano neanche aggregati o agglutinati in grado di causare embolia. Vari fattori possono alterare le caratteristiche del flusso laminare e per tale motivo vengono considerati fattori di rischio trombotico. Le caratteristiche laminari del flusso vengono alterate in determinate condizioni patologiche, quali la stasi (riduzione della velocità del flusso) e la turbolenza ematica (variazione della regolarità del flusso), riscontrabili frequentemente in corso di cardiomiopatie e vizi valvolari. Le stenosi cardiache o vascolari generano, in accordo all'equazione di Bernoulli, un flusso ad elevata velocità e bassa pressione a valle del punto di restringimento. Tale colonna di sangue ad elevata velocità urta contro quella che procede a valle con velocità più bassa, creando dei vortici con andamento retrogrado. Tali vortici traumatizzano l'endotelio, creando aree di denudazione che innescano il processo

trombotico. Fenomeni di turbolenza con formazione di vortici si verificano anche dove il sangue varia bruscamente di velocità e di direzione, come nei punti di biforcazione del sistema vasale. Il rallentamento del flusso sanguigno che può verificarsi nel corso insufficienza cardiaca congestizia, limita la clearance dei fattori della coagulazione attivati, aumentando il rischio trombotico. Nelle cardiomiopatie ipertrofica e restrittiva, caratterizzate da riduzione della compliance ventricolare, si verifica frequentemente rigurgito mitralico a causa delle modificazioni geometriche della disposizione spaziale dei muscoli papillari, movimento sistolico del lembo mitralico anteriore ed aumento della pressione telediastolica ventricolare. Al contrario, in corso di cardiomiopatia dilatativa si rinviene spesso insufficienza relativa. Tali alterazioni si rendono responsabili di ingrandimento dell'atrio sinistro con possibile insorgenza di fibrillazione. La contrazione emodinamicamente inefficace dell'atrio fibrillante può determinare la formazione di un trombo. Quest'ultimo può ingrandirsi fino a raggiungere, nei casi estremi, le dimensioni dell'atrio stesso. I movimenti del trombo nella camera atriale

possono rendersi responsabili della sua frammentazione con conseguenti fenomeni di tromboembolismo. In medicina umana, la stenosi e l'insufficienza mitralica sono considerate malattie embolizzanti per eccellenza. Il rallentamento della velocità del flusso sanguigno all'interno dell'atrio dilatato, a causa della ridotta compliance ventricolare, rappresenta nel gatto con cardiomiopatia un fattore trombogenetico determinante.

L'endotelio vascolare attualmente è considerato un importante organo endocrino, che svolge un ruolo critico di interfaccia tra la circolazione sanguigna ed i tessuti corporei, intervenendo in numerose funzioni regolatorie. Le sue proprietà anticoagulanti, fibrinolitiche e antitrombotiche, che contribuiscono al mantenimento delle normali proprietà reologiche del sangue, sono ampiamente note. Poiché l'endotelio mostra sia proprietà anti-trombotiche, sia proprietà pro-trombotiche, si può quindi parlare di "bilancia emostatica endoteliale". Le attività anti-trombotiche dell'endotelio sono rappresentate dall'inibizione della aggregazione piastrinica, dalla promozione della fibrinolisi e dalla inibizione dei meccanismi

emostatici attraverso la produzione di fattori anticoagulanti. In condizioni di integrità l'endotelio è in grado di assicurare la fluidità del sangue mediante un complesso meccanismo anticoagulante; al contrario, se esso viene lesa il danno delle cellule endoteliali costituisce il punto di avvio del processo localizzato di emostasi, attraverso l'induzione coordinata di attività pro-emostatiche, che iniziano con l'adesione piastrinica. Durante il danno endoteliale, si verifica liberazione di ADP, di fosfolipidi e di fattore tissutale, e parallelamente viene inibita la prostaciclina. Si determina, altresì, l'esposizione delle strutture sub-endoteliali con l'attivazione della cascata coagulativa e dell'aggregazione piastrinica. Le alterazioni dell'endotelio possono dipendere da differenti cause e meccanismi, alcuni dei quali agiscono più frequentemente sui vasi arteriosi, altri su quelli venosi.

Si riconoscono cause:

- Infettive

Il polisaccaride endotossico dei batteri gram negativi può attivare la via alternativa del complemento, danneggiando

le cellule endoteliali fino alla lisi. Inoltre, tale molecola batterica è in grado di attivare i leucociti favorendo la liberazione di citochine (TNF, IL-1,IL-6,interferone),che mostrano azione endotelio-lesiva. Anche virus e parassiti possono danneggiare l'endotelio, direttamente oppure attraverso la formazione di immunocomplessi.

- Immunologiche

Anticorpi specifici verso componenti dell'endotelio che agiscono attraverso l'attivazione del complemento (azione citotossica). Deposizione di immunocomplessi, (reazione di ipersensibilità di tipo ). La risposta cellulare attraverso i linfociti citotossici può danneggiare direttamente le cellule endoteliali, oppure indirettamente attraverso la liberazione di citochine, coinvolgendo altri elementi cellulari.

- Meccaniche

Traumi esterni, iatrogeni (interventi chirurgici, cateterismi, inoculazioni endovenose, etc.), traumi termici e traumi meccanici (stenosi, biforcazioni arteriose, ipertensione, aneurismi, insufficienze valvolari)

- Tossico-chimiche

Farmaci (chemioterapici), mezzi di contrasto radiologici, iperlipidemia, ipercolesterolemia, pigmenti biliari, iperglicemia, l'iperomocisteinemia, fumo, radiazioni, sostanze tossiche riassorbite da neoplasie e focolai settici.

Tra gli elementi favorenti la formazione del trombo va altresì menzionata la sofferenza ipossica a livello subendocardico. La condizione ipossica induce l'endotelio ad esporre sulla propria superficie il fattore tissutale, riduce nel contempo la presenza di trombomodulina e determina rigonfiamento e retrazione delle cellule endoteliali, con esposizione del sub-endotelio.

Indagini necroscopiche condotte su gatti affetti da cardiomiopatie hanno messo in rilievo in molti casi, lesioni fibrotiche dell'endocardio atriale, associate a dilatazione e formazione di trombi all'interno dell'atrio (Kittleson, 1998). Non esistono dati certi riguardo l'estensione e la gravità dello sviluppo delle lesioni fibrotiche e di quelle trombotiche.

Le alterazioni delle componenti ematiche dell'emostasi, con sviluppo di una condizione di ipercoagulabilità ematica,

possono essere correlate ad un' aumentata attività dei fattori della coagulazione, a deficiente espressione di fattori anticoagulanti (mancanza o ridotta funzionalità di inibitori: AT III, proteina C, proteina S), oppure a deficiente attività fibrinolitica.

Numerosi condizioni patologiche (ad es. sindromi mieloproliferative) si associano spesso ad aumento del numero delle piastrine (trombocitosi), a cambiamento di forma e a maggiore reattività delle stesse. Lo stimolo trombofilico può partire anche a seguito di traumi, interventi chirurgici, tumori o di condizioni che portano ad abbondante necrosi tissutale, cui fa seguito la liberazione di tromboplastina tissutale in grado di innescare in maniera abnorme la cascata coagulativa.

E' noto che la regolazione dei livelli plasmatici dei fattori attivati della coagulazione è operata da alcune proteasi, tra le quali un ruolo fondamentale è riconosciuto all' AT III per la trombina e alla proteina C per i fattori V e VIII. Le deficienze genetiche di tali fattori si manifestano clinicamente, nell'uomo, con tromboflebiti ricorrenti e tromboembolismo. Occorre inoltre considerare il sistema fibrinolitico, che attraverso l'azione della

plasmina è in grado di limitare la coagulazione del sangue: una deficienza di plasmina, assoluta, legata a carenza di plasminogeno o dei suoi attivatori (ad esempio un minore rilascio di attivatore tissutale del plasminogeno-tPA), oppure relativa (inibizione da parte di altri elementi), viene associata ad alto rischio di trombosi, sia venosa che arteriosa.

Studi effettuati su gatti cardiopatici hanno fornito elementi indicativi di una condizione di ipercoagulabilità ematica, in questi animali. Helensky e Ross (1987), in uno studio condotto su gatti cardiopatici, hanno messo in luce un aumento dell'aggregabilità piastrinica, mentre Welles e coll. (1994) hanno riscontrato livelli più alti di AT III e più bassi di plasminogeno in animali con cardiomiopatie. Di notevole interesse, nel gatto, è il riscontro di una maggiore sensibilità in vitro agli stimoli di aggregazione piastrinica, rispetto all'uomo e ad altre specie animali (Ohta e coll., 1992; Kittleson, 1998). Quest'ultimo rilievo porta ad ipotizzare una maggiore suscettibilità della specie felina alla formazione di trombi in condizioni di alterata emodinamica.

In definitiva si può affermare che le tre componenti costituenti la triade di Virchow sono in grado di indurre uno squilibrio della bilancia emostatica endoteliale in senso pro-trombogeno. Tuttavia, la trombosi arteriosa riconosce come momento fondamentale la lesione vasale, che può essere su base dismetabolico-irritativo-flogistica, mentre quella venosa si sviluppa preferibilmente in una condizione di stasi circolatoria o di ipercoagulabilità.

### **1.3.3 Tromboembolismo arterioso del gatto**

Il Tromboembolismo arterioso (TEA) è una complicazione frequente nei gatti affetti da cardiomiopatie. La prima segnalazione di TEA risale al lontano 1930 ad opera di Collet. L'incidenza assoluta di TEA non è elevata, attestandosi intorno all'1% (Smith e coll., 2003; Di Loria e coll., 2005). E' possibile affermare che i fenomeni tromboembolici nel gatto sono quasi sempre associati a cardiomiopatia, ma che non tutte le cardiomiopatie sono associate a tromboembolismo arterioso. La maggior parte dei casi di TEA segnalati in medicina veterinaria è riferito infatti a patologie cardiache del gatto. Laste e Harpster (1995) in uno studio retrospettivo riguardante 100 casi di TEA riferiscono un'incidenza del 63% in corso di cardiomiopatie, mentre Smith e coll., (2003) evidenziano in uno studio su 127 gatti con TEA, un'incidenza del 52%: 19% nella CMI, 27% nelle UCM, ed il 6% nella CMD. La maggior parte degli animali mostrava un ingrandimento dell'atrio sinistro all'esame ecocardiografico. In gatti affetti da CMI, recenti ricerche hanno

mostrato un'incidenza di TEA dell'ordine del 13% (Peterson EN et al., 1993), 17% (Rush JE et al., 2002). Il TEA è poco comune in animali affetti cardiomiopatia tireotossica (3%) (Laste e Harpster, 1995). Nell'ambito delle patologie non cardiovascolari, il carcinoma polmonare rappresenta la condizione patologica più frequentemente associata a TEA nel gatto (Smith e coll., 2003; Moore e coll., 2000; Laste e Harpster 1995; Hogan e coll., 1999).

Il trombo formatosi all'interno dell'atrio sinistro può andare incontro a destini diversi:

1) può rimanere adeso alle pareti atriali, senza conseguenze cliniche;

2) può dislocarsi divenendo un embolo;

3) può divenire talmente grande da occludere i grossi vasi cardiaci. L'incidenza del primo e del terzo evento è sconosciuta.

Infatti se il trombo non è causa di sintomi clinici, la sua presenza può essere svelata soltanto nel corso di un esame ecocardiografico occasionale. Si può ipotizzare, inoltre, che molte cause di morte improvvisa nei gatti siano da riferire all'ostruzione di grossi vasi cardiaci ad opera di trombi atriali,

ma tali eventi nella maggior parte dei casi restano inspiegati in quanto di routine non viene effettuato l'esame autoptico. Nel caso di frammentazione del trombo con conseguenti fenomeni tromboembolici, la sintomatologia è collegata direttamente al distretto corporeo colpito. Laste e Harpster (1995) ritengono, sulla base di uno studio retrospettivo, che in corso di cardiomiopatie, in sede ecocardiografica, debbano essere attentamente valutate alcune condizioni predisponenti alla formazione dei trombi, quali l'aumento delle dimensioni atriali (>2.0 cm) e l'identificazione di smoke (contrasto spontaneo) nell'atrio sinistro.

La fisiopatologia del TEA appare comunque molto complessa, e non soltanto correlata all'ostruzione fisica da parte dei tromboemboli. Studi condotti su gatti con TEA sperimentalmente indotto, attraverso la legatura dell'aorta nel tratto distale, si è osservato un recupero funzionale nell'arco di 72 ore; tale rilievo viene spiegato con l'istaurarsi di un circolo arterioso collaterale (Butler 1971; Imhof 1961). Altri esperimenti hanno associato all'induzione del TEA, attraverso legatura

chirurgica, la somministrazione di 5-idrossitriptamina (serotonina). A differenza del precedente esperimento, in questi animali si è assistito ad una vasocostrizione del circolo collaterale ed allo sviluppo di una neuromiopia ischemica (Butler 1971, Schaub e coll., 1976). Il TEA iatrogeno non si istaurava se prima veniva somministrata aspirina o antagonisti della serotonina (Olmstead e Butler, 1977; Schaub e coll. 1982). Queste evidenze sperimentali lasciano supporre che gli elementi cellulari costitutivi del trombo (piastrine) svolgano un ruolo cardine nella genesi del TEA, attraverso il rilascio di sostanze vasoattive, che agiscono sui vasi del circolazione collaterale.

Nel 71-90% dei gatti colpiti da TEA il trombo si localizza a livello della triforcazione aorto-iliaca (trombo a cavaliere) (Kittleson 1999; Smith e coll., 2004). la presenza del trombo a cavaliere si associa, sul piano clinico, a paralisi/paresi acuta degli arti posteriori, dolore, riduzione/scomparsa del polso femorale, pallore e raffreddamento dei cuscinetti plantari. Gli autori anglosassoni in modo sintetico parlano di sintomatologia delle cinque “p”: pulselessness, pain, pallor, paresis e poikilothermia.

La valutazione del polso femorale, tuttavia, può rivelarsi difficoltosa in animali obesi o non collaborativi. Altre manifestazioni cliniche di rilievo sono rappresentate da vocalizzazione, agitazione, stato di ansietà dell'animale e polipnea legati all'intensa dolorabilità muscolare (Smith e coll., 2003).

In sede di diagnosi differenziale, occorre considerare le patologie della colonna vertebrale (discopatie, neoplasie del midollo spinale, emboli-fibrocartilaginei, traumi), neuropatie periferiche (diabetiche mellito) e malattie intracraniche (embolismi, traumi, neoplasie). Trombi di minori dimensioni possono talvolta dislocarsi in una arteria femorale o brachiale, più frequentemente in quella di destra, o in altri rami arteriosi di minore calibro. Occasionalmente trombi di grandi dimensioni si possono localizzare in posizione più prossimale, a livello delle arterie renali, rendendosi responsabili di insufficienza renale acuta. Oltre alla localizzazione renale, anche le arterie mesenteriche e cerebrali possono, seppur raramente, essere interessate da tromboembolismo (Smith e coll., 2003). In rari casi

trombi di dimensioni ragguardevoli possono occludere il tratto di efflusso sinistro o l'orificio mitralico, determinando morte improvvisa dell'animale (Griffiths IR e Duncan ID 1979). Molti gatti presentano segni di inadeguata perfusione periferica con conseguente ipotermia. Smith e coll. (2004) hanno correlato la temperatura corporea e la frequenza cardiaca ai tempi di sopravvivenza. La presenza di ipotermia e di bradicardia, secondo questi autori, è indicativa di prognosi sfavorevole (Smith e coll., 2003, Moore e coll., 2000).

I gatti con TEA mostrano segni di insufficienza cardiaca congestizia (incidenza del 40-66% (Smith e coll., 2003; Moore e coll., 2000; Laste e Harpster 1995; Schoeman 1999) e dispnea, a causa di un aggravamento della cardiomiopatia sottostante. Infatti l'improvvisa occlusione dell'aorta distale porta ad un incremento del post-carico del ventricolo sinistro, con brusco incremento della pressione di riempimento ventricolare e all'insorgenza di edema polmonare. All'ascultazione cardiaca la presenza di un soffio sistolico, di ritmo di galoppo e di aritmie supporta, se associata a dolore e paresi del treno posteriore, la

diagnosi di TEA. Tuttavia, molti gatti non mostrano alcuna anomalia auscultatoria (30-46%) (Smith e coll., 2003; Moore e coll., 2000; Laste e Harpster 1995). Un semplice metodo, proposto dagli autori anglosassoni, ai fini della diagnosi di TEA, consiste nella comparazione del tasso glicemico del sangue venoso dell'arto posteriore, colpito da trombosi, con quello dell'arto anteriore. Il sangue venoso proveniente dall'arto colpito da trombosi mostra livelli glicemici significativamente più bassi rispetto al normale ( $50 \pm 25\text{mg/dL}$ ) (Mc Michael e coll., 1998). Le moderne tecniche di diagnostica per immagini (eco-color-doppler, angiografia e scintigrafia) consentono di valutare la sede di occlusione, la gravità dell'occlusione, l'efficacia del trattamento terapeutico e la prognosi. In gatti con paresi il mancato rinvenimento all'esame doppler di flusso arterioso nell'arto colpito è indicativo di TEA. L'esame eco-color-doppler permette di valutare nel tempo, fenomeni di ricanalizzazione, rimaneggiamento e retrazione del trombo, che possono condizionare la prognosi. Un altro interessante parametro che è possibile valutare è rappresentato dalla velocità del flusso

ematico a livello dell'auricola sinistra. Schober e Marz (2003) hanno infatti evidenziato una velocità più bassa in animali affetti da cardiomiopatie (0.31 m/sec), rispetto a quella di gatti sani (0.46 m/sec), e valori ancora più bassi negli animali con TEA (0.14 m/sec) (Schober e Marz 2003). Tale rilievo potrebbe facilitare l'identificazione degli animali cardiopatici suscettibili di sviluppare complicazioni tromboemboliche arteriose.

L'evoluzione della malattia tromboembolica è variabile e condizionata da numerosi fattori. In caso di tromboemboli di piccole dimensioni i meccanismi trombolitici fisiologici sono in grado di dissolvere il tromboembolo nel giro di poche ore, con recupero funzionale del distretto colpito. Nel casi in cui il tromboembolo sia di grandi dimensioni, oppure l'attività trombolitica sia ridotta, il persistere dell'occlusione vasale determina necrosi e gangrena del distretto colpito. Tuttavia tra queste due possibilità estreme, si collocano animali che giungono ad un recupero funzionale parziale o completo dopo alcune settimane e dopo opportuna e tempestiva terapia.

Gli esami di laboratorio evidenziano un incremento dell'ALT, AST e della CPK (Laste e Harpster, 1995), legato alla necrosi tissutale. Si registra inoltre un incremento dei valori dell'azotemia e della creatininemia in relazione alla ridotta perfusione renale. La maggior parte dei gatti mostra iperglicemia dovuta a stress (Smith e coll., 2003). Sono frequenti squilibri elettrolitici quali ipocalcemia, iponatriemia, ipokaliemia, e iperfosfatemia; quest'ultimo correlato ad un aggravamento della prognosi (Smith e coll., 2003). I test emocoagulativi routinari non mostrano alterazioni di rilievo nella maggior parte dei soggetti ammalati (Moore e coll., 2000); in alcuni gatti il D-dimero e i prodotti della degradazione del fibrinogeno possono risultare elevati (Good e Manning, 2003). La conta piastrinica è generalmente entro i limiti fisiologici.

L'influenza degli stati di ipercoagulabilità nella trombogenesi arteriosa umana è al centro di grande interesse. Molti studi recenti sono rivolti a valutare la resistenza al fattore V di Leiden, la resistenza alla proteina C, il deficit di proteina C ed S, il deficit di antitrombina III, la sindrome antifosfolipidi e

l'iperomocisteinemia (Jones e Alving, 1997). A tale riguardo è stato dimostrato che più del 50% degli eventi trombotici arteriosi sono legati a difetti congeniti o acquisiti dei fattori della coagulazione, ovvero a difetti piastrinici (Bick e Kaplan, 1998). Inoltre, nei pazienti umani esistono numerose evidenze cliniche che attestano l'associazione tra disfunzione endoteliale, condizioni di ipercoagulabilità ematica e sviluppo di trombosi arteriosa. A tale proposito la valutazione dei livelli plasmatici di alcuni fattori endoteliali, ad azione pro-coagulante (fattore di von Willebrand) e ad azione anticoagulante (TM, proteina C e ATIII), quali marker di rischio trombotico e di danno endoteliale nei pazienti umani cardiopatici, è di comune utilizzo nella pratica clinica. Tali marker umorali vengono attualmente esplorati routinariamente in tutte le patologie caratterizzate da tromboembolismo, mentre in campo animale, ed in particolare nella specie felina, le conoscenze a tal riguardo risultano ancora molto scarse. Alcuni studi effettuati su gatti cardiopatici hanno fornito elementi indicativi di una condizione di ipercoagulabilità ematica. Helensky e Ross (1987), in una ricerca effettuata in gatti

con cardiomiopatie primitive, hanno messo in luce un aumento dell'aggregabilità piastrinica ADP indotta. Wells e coll. (1994) hanno, invece, mostrato in 9 gatti con cardiomiopatia tireotossica una ridotta risposta all'ADP ed un'augmentata risposta al collagene. Gli stessi autori nell'ambito dello stesso studio (1994) hanno, inoltre, riscontrato livelli più alti di AT III e più bassi di plasminogeno in 11 animali con cardiomiopatie primarie e secondarie. Di notevole interesse nel gatto è altresì il riscontro di una maggiore sensibilità in vitro agli stimoli di aggregazione piastrinica, rispetto all'uomo e ad altre specie animali (Ohta e coll., 1992; Kittleson, 1999). Quest'ultimo rilievo farebbe ipotizzare una maggiore suscettibilità della specie felina alla formazione di trombi in condizioni di alterata emodinamica. Ricerche molto recenti non hanno però evidenziato differenze significative tra i livelli ematici di omocisteina di gatti sani, cardiopatici e affetti da TEA, anche se in un unico studio alcuni gatti colpiti da TEA mostravano iperomocisteinemia (Hohenhaus A. E., Simantov R., Fox P. R., dati non pubblicati 1998). L'arginina plasmatica e la vitamina B<sub>12</sub> risultano diminuite in

gatti cardiopatici e con TEA, sebbene il significato di tale rilievo non sia chiaro.

Alla luce di quanto esposto appare chiaro come sia necessario approfondire le conoscenze sulla patogenesi dei fenomeni trombotici e tromboembolici nelle cardiomiopatie feline, allo scopo di poter individuare precocemente gli animali a rischio. A tal fine è auspicabile la messa a punto di marker umorali indicativi di una condizione di ipercoagulabilità arteriosa, e quindi pretrombotica, al pari di quanto è avvenuto in campo umano.

#### **1.3.4 Emostasi e funzione endoteliale (ruolo di TM, proteina C e ATIII)**

Il sistema emostatico viene oggi rappresentato come un insieme di attività collegate atte a preservare l'integrità della circolazione sanguigna. In circostanze normali l'emostasi è regolata in modo tale da promuovere la fluidità del sangue; inoltre, è capace di indurre la coagulazione del sangue nelle sedi di danno vascolare, al fine di arrestare la fuoriuscita del flusso ematico dal letto vasale ogni volta che l'integrità dei vasi è danneggiata. I principali componenti del sistema emostatico comprendono la parete vasale, le proteine plasmatiche (fattori della coagulazione e i fattori fibrinolitici) e la componente cellulare ematica, rappresentata principalmente dalle piastrine. Tali componenti svolgono la loro azione in modo collettivo, interagendo e costituendo così il sistema regolatore dell'emostasi. La parete vasale è costituita da un monostrato di cellule endoteliali che delimitano la superficie dell'intero albero circolatorio, rappresentando l'unico tipo cellulare con cui le emazie entrano in

contatto in condizioni normali. Nell'uomo la superficie endoteliale di un soggetto adulto è composta da circa  $1-6 \times 10^{13}$  cellule, che pesano approssimativamente 1 Kg e che potrebbero coprire una superficie equivalente a circa sei campi da tennis (Cines e coll., 1998; Henderson, 1991). Fino a qualche decennio fa, le cellule endoteliali erano considerate semplicemente delle barriere per il flusso ematico, agendo solamente con un meccanismo passivo, come se dovessero solo rivestire ed impermeabilizzare il letto vascolare. Le moderne ricerche in tale campo ci permettono oggi di considerare l'endotelio come un organo dinamico con complesse capacità metaboliche, quali il controllo della permeabilità vascolare, il trasporto ai tessuti di sostanze nutrienti e di molecole biologicamente attive, la mediazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice all'interno della parete vasale, la mediazione delle interazioni tra le cellule ematiche, la mediazione della risposta infiammatoria e dell'angiogenesi. L'endotelio è anche un regolatore dell'emostasi (Wu e Thiagarajan, 1996; Schafer, 1997), essendo esso provvisto di un ampio repertorio di attività, le quali ne permettono la

trasformazione da potente superficie antitrombotica a protrombotica. Tali fenomeni non si verificano in maniera uniforme; difatti in tutto l'albero circolatorio, e persino nell'ambito di un singolo organo, vi è una marcata eterogeneità nell'espressione fenotipica delle cellule endoteliali (Risau, 1995). Questa eterogeneità sembra essere determinata sia da fattori genetici che ambientali. Solitamente la conversione in senso emostatico della parete vasale è scatenata da un danno meccanico e dall'attivazione delle cellule endoteliali da parte di citochine, endotossine, forze emodinamiche e stimoli ipossici. Anche la capacità di modulare il tono vasale rientra nelle funzioni delle cellule endoteliali. Ne è un esempio la produzione di nitrossido (NO) e della prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, prostaciclina), che rappresentano potenti molecole ad attività vasodilatatrice ed inibitrice dell'aggregazione piastrinica. Possiedono azione vasodilatatrice anche il fattore iperpolimerizzante endoteliale (EDHF), il monossido di carbonio (CO) e l'ectoadenosina, di recente identificata come CD 39, che mostra anche attività antiplastrinica (Marcus e coll., 1997). L'endotelio controbilancia

questa azione prettamente vasodilatatrice, attraverso la produzione di altre sostanze, quali il fattore attivante le piastrine (PAF), l'endotelina e il trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Schiffrin e Touyz, 1998). Nella maggior parte dei casi, i vasodilatatori endotelio-derivati sono anche inibitori piastrinici e, viceversa, i vasocostrittori endotelio-derivati possono essere attivatori piastrinici. Ad un effetto di promuovere la fluidità del sangue si contrappone, attraverso vasocostrizione e aggregazione piastrinici, la promozione dell'emostasi. Si tratta quindi di un sistema in cui vige un equilibrio tra forze protrombotiche e forze antitrombotiche, che rientra nel concetto di bilancia emostatica endoteliale (Fig. 1). Diversi meccanismi antitrombotici fisiologici agiscono di concerto per prevenire la coagulazione in condizioni normali. L'attività ottimale di ciascuno dei sistemi anticoagulanti dipende dall'integrità dell'endotelio vascolare. Molti fattori prodotti dall'endotelio, quali l'antitrombina, il sistema proteina C/ proteina S/trombomodulina e l'inibitore della via del fattore tissutale (TFPI), agiscono in diversi punti della cascata della coagulazione per ridurre l'accumulo di fibrina

sulla superficie endoteliale. La fibrina che si genera nonostante queste difese anticoagulanti, viene poi degradata dal sistema fibrinolitico.

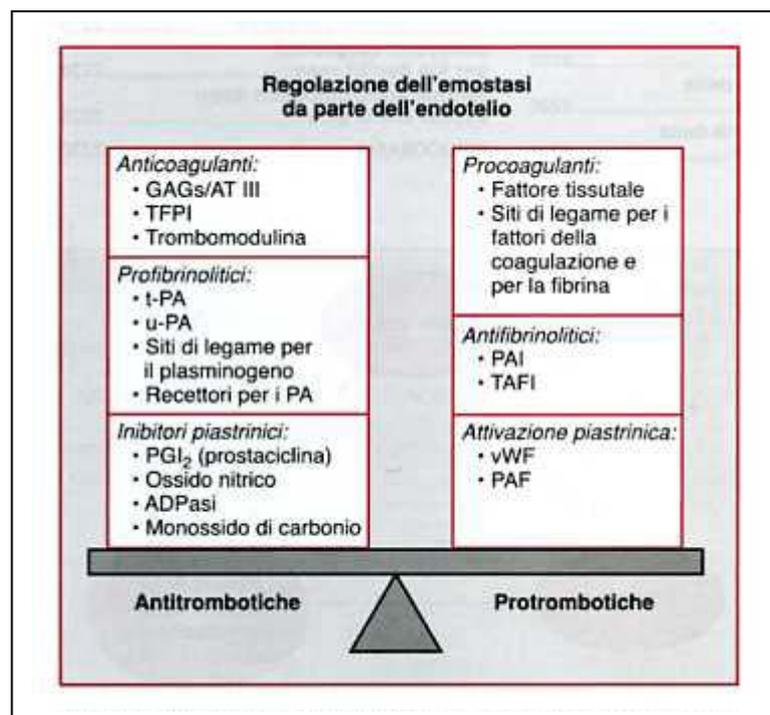


Figura 1: Bilancia dell'omeostatica endoteliale

La trombomodulina (TM) è un proteoglicano di membrana ad azione anticoagulante, presente sulla superficie di tutte le cellule dell'endotelio vasale (Bourin e coll., 1990). Questa molecola possiede una elevata affinità nei confronti della trombina ed è

proprio attraverso la formazione del complesso TM-trombina che tale fattore endoteliale esplica la propria l'attività anticoagulante (Esmon e coll., 1981). Infatti, la formazione del suddetto complesso attiva la proteina C, la quale in presenza della proteina S inibisce i fattori V e VIII, appartenenti rispettivamente alla via comune ed intrinseca della coagulazione. La TM accelera inoltre il processo di neutralizzazione della trombina da parte dell'ATIII (azione eparin-like) e interagisce con il fattore IV (calcio), essenziale nel processo della coagulazione. La trombina fissata sulla trombomodulina è incapace di attivare altri fattori come il fibrinogeno, sul quale la trombina stessa svolge un'attività proteolitica, determinandone la trasformazione in fibrina.

La TM viene prodotta anche a livello dell'aracnoide (Boffa e coll.,1991), di cheratinociti (Senet e coll.,1997), cellule mesangiali (Pruna e coll.,1997), osteoblasti (Maillard e coll.,1993), piastrine (Ogura e coll.,1990), monociti, macrofagi alveolari (Grey e coll.,1996) e granulociti neutrofili, all'interno dei quali si trova sotto forma di granuli inattivati (Conway e coll.,1992), nonché da cellule tumorali.

E' stato stimato da Shogo Tekano e coll., (1990) che il peso molecolare della trombomodulina sia di circa 71Kd. Nel plasma, invece, si rinvengono, quattro diverse molecole, da 64, 60, 52 e 47Kd, che probabilmente corrispondono a frammenti di trombomodulina parzialmente degradata. Il frammento più leggero (47Kd) potrebbe provenire dalla degradazione ad opera della tripsina o dell'elastasi, che in condizioni sperimentali danno origine a frammenti, rispettivamente di 45 e 42Kd.

Questo proteoglicano è costituito da tre porzioni: una piccola porzione intracitoplasmatica implicata in meccanismi di endocitosi, una catena corta intramembranaria idrofoba e una catena lunga extramembranaria, costituita da sostanze quali il condroitin-solfato, responsabile dell'azione eparine-like, essenziale per l'azione antitrombotica della trombomodulina (Esmon e coll., 1995) (Figura 2).

E' infatti a livello di questa porzione che avviene l'interazione con le varie molecole, quali la trombina, il fattore piastrinico IV della coagulazione, alcune proteine specifiche dei granulociti eosinofili. Queste proteine dei granulociti eosinofili inibiscono

l'azione della trombomodulina, e tale rilievo spiegherebbe come in corso di sindromi ipereosinofile si possano manifestare dei fenomeni trombotici (Slungaart e coll.,1993).

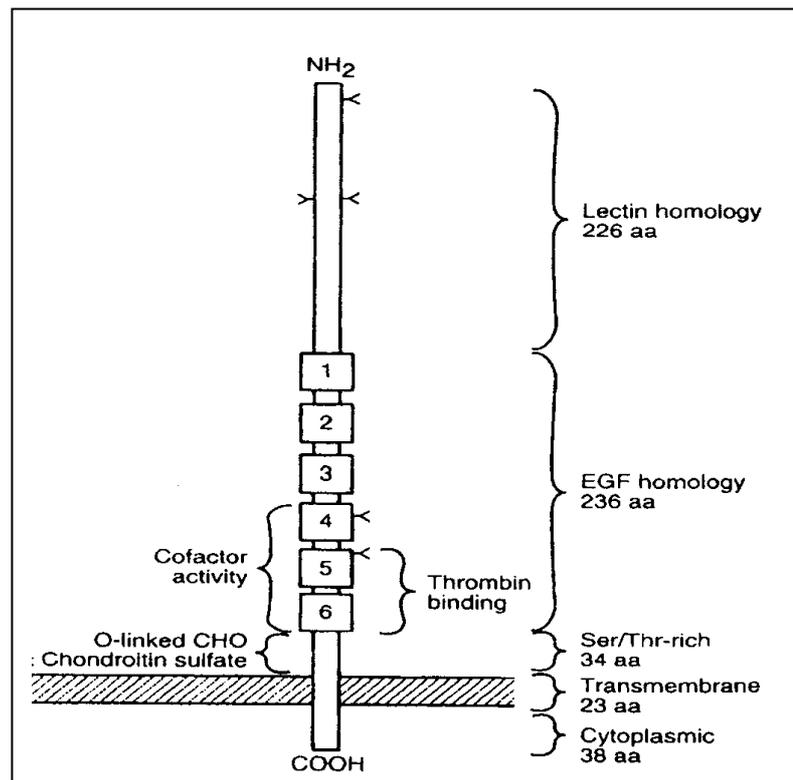


Figura 2: Struttura della trombomodulina

In conclusione si può affermare che il ruolo più importante svolto dalla trombomodulina è quello anticoagulante dovuto all'elevata affinità della catena lunga extramembranaria per la trombina.

La trombomodulina possiede inoltre un'azione promuovente la proliferazione e la differenziazione cellulare, che appare evidente nell'embrione, sia a livello vascolare che extravascolare (neuroepitelio ed epitelio dei bottoni polmonari).

Queste due funzioni sono state messe in evidenza da Isermann e coll., (2001), sopprimendo il gene della trombomodulina in cavie da laboratorio. E' stato riscontrato che il 40% degli embrioni transgenici esprimeva un fenotipo embriologico letale, mentre il restante 60% dopo circa tre settimane dalla nascita, giungeva a morte a causa di un grave stato ipercoagulativo.

Bisogna specificare che la trombomodulina non viene secreta, ma viene rilasciata dalle cellule endoteliali lesionate, grazie all'azione di enzimi, come le elastasi prodotte da alcune cellule polinucleate (Ishii e coll.,1991). Tuttavia, la TM così formata, sembra possedere minore attività anticoagulante, a causa del mancato effetto amplificatore, presente in sede endoteliale, operato dallo specifico recettore a livello endoteliale (EPCR) e dagli eparansolfati. Esistono anche altri fattori che possono intervenire nel rilascio di questa sostanza, come ad esempio l'AMPciclico

(AMPc), il Tumor Necrosis Factor (TNFalfa), l'acido retinoico, l'interleukina1 (IL1) ed altre citochine (Boffa, 1996). Queste sostanze in vitro mostrano un'azione diversa a seconda del tipo cellulare sul quale agiscono (Esmon e coll.,1995). Il TNF e l'IL1 determinano il rilascio della trombomodulina da parte dei macrofagi, ma ne inibiscono la liberazione da parte delle cellule endoteliali. L' AMPc al contrario stimola il rilascio di TM da parte degli osteoblasti (Gajdusek e coll.,1986).

L'acido retinoico promuove l'espressione della trombomodulina sulla superficie delle cellule endoteliali, accelerando la trascrizione del gene che codifica per questo proteoglicano (Ishii e coll.,1990; Horie e coll.,1992; Shuichi e coll.,2001).

Una volta esplicitata la sua azione, la trombomodulina viene metabolizzata a livello epatico ed escreta dai reni sotto forma di frammenti solubili (Ishii e coll., 1985).

E' stato messo in evidenza come le concentrazioni plasmatiche della trombomodulina possano subire variazioni (Boffa e coll., 1991). I valori plasmatici della trombomodulina in soggetti sani

sono influenzati dal normale turn-over delle cellule endoteliali e/o dal rilascio dei frammenti di trombomodulina stessa.

I tassi plasmatici medi comunque, possono variare anche in funzione dell'età e del sesso. Alla nascita a causa della presenza di fetomoduline, che diminuiscono progressivamente con l'età adulta, i valori fisiologici sono più elevati. Nelle femmine generalmente i tassi plasmatici di trombomodulina sono inferiori rispetto a quelli dei maschi (Boffa e coll., 1991).

Numerosi studi eseguiti su cavie da laboratorio ed alcuni trials clinici condotti in medicina umana hanno messo in evidenza che i livelli plasmatici di TM tendono ad aumentare sia nei disturbi coagulativi, quali emorragie, coagulazione intravasale disseminata (DIC), porpora trombocitopenica e trombosi, sia in molte malattie associate a danno endoteliale, quali diabete, lupus eritematoso sistemico, atopia, epatopatie, nefropatie, rickettsiosi, leishmaniosi, etc.. Alcune di queste malattie si caratterizzano per la presenza di micro e/o macrovasculiti che sono conseguenti alla deposizione di immunocomplessi a livello degli endoteli vascolari, oppure ad un insulto diretto ad opera di agenti infettivi. Nel caso delle

nefropatie e delle epatopatie, i livelli plasmatici di TM aumentano in relazione all'insufficiente clearance renale o all'alterazione del suo catabolismo epatico, con conseguente accumulo di questa sostanza nel circolo ematico (Hergesell e coll., 1993). In presenza di flogosi si osserva una correlazione tra aumento del tasso di trombomodulina e quello del fibrinogeno, anche se il ruolo della TM nei processi infiammatori rimane ancora da chiarire. E' noto che i processi infiammatori promuovono la coagulazione attraverso la liberazione di un fattore tissutale intravascolare e l'espressione di molecole leucocitarie che aderiscono alla superficie endoteliale, nonché attraverso l'inibizione dell'azione fibrinolitica e anticoagulante della proteina C attivata (APC). La proteina C sembra possedere un sito specifico recettoriale a livello endoteliale (EPCR), simile a quello della trombomodulina per la trombina (Esmon e coll., 1981). Nel sistema vasale si stima una concentrazione di trombomodulina di 200 nmol/L nei capillari, mentre nei grossi vasi la concentrazione non supera 2 nmol/L che può sembrare insufficiente a garantire una efficace attivazione del sistema della proteina C. La recente

identificazione del recettore EPCR, ha permesso di capire come questo non irrilevante problema sia superato fisiologicamente. L'EPCR ha elevata affinità per la proteina C (30 nmol/l), a cui si complessa, concentrandola quindi sulla membrana endoteliale, e sostituendosi ai fosfolipidi. L'EPCR "presenta" la proteina C al complesso trombina-trombomodulina, presumibilmente traslocando lateralmente nella membrana. Tale meccanismo aumenta di cinque volte circa l'efficienza di attivazione della proteina C. L'EPCR è distribuito prevalentemente nei grossi vasi, arteriosi e venosi, e quasi per nulla nei capillari (il letto capillare epatico costituisce un'eccezione). Che l'EPCR sia importante in vivo nell'attivazione della proteina C è indicato da uno studio recente condotto su babbuini, in cui si dimostra che bloccando l'interazione fra proteina C ed EPCR, mediante anticorpi, si ha una riduzione (di circa 88%) dei livelli di APC dopo infusione di trombina rispetto agli animali senza tale blocco (Simmonds e Lane, 1999; Laszik e coll., 1997; Taylor e coll., 2001). Come già accennato, la TM viene espressa anche dalle cellule di tumori maligni linfovaskolari, di carcinomi squamocellulari

esofagei, carcinomi epatocellulari, polmonari, e può essere utilizzata come marker ai fini della diagnosi differenziale fra diversi tipi di tumori (Appleton e coll.,1996). Si è visto inoltre che una diminuzione della produzione di trombomodulina da parte di queste cellule, si associa molto spesso alla presenza di metastasi. Infatti, le cellule tumorali che si distaccano, migrano attraverso i vasi sanguigni e riescono ad aderire in un altro sito grazie alla formazione di ponti di fibrina. La trombomodulina attraverso la sua azione anticoagulante impedirebbe la formazione di questi ponti e limiterebbe l'invasione metastatica delle cellule tumorali (Suehiro e coll.,1995).

In medicina veterinaria, attualmente esiste un unico studio volto alla valutazione di tale proteoglicano in condizioni normali e patologiche, nonostante anche in campo animale siano presenti numerose patologie associate a grave danno endoteliale. In particolare, in corso di leishmaniosi canina è possibile osservare alcuni disturbi emocoagulativi caratterizzati da epistassi, ematuria, DIC, ecc., responsabili di una grave fenomenologia clinica, ad insorgenza subdola e a volte con esito letale. Tali

manifestazioni sono legate alla presenza di micro e macro vasculiti diffuse, dovute alla deposizione di complessi antigene/anticorpo a livello endoteliale. Tali danni vascolari si associano, in corso di tale malattia, a glomerulonefriti, artriti, lesioni oculari (McConnell e coll., 1970, Ciaramella e coll., 1994) e lesioni cutanee (Chapman e Hanson 1984, Ferrer e coll., 1988, Slappendel e Green 1990), che assumono spesso carattere cronico-recidivante.

In corso di leishmaniosi canina Ciaramella e coll., (2004) hanno valutato i livelli plasmatici di TM in cani a diverso stadio clinico, riscontrando concentrazioni proporzionali al grado di compromissione clinica.

La diminuzione dei livelli plasmatici può manifestarsi, invece, nella fase pretrombotica o qualora si instauri un'ipossia cronica e/o lesioni vascolari in corso di ipertensione arteriosa polmonare.

In questo caso l'origine della diminuzione è da ricercare nell'*esaurimento* endoteliale (Cacoub e coll., 1996). La sua diminuzione può essere, inoltre, dovuta a down regulation a

seguito del rilascio (specie durante flogosi) di  $\text{TNF}\alpha$  e interleuchine (IL  $1\beta$ ).

La proteina C è una glicoproteina plasmatica sintetizzata dal fegato, composta da una catena leggera ed una pesante. E' uno zimogeno di serino-proteasi, la cui sintesi è vitamina K-dipendente. Per svolgere la sua azione inibitoria la proteina C deve essere attivata dalla trombina, attraverso il clivaggio di un ponte Arg 169-Leu 170 nella sua catena pesante (Esmon, 1993). L'attivazione trombino-indotta si verifica fisiologicamente sulla trombomodulina. (Sadler, 1997). La TM rappresenta il recettore della trombina: quando la trombina si lega a tale recettore, essa modifica la sua affinità di substrato (normalmente rappresentato dal fibrinogeno, fattore XIII, fattore VIII, fattore V) ed attiva la proteina C, innescando la via della anti-coagulazione controllata da tale serino-proteasi. La trombina da sola è in grado di attivare la proteina C, ma tale attivazione si verifica 20.000 volte più velocemente se mediata dalla TM. La TM deve quindi il suo nome alla capacità di modulare l'attività della trombina da pro ad anti-coagulante. La trombomodulina esercita, quindi, una

funzione antitrombotica, sia legando la trombina, e quindi rimuovendola dal circolo, sia promuovendo la produzione della proteina C attivata. Il legame della trombina con la trombomodulina determina un cambiamento conformazionale della trombina stessa, tale che l'enzima non è più in grado di svolgere la sua attività pro-coagulante. Questi cambiamenti molecolari, infatti, le fanno perdere la capacità di attivare i fattori V, VIII e XIII della coagulazione, di interagire con la superficie piastrinica, formando il complesso pro-trombinasico, e di trasformare il fibrinogeno in fibrina. In forma attivata la proteina C (APC) è una serino-proteasi che esercita le sue proprietà anticoagulanti clivando e quindi distruggendo i fattori V e VIII della coagulazione, ed ancora più rapidamente le loro forme attive (Va e VIIIa). Questa reazione è accelerata da un cofattore, la proteina S. Nel plasma la proteina S risulta veicolata da un carrier, la proteina CABP, e solo quando è libera da esso è in grado di svolgere la sua funzione di cofattore per la proteina APC. Analogamente alla proteina C, la proteina S è una glicoproteina che subisce una carbosilazione post-traduzionale

vitamina K-dipendente atta a formare residui di acido  $\gamma$ -carbossigluttammico (Gla), che le permettono di legarsi ai fosfolipidi di superficie carichi negativamente. La proteina S agisce come cofattore aumentando l'affinità della proteina C attivata per i fosfolipidi, con la formazione del complesso protein C-asi legato alla membrana. Deficit quantitativi o qualitativi della proteina C o della proteina S, o la resistenza all'azione della proteina C attivata, attraverso una mutazione specifica a livello della sede di clivaggio del fattore Va (fattore V di Leiden), portano ad uno stato di ipercoagulabilità (Esmon, 1993; Schafer, 1994). Oltre a quest'azione anticoagulante la proteina C attivata possiede un'azione fibrinolitica, antiischemica e antinfiammatoria. Yasuo Yamaguchi e coll., (1997) hanno dimostrato infatti che la trombomodulina e la proteina C attivata inoculate in ratti, nei quali era stata indotta una ischemia epatica, riducono la concentrazione delle citochine ad azione chemiotattica sui granulociti neutrofili, che veicolano mediatori flogistici responsabili di danno endoteliale. L'azione anticoagulante della APC è altresì dovuta alla sua capacità di

potenziare il sistema fibrinolitico. L'APC forma un complesso con l' inibitore dell'attivatore tissutale del plasminogeno (PAI-1). Fisiologicamente l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), risulta essere un fattore primario endogeno in grado di attivare la fibrinolisi, convertendo il plasminogeno in plasmina. La APC, attraverso l'inattivazione del PAI, rende libera da controllo l'attività del tPA, che così tende ad amplificare la fibrinolisi.

Riduzioni delle concentrazioni plasmatiche di proteina C e S possono riscontrarsi a seguito di deficienze ereditarie o acquisite. Quest'ultime, legate anche ai ridotti livelli di TM e EPCR, sono comunemente correlate all'uso di anticoagulanti a scopo terapeutico (warfarin) o di stati coagulativi che intervengono nel corso di interventi chirurgici, CID, e trombosi. Altre condizioni patologiche quali diabete, sepsi, vasculiti e aterosclerosi, possono ancora influire limitandone la concentrazione plasmatica. Infine anche a patologie epatiche si può associare una riduzione di questi fattori, in quanto il fegato è deputato alla sintesi delle proteine vitamina k-dipendenti. Tuttavia si possono riscontrare anche livelli plasmatici più alti di proteina C. Tale condizione

sembra sia legata al rilascio del fattore piastrinico 4 nei siti oggetto di danno vasale; in tal modo una maggiore espressione della proteina C limiterebbe l'evento protrombotico.

La trombina svolge un ruolo fondamentale nel coordinare, integrare e regolare l'emostasi. A seconda delle circostanze, essa può promuovere o prevenire la coagulazione del sangue. Questo effetto multivalente della trombina è stato descritto come il "paradosso della trombina" (Griffin, 1995). Il bilancio tra le attività protrombotiche e antitrombotiche della trombina, può essere influenzato da diverse variabili. Quando la trombina libera è disponibile nel sangue ad alte concentrazioni, soprattutto nel sito del danno vascolare, dove viene perduta l'influenza antitrombotica dell'endotelio, essa è un potente induttore della coagulazione. Questo enzima catalizza le reazioni d'attivazione di diversi fattori della coagulazione che portano alla formazione della fibrina, all'attivazione del fattore XIII, promuovente i legami crociati della fibrina, e all'attivazione e all'aggregazione delle piastrine (Fig. 3). A concentrazioni di trombina più basse e in presenza di endotelio intatto, predominano i suoi effetti

antitrombotici. Bassi livelli di trombina stimolano l'aumento dei livelli della proteina C attivata, considerata un anticoagulante endogeno circolante (Hanson e coll.,1993). In presenza di endotelio non danneggiato, la TM rimuove la trombina libera dal sangue, mentre le basse concentrazioni di trombina stimolano il rilascio dell'attivatore del plasminogeno di tipo tissutale (t-PA), di NO e PGI<sub>2</sub> dalle cellule endoteliali.

L'ATIII è la principale proteasi inibitrice della trombina e degli altri fattori della via intrinseca e di quella comune della coagulazione. Essa è una glicoproteina a catena singola (alfa-globulina), del peso molecolare di 58.000 Da, sintetizzata a livello epatico ed appartenente alla famiglia delle cosiddette **serpine** (**serine-protease inhibitors**) (Van Boven e Lane, 1997; Lane e Bayston 1997). L'antitrombina neutralizza la trombina e gli altri fattori della coagulazione attivati, attraverso la formazione di un complesso stechiometrico, equimolecolare ed irreversibile, tra il sito attivo dell'enzima della coagulazione ed il centro reattivo dell' antitrombina (Arg 393 e Ser 394). L'interazione fra trombina e AT-III può avvenire

spontaneamente, ma in presenza di eparina o di molecole eparino-simili, come le catene laterali di eparan-solfato dei proteoglicani delle cellule endoteliali, la velocità della reazione aumenta di oltre tre ordini di grandezza (1000-3000 volte). Le catene di eparan-solfato, oltre a catalizzare l'interazione tra AT-III e trombina, legano anche il TFPI (tissue factor pathway inhibitor), che inibisce la via estrinseca della coagulazione interagendo con il fattore Xa.

Pertanto, l'inattivazione da parte dell'antitrombina della trombina e degli altri fattori attivati della coagulazione, piuttosto che nel plasma, probabilmente, si verifica fisiologicamente sulle superfici vascolari, laddove è presente l'eparan-solfato che catalizza queste reazioni. Le molecole eparin-like interagiscono con le regioni ricche di aminoacidi carichi positivamente dell'ATIII (siti lisinici). Questa interazione determina una modificazione allosterica dell'antitrombina, che viene resa più affine alla trombina: si forma un complesso stabile mediante il legame tra l'arginina dell'antitrombina e la serina del sito attivo della trombina. L'ATIII è in grado di inibire anche altri fattori

della coagulazione, quali il IX<sub>a</sub>, X<sub>a</sub>, XI<sub>a</sub>, XII<sub>a</sub>, callicreina e plasmina. In ordine di importanza, l'inibizione del fattore Xa viene subito dopo l'inibizione della trombina. Deficit ereditari, quantitativi o qualitativi dell'ATIII, portano quindi ad una predisposizione al tromboembolismo (Schafer, 1994; De Stefano e coll., 1996).

Come è noto esiste una correlazione nel gatto tra cardiomiopatie idiopatiche squilibri dell'emostasi ed insorgenza di TEA, ma quale sia l'intimo meccanismo scatenante questo evento trombotico è ancora non chiaro. Nella presente ricerca si sono voluti valutare i livelli di trombomodulina (TM) di Antitrombina III (ATIII) e della Proteina C, al fine di individuare una possibile condizione protrombotica in gatti affetti da cardiomiopatie idiopatiche.

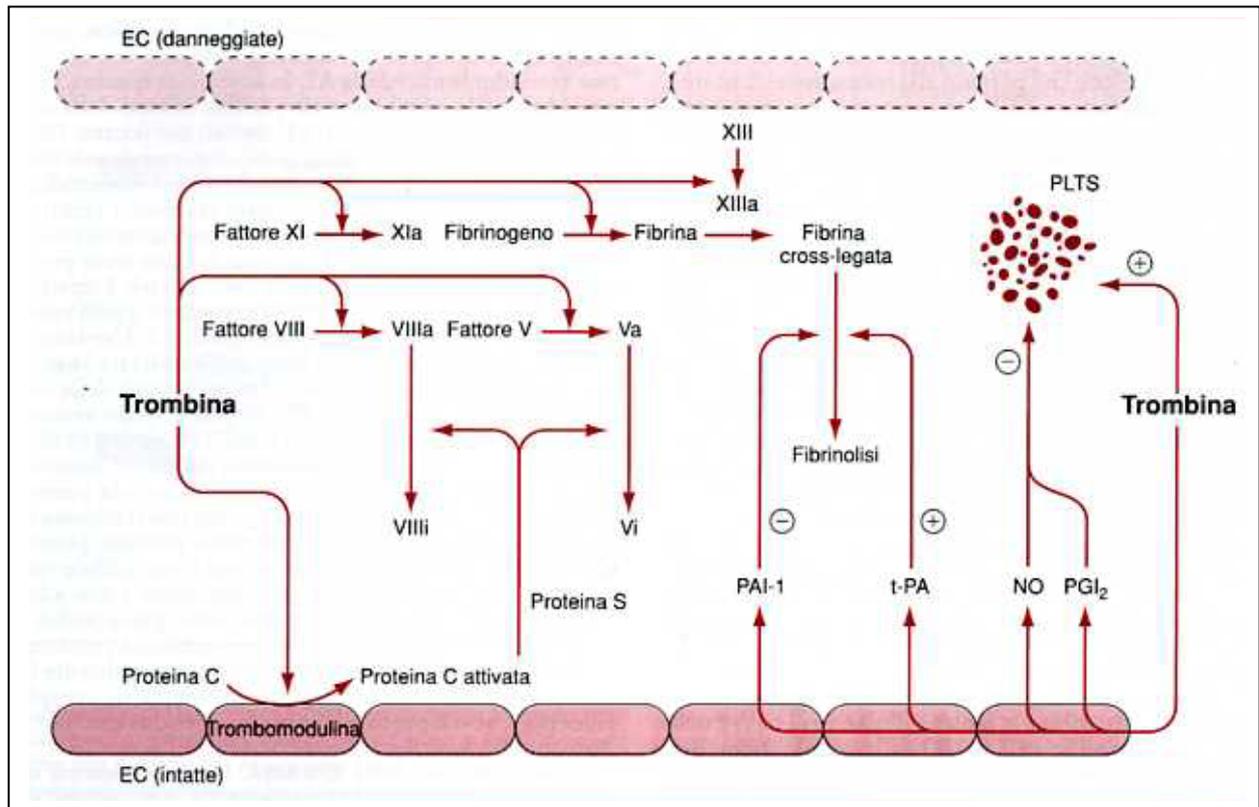


Figura 3: Azione della trombina

## **Parte Sperimentale**

### **MATERIALI E METODI**

I livelli plasmatici di trombomodulina, proteina C e ATIII sono stati valutati in 67 animali, di cui 36 affetti da cardiomiopatia ipertrofica (HCM), 12 da cardiomiopatia restrittiva (CMR), 2 con forme non classificate (UCM) e 17 animali sani (gruppo di controllo). Tutti i gatti considerati nello studio sono stati esaminati dall'anno 2002 all' 2005 presso la sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università Federico II di Napoli e presso la Sound technologies Inc. Carlsbad California (USA).

La maggior parte degli animali cardiopatici era rappresentata da comuni gatti domestici a pelo corto (46/50), mentre i rimanenti erano Siamesi (n.2) e gatti domestici a pelo lungo (n.

2). L'età dei gatti cardiopatici era compresa tra i 4 ed i 7 anni, ed il 76% era rappresentato da maschi.

La diagnosi di cardiomiopatia primitiva è stata formulata sulla base dei rilievi clinici e dei reperti di laboratorio, elettrocardiografici, radiologici ed ecocardiografici. In tutti i soggetti ammalati è stata valutata la pressione arteriosa sistemica ed i livelli plasmatici degli ormoni tiroidei. La diagnosi di certezza veniva ottenuta mediante esame ecocardiografico B-mode, M-mode ed Eco-doppler. Sono stati impiegati apparecchi ecografici del tipo GE Logiq 400 Pro e del tipo GE Logiq-book, dotati di sonde phased-array. L'indagine ultrasonografica è stata eseguita sugli animali non sedati e in decubito laterale dx su un tavolo provvisto di apposito foro. Misurazioni in formato M-mode dell'atrio sx, venivano ottenute da una scansione bidimensionale cinque camere in asse lungo, a partire dalla finestra parasternale dx.

In base alla classificazione clinica ISACHC gli animali sono stati suddivisi in due gruppi di 25 soggetti ciascuno: il primo comprendente soggetti asintomatici, mentre il secondo soggetti

con segni clinici di insufficienza cardiaca congestizia (CHF) in classe ISACHC II-III. Gli animali arruolati sono stati altresì suddivisi in due gruppi in funzione delle dimensioni atriali utilizzando un valore di cut-off per l'atrio sinistro (LA) uguale o maggiore di 1.35 cm in M-mode. Il rapporto atrio sx/aorta è stato calcolato a partire dalle rispettive dimensioni lineari determinate in formato monodimensionale. I valori ottenuti, sono stati correlati con i tassi plasmatici dei vari marker considerati.

Le determinazioni analitiche sono state eseguite su sangue venoso prelevato dalla vena giugulare e posto in provette contenenti sodio citrato al 3,8%. Il campione così ottenuto è stato sottoposto a centrifugazione per 5 minuti a 2500 rpm. Il plasma veniva successivamente aliquotato e stoccato alla temperatura di  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Il tasso plasmatico di trombomodulina è stato determinato con tecnica ELISA, impiegando un kit commerciale della American Diagnostic Inc. (Imubind - USA), basato sulla tecnica a "sandwich" con anticorpi monoclonali diretti verso i domini EGF<sub>1</sub> e EGF<sub>2</sub>, EGF<sub>5</sub> e EGF<sub>6</sub> della TM. I campioni da saggiare sono stati sempre eseguiti in doppio al pari della curva

di taratura. In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di plasma del campione da testare diluito 1: 4 in “sample buffer”. Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente sono stati eseguiti quattro lavaggi con wash buffer con ph 7.4. Successivamente sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di “detection antibody” a cui è seguita nuovamente un’incubazione di 30 minuti. Dopo un ulteriore ciclo di lavaggi, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di substrato e dopo 20’ la reazione è stata bloccata aggiungendo 100  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5M. Le piastre sono state quindi lette utilizzando una lunghezza d’onda di 450nm entro 30 minuti. La lettura e i risultati ottenuti sono stati elaborati utilizzando un software specifico dedicato al tipo di lettore utilizzato (Biorad mod. 1575). Al fine di verificare il possibile utilizzo di tale kit nella specie felina, sono state previamente eseguite opportune prove di riproducibilità e ripetibilità.

Il dosaggio della proteina C e dell’ATIII è stato effettuato impiegando un metodo cromogenico della Instrumentation Laboratory Company (HemosIL<sup>TM</sup> - USA), secondo quanto

riporto da Welles e coll., (1994), per quanto attiene l'AT III nei gatti e secondo Toulza e coll., (2004) per quanto attiene la Proteina C nel cane. A tal riguardo sono state sempre condotte prove di ripetibilità, riproducibilità e di sensibilità, al fine di una corretta validazione della metodica utilizzata.

Nei campioni in esame, i livelli di proteina C, riportati in attività %, sono stati misurati automaticamente con il sistema di coagulazione ACL 3000 in due fasi:

- 1) Incubazione del plasma con l'attivatore della Proteina C
- 2) Determinazione della Proteina C attivata con substrato cromogenico. La paranitroanilina rilasciata è stata monitorata a 405 nm ed è risultata inversamente proporzionale alla concentrazione di Proteina C nel campione esaminato.

Anche i livelli di Antitrombina III, espressi sempre in attività %, sono stati misurati automaticamente in due fasi:

- 1) Incubazione del plasma con il reattivo Fattore Xa, in presenza di un eccesso di eparina.

2) Determinazione dell'attività residua del Fattore Xa con substrato cromogenico. Anche in questo caso la paranitroanilina rilasciata è stata monitorata a 405 nm e risultava inversamente proporzionale alla concentrazione di ATIII nel campione esaminato.

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad elaborazione statistica mediante test di t-Student e analisi della regressione lineare. Sono state considerati significativi livelli di P minori o uguali a 0.05.

## RISULTATI

I livelli plasmatici medi di trombomodulina ottenuti nei gatti esaminati, sono risultati pari a  $5.11 \pm 1.2$  ng/ml e  $4.6 \pm 1.3$  ng/ml, rispettivamente negli animali sani ed in quelli del I gruppo (asintomatici); nei gatti del II gruppo (sintomatici) i livelli plasmatici di TM sono apparsi più bassi ( $3.86 \pm 1.2$  ng/ml), statisticamente significativi ( $p < 0.01$ ) sia rispetto a quelli osservati nei soggetti sani che a quelli degli animali asintomatici (Graf 1).

La concentrazione plasmatica media di proteina C è risultata più elevata negli animali del I gruppo (asintomatici) ( $63.2 \pm 14.5$  %), rispetto ai gatti del II gruppo (sintomatici) ( $56.6 \pm 13.5$  %) ed a quelli sani ( $54.1 \pm 14.8$  %), ma le variazioni riscontrate non sono apparse statisticamente significative (Graf 5).

Il tasso plasmatico medio di Antitrombina III risulta pari a  $128.2 \pm 12$  % e  $127.8 \pm 11.3$  %, rispettivamente nei gatti sani e in quelli del II gruppo (sintomatici); nei gatti del I gruppo

(asintomatici) i livelli plasmatici di Antitrombina III sono apparsi più bassi ( $112 \pm 17.9 \%$ ), statisticamente significativi ( $p < 0.01$ ), sia rispetto a quelli osservati nei soggetti sani che a quelli degli animali sintomatici (Graf 4) (Tabella).

	I GRUPPO (n=25)	II GRUPPO (n=25)	SANI (n=17)	
	4.6 <sup>ab</sup>	3.86 <sup>a</sup>	5.11	Valori medi (ng/mL)
TM	1.3	1.2	1.2	DS
	112 <sup>cd</sup>	127.84	128.24	Valori medi (%)
AT III	17.92	11.36	12	DS
	63.25	56.64	54.18	Valori medi (%)
Proteina C	14.55	13.54	14.83	DS

<sup>a</sup> $p < 0.01$  vs gruppo di controllo; <sup>ab</sup>  $p < 0.05$  vs II gruppo

<sup>cd</sup>  $p < 0.01$  vs gruppo di controllo e gruppo II

Per quanto attiene la suddivisione degli animali in base alle dimensioni atriali, 22 gatti con LA inferiore a 1.35 (LA:

1.25±0.07 cm; LA/AO 1.22±0.1) hanno mostrato valori di TM di 4.7±1.3 ng/ml, mentre i restanti 28 gatti, con evidente ingrandimento atriale (LA: 1.87±0.3 cm; LA/AO 1.95±0.4), hanno evidenziato valori di TM 3.89±1.1 ng/ml (p<0.01 vs sani; p<0.05 vs I gruppo) (Graf 2; Graf 3). Non è stata osservata una correlazione statisticamente significativa per l'analisi della regressione lineare tra TM e dimensioni atriali (r = 0.176).

Per quanto attiene la Proteina C e l'Antitrombina III, non sono state verificate differenze statisticamente significative tra gli animali con dimensioni dell'atrio nei limiti della norma (PC: 63.0 ± 14.82 %; AT III: 115.8 ± 20.3 % ) e quelli con ingrandimento atriale (PC: 57.87 ± 13.81 %; AT III: 122.7 ± 13.8 % ). Allo stesso modo non è stata osservata una correlazione statisticamente significativa per l'analisi della regressione lineare tra PC, ATIII e dimensioni atriali (PC: r = - 0.124; AT III: r = 0.188).

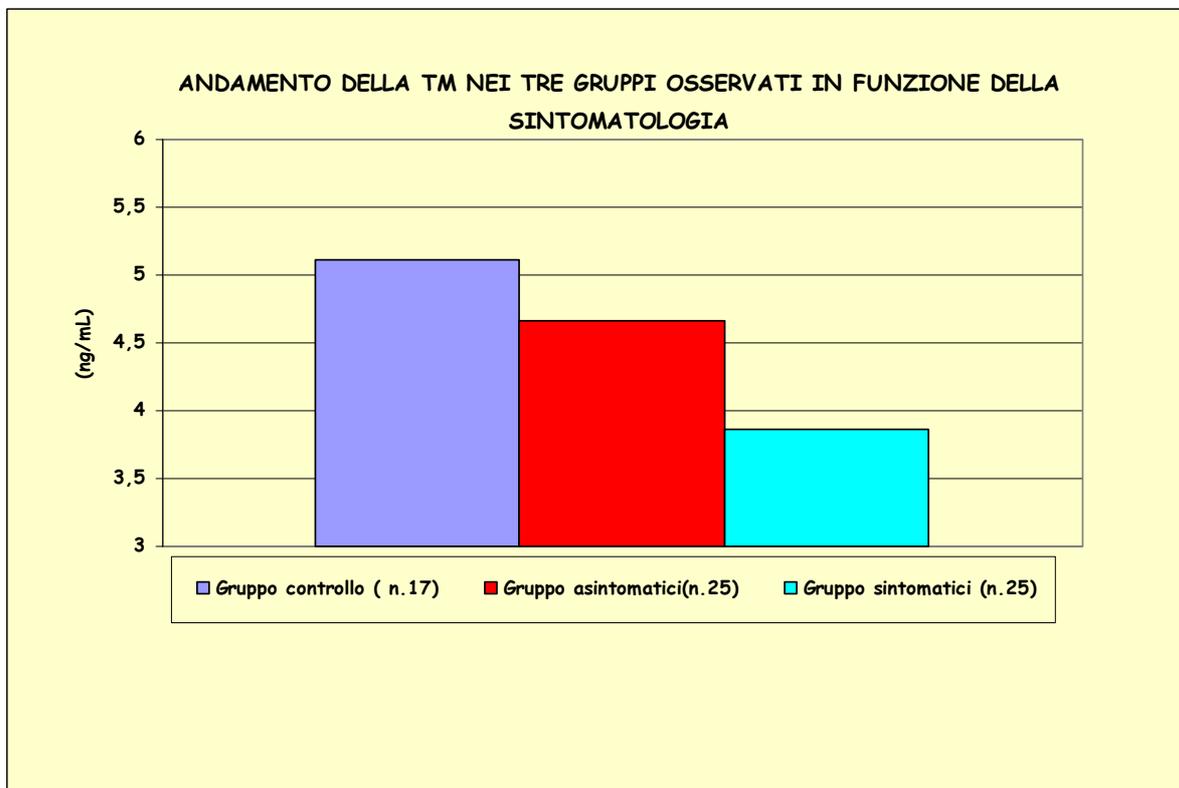


Grafico N 1

|

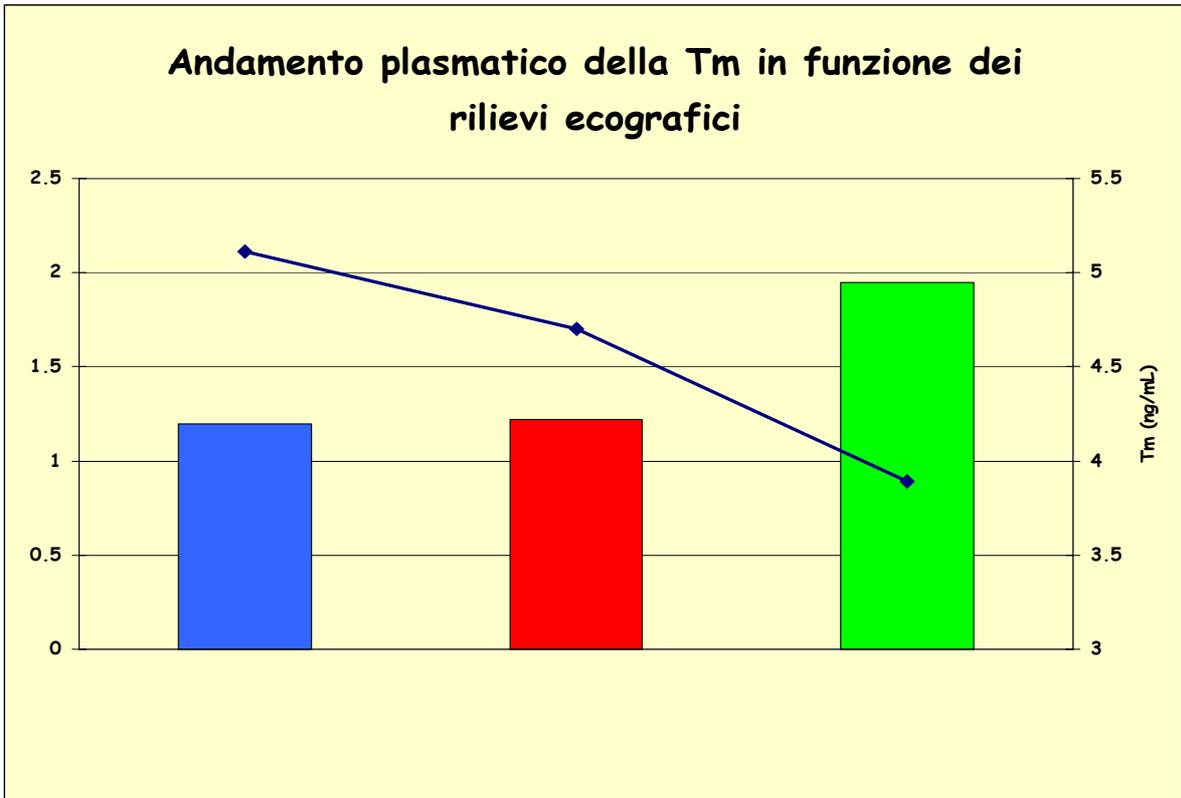


Grafico N 2

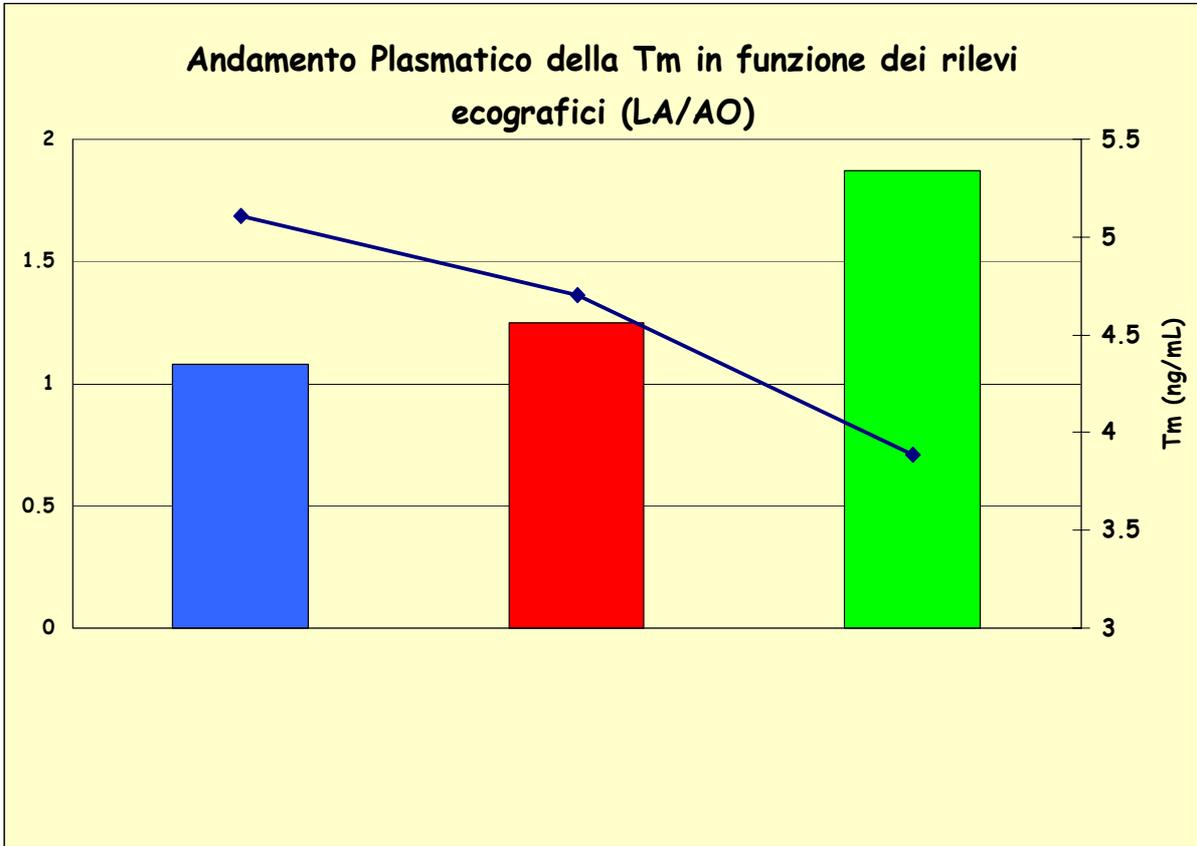


Grafico N 3

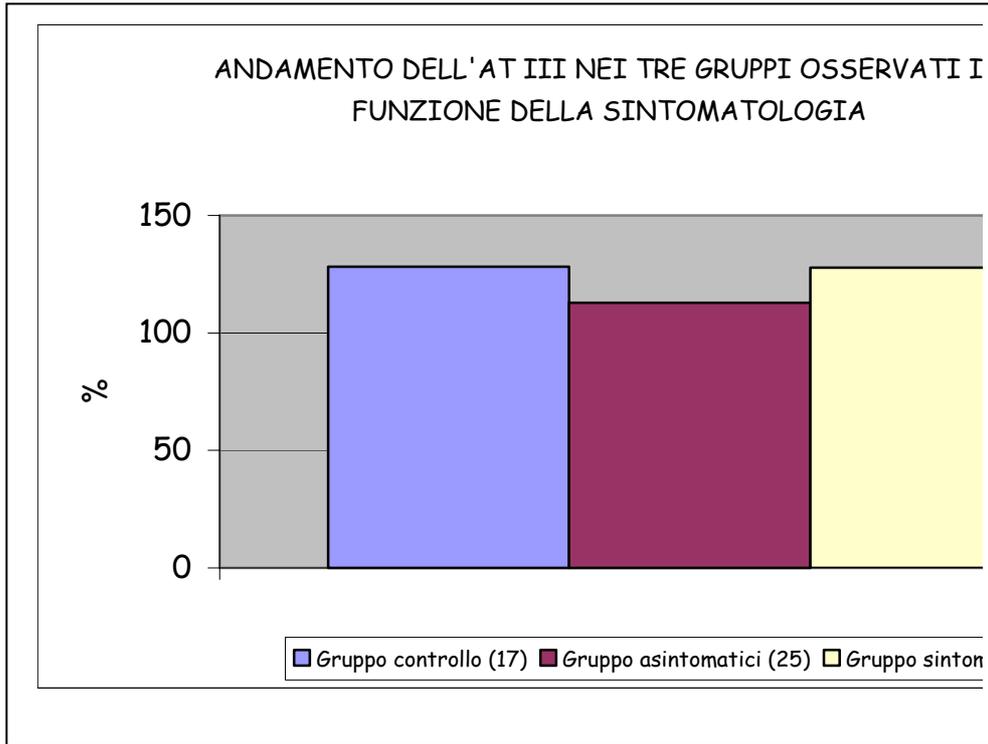


Grafico N 4

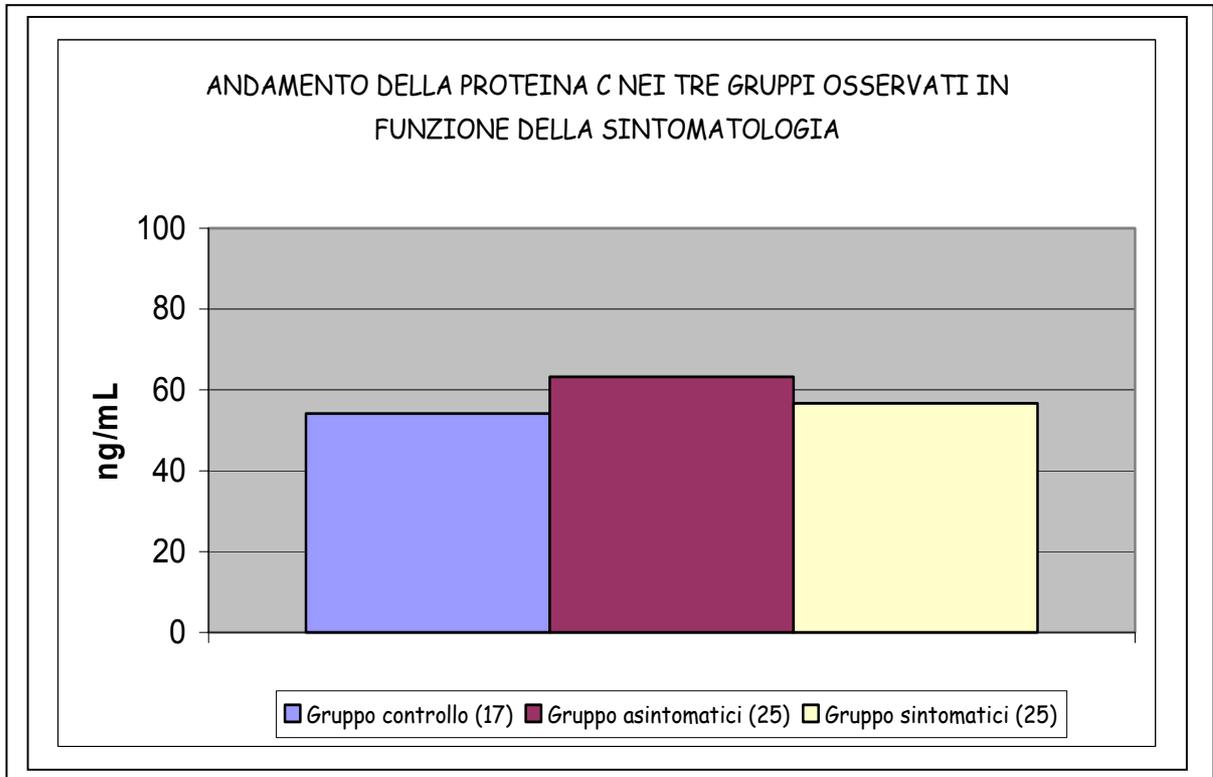


Grafico N 5

## **DISCUSSIONI E CONCLUSIONI**

In corso di malattie cardiovascolari, suscettibili di complicazioni tromboemboliche, la possibilità di individuare precocemente una condizione di ipercoagulabilità, riveste un notevole significato clinico-terapeutico e, soprattutto, prognostico. In medicina umana, il dosaggio plasmatico dei marker di disfunzione endoteliale (Trombomodulina, Fattore di von Willebrand, ecc), degli inibitori umorali dei fattori della coagulazione (proteina C, Antitrombina III, ecc), dei marker di attivazione piastrinica (Beta-Tromboglobulina, P-Selectina, Fattore Piastrinico IV, ecc) e di quelli della fibrinolisi (fibrinogeno, D-dimero, ecc), ha consentito, in questo ultimo decennio, di meglio comprendere gli intimi meccanismi patogenetici che portano alla formazione dei trombi, migliorando, in tal modo, l'approccio diagnostico e terapeutico, soprattutto attraverso l'identificazione degli stadi precoci pro-trombotici in corso di insufficienza cardiaca congestizia (Mondillo e coll., 2000).

Come già descritto in precedenza, la presenza di trombi atriali, con possibili complicazioni tromboemboliche, rappresenta un evento comune nei gatti affetti da cardiomiopatie primitive. Tuttavia in tale specie animale, a differenza di quanto descritto nei pazienti umani, molti aspetti evolutivi del processo trombogenico non sono ancora stati chiariti, mentre del tutto assenti sono gli studi volti all'identificazione di marker predittivi di una condizione di ipercoagulabilità. Diverse ricerche condotte sia in vivo che in vitro, hanno permesso di evidenziare che le piastrine di tale specie animale sono dotate di una maggiore capacità aggregante soprattutto nei confronti dell'ADP, impiegato quale agonista (Ohata e coll., 1992). Tale rilievo lascia supporre che un'alterazione dell'emodinamica cardiovascolare in corso di CHF, possa contribuire ad attivare, direttamente e/o indirettamente, tali cellule, con conseguente innesco del processo trombogenico. In tale processo un ruolo cruciale è, come già accennato, svolto dall'endotelio che attualmente costituisce il "fulcro" di un complesso meccanismo

neuro-ormonale attraverso, la produzione e/o attivazione di diverse sostanze coinvolte nel processo emocoagulativo.

La TM, la Proteina C e l'AT III, agiscono in maniera intimamente collegata, costituendo un unico sistema anticoagulante, il cui comune denominatore può essere rappresentato dalla trombina. Essa, infatti, svolge un fondamentale ruolo nel coordinare, integrare e regolare l'omeostasi del processo emocoagulativo; infatti a seconda delle circostanze, può prevenire o innescare il processo della coagulazione. Tale effetto bivalente della trombina è stato descritto come il "paradosso della trombina" (Griffin, 1995). Nel bilancio tra le attività protrombotiche e antitrombotiche essa può, risultare influenzata da diverse fattori sia di derivazione endoteliale quali la TM sia di derivanti dal processo emocoagulativo (Proteina C, Proteina S, ATII, ecc.).

I diversi livelli plasmatici di TM osservati nel nostro studio, più bassi nei pazienti sintomatici rispetto a quelli asintomatici e agli animali di controllo, potrebbero essere interpretati come una conseguenza di una disfunzione endoteliale, responsabile di una

minore produzione di TM, oppure di un possibile aumentato consumo, finalizzato a garantire l'omeostasi del processo emocoagulativo. Alcuni studi condotti in vitro, lasciano ritenere che tale riduzione possa essere legata all'azione negativa operata dal TNF alfa e IL 1 $\beta$ , citochine pro-infiammatorie che risultano aumentate in modo significativo in pazienti umani con HCM e/o CHF (Penicka e coll., 2001; Chong e coll., 2003).

Una riduzione dei tassi plasmatici di TM è stata inoltre riportata in pazienti affetti da ipertensione arteriosa polmonare, associata ad una condizione di ipossia cronica (Cacoub e coll., 1996). Kutotobi e coll. (1998), in uno studio immunohistochimico, hanno altresì evidenziato una ridotta espressione di TM sull'endocardio atriale in pazienti umani con fibrillazione atriale, sebbene tale rilievo non fosse correlato alla gravità delle lesioni istologiche osservate.

I livelli plasmatici di ATIII osservati nel nostro studio appaiono invece significativamente più bassi negli animali asintomatici rispetto a quelli sintomatici, e a quelli sani. Tali risultati si discostano sensibilmente da quelli riportati da Welles e

coll. (1994) che evidenziano un incremento dei tassi plasmatici di AT III in gatti cardiopatici, mentre sono in accordo con quelli riportati in pazienti umani affetti da disturbi cardiovascolari. (Pelkonen e coll., 2005). I diversi risultati ottenuti potrebbero essere legati a diversi fattori, quali la diversa sensibilità dei kit utilizzati, il ridotto numero di animali arruolati nello studio americano (n.11), ovvero alla differente stadiazione clinica considerata nel nostro studio rispetto a quello di Wells e coll (1994).

I livelli di tale sostanza tendono invece a normalizzarsi nei soggetti sintomatici, dove raggiungono le concentrazioni simili a quelli del gruppo controllo (sintomatici  $127.84\% \pm 11$ ; sani  $128,24\% \pm 12$ ). Tale andamento non è di facile interpretazione, ma potrebbe anche essere invocato un adattamento dell'organismo alla condizione cronica, propria dei soggetti con CHF in fase avanzata, come lascia ritenere l'assenza, in tale gruppo, di significative variazioni plasmatiche della proteina C associata ad una non evidente correlazione tra le dimensioni della camera atriale e i vari marker considerati.

Nei soggetti asintomatici l'attività procoagulante indotta dalla riduzione di ATIII potrebbe essere contrastata dalla via trombina-TM-Proteina C, i cui valori plasmatici non tendono ad modificarsi. D'altronde, in questi animali non si assiste ad un aumento del tempo di protrombina (dati non riportati), a prova di una normale concentrazione plasmatica di tale sostanza. Nelle fasi avanzate, l'azione inveterata propria del processo cronico, porterebbe invece ad una disfunzione essenzialmente di carattere endoteliale, che si esprime con una riduzione di TM o con una minore espressione recettoriale; i livelli plasmatici di tale sostanza sembrano comunque essere sufficienti a mantenere inalterata l'omeostasi del processo emocoagulativo, come mostra anche l'assenza di trombi e di rilievi ecografici indicativi di una condizione di maggiore ipercoagulabilità.

In conclusione il nostro studio lascia ritenere che nelle condizioni sperimentali considerate, i gatti affetti da cardiomiopatie primitive a diverso stadio clinico presentano una disfunzione sia dei meccanismi emocoagulativi che del sistema endoteliale, nonostante non si evidenzia un'attivazione del

processo trombogenetico, in conseguenza dell'attivazione dei diversi meccanismi di equilibrio messi in atto dall'organismo, tra sistema pro-coagulante ed sistema anti-coagulante. Sono comunque necessari ulteriori studi, volti ad approfondire gli intimi meccanismi del processo emocoagulativo e l'esatto ruolo che l'endotelio svolge in tale processo, soprattutto arruolando animali in cui vi sia una chiara attivazione del processo trombogenetico, al fine di identificare uno o più marker utilizzabili, sul piano clinico-diagnostico, nei soggetti affetti da cardiomiopatie primitive.

## BIBLIOGRAFIA

Acquatella H, Rodriguez-Salas LA, Gomez-Mancebo JR. *Doppler echocardiography in dilated and restrictive cardiomyopathies*. *Cardiol. Clin.* 1990; 8:349-367

Andrews EJ, Ward BC, Altman NH, eds. *Spontaneous Animal models of human disease*. NY Academic press 1979:41-82

Angelini A, Calzolari V, Thiene G, et al. *Morphologic spectrum of primary restrictive cardiomyopathy*. *Am. J. Cardiol* 1997; 80:1046-1050

Appleton MAC, Attanoos RL, Jasani BJ. *Thrombomodulin as a marker of vascular and lymphatic tumours*. *Histopathology* 1996; 29:153-157

Appleton CP et al. *Demonstration of restrictive ventricular physiology by doppler echocardiography*; *Journ. Am.Coll.Cardiol* 1988;11:757

Baker L.D., Birk P. *Removal of aortic trombi in the cat.* Mod Vet Pract 1974; 55:303

Berger PB, Duffy J, Reeder GS, et al. *Restrictive cardiomyopathy associated with the eosinophilia-myalgia syndrome.* Mayo. Clin. Proc. 1994; 69:162-165

Bick RL, Kaplan H. *Syndromes of thrombosis and hypercoagulability. Congenital and acquired causes of thrombosis.* Med. Clin. N. Am. 1998;82(3):409-58

Boffa MC, Aurousseau MH, Wiesel ML, Grunebaum L, Cazenave JP. *Variations of plasma thrombomodulin level due to sex and age.* Blood 1991; 78(suppl.):221

Boffa MC, Jackman RW, Peyri N, Boffa JF, George B. *Thrombomodulin in the central nervous system.* Nouv Rév Fr Hématol 1991; 33:423-9

Boffa MC, Karmochkine M, Bérard M. *Plasma thrombomodulin as a marker of endotheliun damage*. *Nouv Rév Fr Hématol* 1991; 33:529-30

Boffa MC. *Considering cellular thrombomodulin distribution and its modulating factors can facilitate the use of plasma thrombomodulin asa reliable endothelial marker*. *Haemostasis* 1996; 26(suppl. 4):233-43

Bourin MC, Lundgren-Akerlund E, Lindhal U. *Isolation and characterization of glycosaminoglycan component of rabbit thrombomodulin proteoglycan*. *J Biol Chem* 1990; 265:15424-31

Brembilla-Perrot B, Jaquemin L, Houplon P, et al. *Increased atrial vulnerability in arrhythmogenic right ventricular disease*. *Am. Heart J.* 1998; 135:748

Butler HC. *An investigation into the relationship of an aortic embolus to posterior paralysis in the cat.* J. Small Anim. Pract. 1971;12:141-58

Cacoub P, Karmochkine M, Dorent R, Nataf P, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I, Boffa MC. *Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension* Am. J. Med. 1996; 101(2):160-4

Chapman W, Hanson WL. *Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat.* Ed C E. Green. Philadelphia, 1984 W.B. Saunders. p764

Chong AY, Blann AD, Lip GY. *Assessment of endothelial damage and dysfunction: observations in relation to heart failure.* QJM. 2003 Apr;96(4):253-67. Q. J. Med. 2003; 96: 253-267

Ciaramella P, Papparella S, Oliva G. *Panofthalmite granulomatosa bilaterale in corso di leishmaniosi nel cane.*  
Acta Medica Veterinaria 1994; vol. 40, n. 4

Ciaramella P, Cortese L, Corona M, Di Loria A, Persechino A.  
*Plasma thrombomodulin levels in dogs naturally infected with Leishmania infantum* Vet. Res. Com 2004; 28, Suppl 1, 327-330

Cines DB, Pollack ES, Buck CA, et al: *Endotelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.*  
Blood 91:3527 – 3561, 1998

Clavell A, Stingo A, Margulies K, Lerman A, Underwood D, Burnett JCJ. *Physiological significance of endothelin. Its role in congestive heart failure* Circulation 1993; Suppl. 87 (5):45-50

Collet P., 1930 *Thrombose de l'aorte posterieur chez un chat.*  
Bul. Soc. Sci Vet. Lyon 33:136

Conway EM, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M. *Human neutrophils synthesize thrombomodulin that does not promote thrombin-dependent protein C activation.* Blood 1992; 80:1254-63

Dai KS, Chen SP, Yang PC, Liu CY, Mao SJ. *Ultrastructural alteration in pigs with naturally occurring hypertrophic cardiomyopathy.* Br. Vet. J. 1995; 152:333-338

De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. *Inherited thrombophilia: Pathogenesis, clinical syndromes and management.* Blood 1996; 87:3531-3544

Di Loria A, Lindquist E, Piantedosi D, Cortese L., Manco A., Skeels M. , Ciaramella P. *Feline Idiopathic Cardiomyopathy: echocardiographic retrospective study of 102 cats (2003-2005).*

Atti European Association Veterinary Diagnostic Imaging

Napoli Ottobre 2005

Esmon CT. *Thrombomodulin as a model of molecular mechanism that modulate protease specificity and function at the vessel surface.* FASEB J 1995; 9:946-55

Esmon CT. *Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway.* Tromb. Haemost. 1993; 70:29-35

Esmond CT, Owen WG. *Identification of endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of proteinC.* Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:2249-52

Ettingher SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Disease of the dog and cat ed 5<sup>th</sup>* WB Saunders Philadelphia 2000

Fauci AS, Harley JB, Roberts WC, et al. *The idiopathic hypereosinophilic syndrome : clinical, pathophysiologic, and therapeutic considerations.* Ann. Intern Med. 1982; 97:78-92

Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M. *Skin lesions in canine leishmaniasis*. J Small Anim Pract 1988; 29:381-388

Fox *Hypertrophic cardiomyopathy – clinic and pathologic correlates* – Journal of Vet. Cardiology 2003;5: 39-45

Fox PR, Liu SK, Maroon BJ. *Echocardiographic assesment of spuntaneously occurring feline hypertrophic cardiomyopathy : An animal model of human disease*. Circulation. 1995; 92:2645-2651

Fox PR, Petrie JP, Liu SK, et al. *Clinical and pathologic features of crdiomyopathy characterized by myocardial faillure in 49 cats: 1990-1995(abstract)* J. Vet. Intern Med. 1997;11:139

Fox PR, Sisson DD, Moise NS ed. *Textbook of Canine and Feline Cardiology Principles and Practice*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders; 1999

Fox PR, Basso C, Maroon BJ et al. *Spontaneous occurrence of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in the domestic cat: A new animal model of human disease.* Circulation 1998; 98:297

Fontane G, Fontaliran F, Frank R. *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies: clinical forms and main differential diagnosis.* Circulation 1998; 97:1532

Freestone B, Lip GY, Chong AY, Nadar S, Lee KW, Blann AD. *Circulating endothelial cells in atrial fibrillation with and without acute cardiovascular disease.* Thromb Haemost. 2005 Oct;94(4):702-6.

Fuentes VL *Feline heart disease: an update.* Journal of Small Animal Practice 1992 33, 130-137

Gajdusek C, Carbon S, Ross R, Nawroth PP, Stern DM. *Activation of coagulation releases endothelial cell mitogens.* J Cell Biol 1986; 103:419-428

Geisterfer-Lowrance AA, Coriste M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, Seidman JG. *A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy*. Science 1996; 272:731-734

Gomi K, Zucshi M, Honda G, Kawahara S, Matsuzaki O, Kanabayashi T, Yamamoto S, Maruyama I, Suzuki K. *Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin-induced thromboembolism in mice*. Blood 1990 Apr 1;75:1396-9

Good LI, Manning AM. *Thromboembolic disease: predispositions and management*. Comp. Contin Educ. Pract. Vet. 2003;25(9):660-74

Griffin JH. The thrombin paradox. Nature 1995; 378:337-338

Griffiths IR, Duncan ID. *Ischaemic neuromyopathy in cats*. Vet. Rec. 1979;104:518

Hanson SR, Griffin JH, Harker LA, et al. *Antithrombotic effects of thrombin-induced activation of endogenous protein C in primates*. J. Clin. Invest. 1993; 92:2003-2012

Helensky CA, Ross JN, *Platelet aggregation in feline cardiomyopathy*, J Vet Intern Med 1987;1:24

Henderson AH: *Endotelium in control*. Br. Heart J 1991; 65:116-125

Hergesell O, Andrassy K, Geberth S, Nawroth P, Gabath S. *Plasma thrombomodulin levels are dependent on renal function*. Thromb Res 1993;72:455-8

Hogan DF, Dhaliwal RS, Sisson DD, Kitchell BE. *Paraneoplastic thrombocytosis-induced systemic thromboembolism in a cat*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc 1999;35(6):483-6

Horie S, Kizaki K, Ishii H, Kazama M. *Retinoic acid stimulates expression of thrombomodulin, a cell surface anticoagulant glycoprotein, on human endothelial cells. Differences between up-regulation of thrombomodulin by retinoic acid and cyclic AMP.* Biochem J 1992; 281:149-154

Huang SY, Tsou HL, Chiu YT, Shyu JJ, Wu JJ, Lin JH, Liu SK. *Heritability estimate of hypertrophic cardiomyopathy in pigs.* Lab. Anim. Sci. 1996; 46:310-314

Huong DL, Wechsler B, Papo T, et al. *Endomyocardial fibrosis in Behcet's disease.* Ann. Rheum. Dis. 1997; 56:205-208

Imhof RK. *Production of aortic occlusionresembling acute aortic embolism syndrome in cats.* Nature 1961;192:979

Isermann B, Hendrickson SB, Zogg M, Wing M, Cumiskey M, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Weiler H. *Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C*

*anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. J Clin Invest 2001; 108(4):537-546*

Ishii H, Kizaki K, Uchiyama H, Horie S, Kazama M *Cyclic AMP increases thrombomodulin expression on membrane surface of cultured human umbilical vein endothelial cells. Thromb Res 1990; 59:841-850*

Ishii H, Majerus PW. *Thrombomodulin is present in human plasma and urine. J Clin Invest 1985; 76:2178-81*

Ishii H, Uchiyama H, Kazama M. *Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. Thromb Haemost 1991; 65:618-623*

Jones MP, Alving BM. *Evaluation of the hypercoagulable patient. Intern Med. 1997; 18:37*

Kienle RD *Feline unclassified and restrictive cardiomyopathy.*  
Small animal Cardiovascular medicine. St. Louis: Mosby  
1998:363-369

Kittleson MD et al., *Familial hypertrophic cardiomyopathy in  
Maine Coon cats. An animal model of human disease.* Circulation  
1999, 3172-318

Kittleson MD et al., *Heritable characteristics, phenotypic  
expression, and natural history of hypertrophic cardiomyopathy  
in Maine Coon cats.* J. Vet. Intern. Med. 1998;12 : 198

Kittleson MD, Meurs KM, Munro MJ, Kittleson JA, Liu SK,  
Pion PD, Towbin JA. : *Familial hypertrophic cardiomyopathy in  
Maine Coon cats – An animal model of human disease.*  
Circulation 1999; 99:3172-3180

Kushwaha SS, Fallon JT, Fuster V. *Restrictive Cardiomyopathy.*  
N. Engl. J. Med. 1997; 336:267-276

Kutotobi T, Koretsune Y, Sato H, Sato H, Ohnishi Y, Kuzuya, Hon M, Matsuda H, Thrombomodulin *Expression on atrial endocardium in patients with atrial fibrillation*. JACC Proceeding 1998

Lane DA, Bayston TA. *Molecular basis of antithrombin action and deficiency*. In Schafer AI ed. *Molecular Mechanisms of Hypercoagulable States*. Austin, Landes Bioscience. 1997;49-77

Laste N.J., Harpster N.K. *A retrospective study of 100 cases of feline distal aortic thromboembolism: 1977-1993*. J Am Anim Hosp Assoc 1995; 31:492-500

Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Ferrell G, Esmon CT. *Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: Implications for the control of the protein C pathway*. Circulation 1997;96:3633-3640.

Lawder DF, Templeton AJ, Monti KL. *Evidence for genetic involvement in feline dilated cardiomyopathy* J. Vet. Intern Med. 1993; 7:383

Liu SK, Chiu YT, Shyu JJ, Factor SM, Chu R, Lin JH, Hsou HL, Fox PR, Yang PC. *Hypertrophic cardiomyopathy in pigs: quantitative pathologic features in 55 cases*. Cardiovascular Pathos. 1994;3:261-268

Liu SK, Maroon BJ, Tilley LP. *Feline hypertrophic cardiomyopathy: gross anatomic quantitative histologic features*. Am J. Pathol 1981; 102:388-395

Liu SK, Maroon BJ, Tilley LP. *Hypertrophic cardiomyopathy in the dog*. Am J. Pathol 1979;84:497-508

Liu SK. *Pathology of feline heart disease*. Vet. Clin. North Am. 1977;7:323-339

Liu SK, Fox PR. Cardiovascular pathology. In Fox PR, Sisson DD, Moise NS ed. *Textbook of Canine and Feline Cardiology*

*Principles and Practice*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders;  
1999: 817-844

Liu SK, Roberts WC, Maroon BJ. *Comparison of morphologic findings in spontaneously occurring human, feline and canine hypertrophic cardiomyopathy*. Am. J. Cardiol. 1993;72:944-951

Liu SK, Tilley LP. *Animal models of primary myocardial diseases*. Yale J. Biol Med. 1980;53:191-211

Mallat Z, Tedgui A Fontaliran F, et al. *Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia*. N. Engl J. Med. 1996; 335:1190

Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Amiral J, Dechavanne M, Delmas PD. *Thrombomodulin is synthesized by osteoblast, stimulated by 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and activates protein C at their cell membrane*. Endocrinology 1993;133:668-74

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, et al. *The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39*. J. Clin Invest 1997; 99:1351-1360

Marian AJ, Roberts R. *Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic Cardiomyopathy* Circulation 1995; 92(5):1336-47

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM Gidding SS, Bild D. *Assessment of the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study*. Circulation. 1995; 92:785-789.

Maron BJ, Spirito P., Roman MJ et al., *Evidence that hypertrophic cardiomyopathy is a common genetic cardiovascular disease: prevalence in a community-based population of middle aged and elderly American Indians (abstract)*. Circulation. 2003; 108:IV-664

Martin L et al.,1994, *Left ventricular hypertrophy in a closed colony of Persian cats (abstract)* Journal Vet. Int. Medicine;8:143

Mc Michael M., Rozanski EA, Rush JE, *Low blood glucose levels as a marker of arterial thromboembolism in dogs and cats.* J. Vet Emerg Crit Care 1998;8(3):261

McConnell E, Chaffe E, Cashell IG, Garner FM. *Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog.* JAVMA 1970; 156,2:179-203

McEwen SA, Valli VEO, Hilland TJ. *Hypereosinophilic syndrome in cats : a report of three cases.* Can. J. Com. Med. 1985; 49:248-253

McKenna WJ, Thiene G, Nava A, et al. *Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task*

*Force of th working group Myocardial and Pericardial disease of The European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. Br. Heart J. 1994; 71:215*

Meurs KM, FoxPR, Magnon AL, et al. *Molecular screening by polymerase chain reaction detects panleukopenia virus DNA in formalin-fixed hearts from cats with idiopathic cardiomyopathy and myocarditis. Cardiovasc. Pathol 2000; 9:119-126*

Meurs et al., *Familial systolic anterior motion of the mitral valve and/or hypertrophic cardiomyopathy is apparently inherited a san autosomal dominant trait in a family of Americanshortair cats (Abstr.) J. Vet. Intern. Med. 1997 11 : 138*

Mondillo S, Sabatini L, Agricola E, Ammaturo T, Guerrini F, Barbati R, Pastore M, Fineschi D, Nami R. *Correlation between left atrial size, prothrombotic state and markers of endothelial*

*dysfunction in patients with lone chronic nonrheumatic atrial fibrillation* Internat. J. of Cardiol. 2000; 75:227-232

Moore KE, Morris N, Dhuma N, Murtaugh RJ, Rush JE. *Retrospective study of streptokinase administration in 46 cats with arterial thromboembolism.* J. Vet. Emerg. Crit. Care. 2000;10(4):245-57

Novotny MJ, Hogan PM, Flannigan G. *Ecocardiographic evidence for myocardial failure induced by taurine deficiency in domestic cats.* Can. J. Vet. 1994;58,1:6-12

Olmstead ML, Butler HC. *Five-hydroxytryptamine antagonists and feline aortic embolism.* J. Small. Anim. Pract. 1977;18:247-59

Olsen EG, Spry CJ. *Relation between eosinophilia and endomyocardial disease.* Prog. Cardiovasc. Dis. 1985; 27:241-254

Ohta K, Gotoh F, Tomita M et al. *Animal species differences in erythrocyte aggregability*. Am J. Physiol 1992; 262: 1009

Pelkonen KM, Wartiovaara-Kautto U, Nieminen MS, Ahonen K, Sinislaio J. Low normal level of protein C or of antithrombin increases risk for recurrent cardiovascular events. Blood Coagul. Fibrinolysis 2005; 16(4):275-280

Penika M, Gregor P, Krupicka J, Jira M. *Tumour necrosis factor-alpha soluble receptors type I are related to symptoms and left ventricular function in hypertrophic cardiomyopathy*. Can J. Cardiol. 2001; 17:777-784

Peterson E.N., Moise N.S., Brown C.A., et al. *Heterogenicity of hypertrophy in feline hypertrophic heart disease*. J Vet Intern Med 1993;7:183-189

Pinamonti B, Sinagra G, Salvi A, et al. *Left ventricular involvement in right ventricular displasia*. Am. Heart J. 1992; 123:711

Pruna A, Peyri N, Bérard M, Boffa MC. *Thrombomodulin in synthesized by human mesangial cells*. Kidney Int 1997;51

Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies*. Circulation 1996; 93:841-842

Risau W. *Differentiation of endothelium*. FASEB J. 1995; 9:926-933

Rubanyi GM. *The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases*. J. Cardiovasc. Pharm. 1993; 22 (Suppl. 4):1-12

Rush JE, Freeman LM, Fenollosa NK, Brown DJ. *Population and survival characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2002; 220:202-207

Sadler JE. *Thrombomodulin structure and function*. Thromb. Haemost. 1997; 78:392-395

Saxon B, Hendrick M, Waddle JR. *Restrictive cardiomyopathy in a cat with hypereosinophilic syndrome*. Can. Vet. J. 1991; 32:367-369

Schafer AI. *Hypercoagulable states: Molecular genetics to clinical practice*. Lancet 1994; 344:1739-1742

Schafer AI. *Vascular endothelium: In defence of blood fluidity*. J. Clin. Invest. 1997; 99:1143-1144

Schiffrin EL, Touyz RM. *Vascular biology of endothelium*. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1998;32:13

Schober KE, Marz I. *Doppler echocardiographic assessment of left atrial appendage flow in cats with cardiomyopathy – abstract*. J. Vet. Intern Med. 2003;17(5):739

Schoeman JP. *Feline distal aortic thromboembolism: a review of 44 cases (1980-1998)*. J. Feline Med. Surg. 1999;1:221-31

Scott DW, Randolph JF, Walsh KM. *Hypereosinophilic syndrome in a cat*. Feline Pract. 1985; 14:22-30

Seidman JG, Seidman CE. *Molecular genetic studies of familial hypertrophic cardiomyopathy* Basic Res. Cardiol. 1998; 93 Suppl 3:13-6

Senet P, Peyri N, Bérard M, Dubertret L, Boffa MC. *Thrombomodulin, a functional surface protein on human*

*keratinocytes, is regulated by retinoic acid.* 1997 Arch Dermatol Res Feb;289(3):151-7.

Shaub RG, Gates KA, Roberts RE. *Effect of aspirin on collateral blood flow after experimental thrombosis in the feline aorta.* Am. J. Vet. Res. 1982; 43:1647-50

Shaub RG, Meyers KM, Sande RD, et al. *Inhibition of feline collateral vessel development following experimental thrombotic occlusion.* Circ. Res. 1976; 39:763-43

Shinmyozu K, Maruyama I. *Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on experimentally induced thrombosis in rats.* Rinsho Ketsueki 1991 May;32(5):497-503

Simmonds RE, Lane DA. *Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human Endothelial Cell Protein C/activated Protein C Receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/Major Histocompatibility Complex  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains.* Blood 1999; 94:632-641.

Sisson DD. PGG *Neuroendocrine. evaluation of cardiac disease.*  
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 2004; 34 (5):1105-26

Sisson DD, Kwart C, Darke PGG. *Acquired valvular heart disease in dogs and cats.* In Fox PR, Sisson DD, Moise NS ed. Textbook of canine and feline cardiology principles and practice 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999: 536-565.

Slappendel RJ, Green CE. *Infectious disease of the dog and cat.*  
Ed C.E.Green. Philadelphia, 1990 W.B. Saunders. p769.

Smith SA, Tobias AH, Jacob KA, Fine DM, Grumbles PL. *Arterial thromboembolism in cats : acute crisis in 127 cases (1992-2001) and long-term management with low aspirin in 24 cases.* J. Vet. Intern. Med.2003;17:73-83

Smucher ML, Kaul S, Woodfield JA, Keith JC, Manning SA, Gaucho JA. *Naturally occurring cardiomyopathy in the doberman pinscher: a possible large animal model of human cardiomyopathy?* J. Am. Coll. Cardiol.1990;16:200-206

Solis MM, Vitti M, Cook J, Young D, Glaser C, Light D, Morser J, Wydro R, Yu S, Fink L, et al. *Recombinant soluble human thrombomodulin: a randomized, blinded assessment of prevention of venous thrombosis and effects on hemostatic parameters in a rat model.* 1994 Mar 15;73(6):385-94

Stalis IH, Bossbaly MJ, Van Winkle TJ. *Feline endomyocarditis and left ventricular endocardial fibrosis.* Vet. Pathol. 1995; 32:122-126

Suehiro T, Shimada M, Matsumada T, Yamamoto K, Sugimachi K. *Thrombomodulin inhibits intrahepatic spread in human hepatocellular carcinoma.* Hepatology 1995;21:1285-90

Tai PC, Ackerman SJ, Spry CJ, et al., *Deposits of eosinophil granule proteins in cardiac tissues of patients with eosinophilic endomyocardial disease.* Lancet 1987; 1:643-647

Tardiff JC, Factor SM, Tompkins BD et al. *A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic mice suggest multiple cellular mechanism for familial hypertrophic cardiomyopathy.* J. Clin Invest. 1998;101:2800-2811

Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. *Endothelial protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo.* Blood 2001;97:1685-1688

Teare D. *Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults.* Br Heart J. 1958; 20:1-18

Tilley LP, Liu SK, Gilbertson SR, et al. *Primary myocardial disease in the cat. A model for human Cardiomyopathy.* Am. J. Pathol 1977;87: 493-522

Toulza SA, Center MB, Brooks K, Warner, Deal W. Protein C deficiency in dogs with liver disease. ACVIM Proceedings 2004

Van Boven HH, Lane DA. *Antithrombin and its inherited deficiency states.* Semin. Haematol. 1997; 34:188-204

Van Vleet JF, Ferrans VJ. *Myocardial diseases of animals.*  
Am.J.Pathol. 1986;124:98-178

Virchow R. *Neural fall von todlicher:Emblie der  
lungenarterien.* Arch. Pathol. Anat. 1856; 10:225

Vijayaraghavan G, Davies J, Sadanandan S, et al.  
*Echocardiographic features of tropical endomyocardial disease  
in South India.* Br. Heart J., 1983;50:450-459

Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suck HJ, Anan R,  
O'Donoghue A, Spirito P, Matsumori A, Moravec CS, Seidman  
JG, Seidman CE. *Mutations in the genes for cardiac troponin T  
and  $\alpha$ -tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy.* New Engl.  
J. Med. 1995; 332:1058-1064

Wells EG, Boundreaux MK, Crager CS, Tyler JW. *Platelet  
function and antithrombin, plasminogen, and fibrinolytic  
activities in cats with heart disease.* Am J. Vet. Res.  
1994;55(5):619-27

Wu KK, Thiagarajan P: *Role of endothellium: in thrombosis and hemostasis*. *Annu Rev Med* 47:315-331, 1996

Wynne JW, Braunwald E. The Cardiomyopathy and myocarditis. In Braunwald E. ed. *Heart disease : A text book of cardiovascular medicine 6<sup>th</sup> edition* Philadelphia, WB Saunders; 1997; 1751-1806